

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ инициалы, фамилия
подпись « ____ » _____ 20 ____ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Разработка биотехнологии получения эмбриогенных культур ели сибирской
in vitro

06.04.01.Биология

06.04.01.02 Физиология растений

Научный руководитель _____ проф. д-р.биолог.наук. Третьякова И.Н.
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник _____ Шевелева И.С.
подпись, дата инициалы, фамилия

Рецензент _____ д-р.биолог.наук Антонова Г.Ф.
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Красноярск 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1 Микрклональное размножение растений.....	5
1.2 Соматический эмбриогенез хвойных видов растений.....	6
1.3.История открытия соматического эмбриогенеза у хвойных растений. ...	7
1.4 Современные достижения в области соматического эмбриогенеза у хвойных растений.	9
1.5 Цитоэмбриологическая характеристика развития соматического эмбриогенеза у хвойных видов растений.	12
1.6 Регуляторы роста растений.....	14
1.6.1. Фитогормоны: история открытия, механизмы действия и физиологическая роль.....	14
1.6.2. Действие регуляторов роста в культуре клеток и тканей древесных организмов	18
2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
2.1. Общая характеристика <i>Picea obovata</i>	24
2.2 Характеристика условий произрастания объектов исследования.....	27
2.3 Методы исследования	28
2.3.1. Материалы исследований.....	28
2.3.2. Стерилизация помещений, посуды и эксплантов	29
2.3.3. Получение соматического эмбриогенеза из зиготических зародышей <i>Picea obovata</i>	30
2.4. Получение и обработка данных	31
2.4.1. Морфометрический анализ	31
2.4.2. Цитологический анализ эмбриональных процессов	32
2.4.3. Статистическая обработка данных.....	33
3.РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	34
ВЫВОДЫ.....	35
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	37
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	39
Приложение 1	51
Приложение 2	52

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее удачным направлением в лесной биотехнологии является размножение ценных генотипов растений с помощью соматического эмбриогенеза. Метод соматического эмбриогенеза предоставляет возможность получить массовое размножение элитных линий растений для плантационного лесовыращивания, в том числе создания лесосеменных плантаций, а также изучать процессы клеточной дифференцировки и реализации морфогенетических программ развития.

Виды ели являются перспективными декоративными деревьями для городского озеленения и защитных лесонасаждений, благодаря уникальной окраске хвои, варьирующейся от чисто зеленого до синевато-стального цвета, красивой форме кроны, простоте пересадки и высокой продолжительности жизни. Значительным для городских условий является то, что ель достаточно терпима загрязнению воздуха, холоду, засухе, имеет высокую экологическую пластичность, что дает возможность культивировать ее далеко за пределами естественного ареала.

Классические методы размножения *Picea* трудоемки и сопровождаются рядом проблем. К примеру, при семенном размножении ели только 4-6 % сеянцев обретают голубую окраску хвои. Растениям, приобретенным путем прививок, довольно часто передаются болезни от других взрослых особей. Таким образом, классические методы не решают задач размножения элитных видов, к тому же стоимость посадочного материала при их применении достаточно высокая.

К настоящему времени успешная регенерация сеянцев через соматический эмбриогенез показана для разных видов ели: черной (*P. mariana*), белой (*P. glauca*), обыкновенной (*P. abies*), гибридной (*P. glauca* × *P. engelmannii*), аянской (*Picea ajanensis*). [Lelu-Walter, Paques, 2009] Однако публикации о регенерации ели сибирской в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез отсутствуют, что является серьезным препятствием для развития технологий размножения в культуре *in vitro* данного вида.

Цель настоящего исследования - изучить особенности введения в культуру *in vitro* ели сибирской и индукцию соматического эмбриогенеза у данного вида.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать биотехнологию получения эмбрионально- суспензорной массы из незрелых зародышей ели сибирской;
2. Провести сравнительное исследование прироста каллусной массы на средах АИ и DCR;
3. Изучить цитоэмбриологическую характеристику протекания соматического эмбриогенеза у ели сибирской.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Микроклональное размножение растений

После анатомической дифференцировки большое количество клеток растений может легко перейти к делению. Это можно назвать потерей клетками специализации или дедифференцировкой. Дедифференцировка может привести к образованию каллуса в экспериментальных условиях или при механическом повреждении растения.

Каллус является гетерогенной интегрированной структурой (системой), возникающей на поверхности отдельных структур растительного организма в результате пролиферации клеток. Формирование каллуса может происходить из различных клеток генеративных и вегетативных органов [Круглова,1997]. Каллус характеризуется довольно быстрым ростом и дефицитом строгой пространственной организации веретен деления, состоит из групп неоднородных клеток, имеющих морфогенетические возможности, которые осуществляются разными путями [Батыгина, 1987].

Почти любая клетка многоклеточного организма содержит в себе полный набор генов, необходимых для формирования нетронутого организма. Также клетки имеют способность реализовывать при специальных условиях имеющуюся у нее генетическую информацию и дать начало новому организму, называется ее тотипотентностью [Бутенко, 1964]. [Walter,2004].

1.2 Соматический эмбриогенез хвойных видов растений

Множественные пути реализации репродуктивного потенциала у представителей семейства сосновых ярко проявляются в экспериментальных условиях культуры *in vitro*, и, прежде всего, при асексуальном развитии зародыша через соматический эмбриогенез (СЭ), который является одним из перспективных направлений в клеточной биотехнологии [Третьякова, 2008]. Соматический эмбриогенез(СЭ) являет собой наиболее яркое свидетельство тотипотентности растительной клетки, как фундаментальной основы биологии высших растений [Митрофанова,2009]. Многие дифференцированные клетки растительного организма сохраняют способность к перепрограммированию или трансдифференциации для дальнейшего существования в новом качестве [Pullman,Bucalo,2014]. Соматический эмбриогенез- это получение *de novo* структур, подобных зиготическим зародышам, которые имеют биполярную структуру, т.е. обладают корневым и стеблевым полюсами. Соматические зародыши можно получить путем прямого или непрямого эмбриогенеза.

Исследования, направленные на глубокое изучение процессов соматического эмбриогенеза в условиях *in vitro* весьма актуальны, так как соматический эмбриогенез представляет собой уникальную модельную систему для исследования различных физиологических процессов влияющих на морфогенез и развитие зародыша [Митрофанова,2014].

1.3.История открытия соматического эмбриогенеза у хвойных растений.

В процессе эволюции большое количество виды растений стали использовать разнообразные формы бесполого размножения для избегания отрицательных факторов среды и сбережения способности к размножению [Von Arnold et al., 2002]. В естественных условиях соматический эмбриогенез был описан у многих покрытосеменных растений. Данное явление является результатом апомиксиса, к примеру, в семяпочке у пиона [Von Arnold et al., 2002; Bicknell, Koltunow, 2004].

В данный момент соматические зародыши (СЗ) и растения-регенеранты у хвойных видов выведены у 16 видов рода *Pinus*, у 11 видов рода *Picea*, у 6 видов и гибридов рода *Larix*, у 4 видов рода *Abies*, , у *Pseudotsuga menziesii* [Durzan, Gupta, 1987; Klimaszewska, Cyr, 2002]. мегагаметофиты, зрелые и незрелые зародыши могут служить основой для индукции соматических клеток СЭ у хвойных растений [Harry, Thorpe, 1991], [Krogstrup, 1986; Attree et al., 1990; Lelu, Bornman, 1990; Ruaud et al., 1992; Lelu et al., 1994 c].

Соматический эмбриогенез у хвойных видов копирует путь развития половых зародышей: проэмбриогенез, ранний и поздний эмбриогенез. Однако в процессах образования соматических и зиготических зародышей встречаются определенные различия. Например, у зиготического зародыша воозникают морфологически одинаковые клетки 16-клеточного проэмбрио, выполняющие разлучную роль, т.е. детерминация клеток связана с их положением в системе проэмбрио, то при соматическом эмбриогенезе все структуры соматических зародышей образуются из одной и той же клетки, путем ее удлинения, которая затем неравно делится (Третьякова, 2008). Соматический зародыш представляет собой биполярную структуру, у которой одновременно развиваются апикальные меристемы стебля и корня. Соматические клетки культивируемых тканей экспланта (зиготические зародыши) при особых условиях активации преобразуются в зиготоподобные, дающие начало структурам, состоящие из длинных

асимметричных клеток, деление которых приводит к образованию эмбриональной трубки и инициали (процесс идентичный зиготическому эмбриогенезу) Таким образом, дальнейшее эмбриональное развитие клеток у соматических и зиготических зародышей идет по одной схеме. У тех и других образуются две группы клеток – эмбриональные клетки и эмбриональные трубки. Из эмбриональных клеток образуются эмбриональные глобулы, а из эмбриональных трубок дополнительные эмбриональные трубки и клетки суспензора. стремительное разрастание эмбрионально-суспензорной массы и пролиферация эмбриогенного каллуса при соматическом эмбриогенезе являются проявлением клональной активности зародышевых клеток (Третьякова, 2008). Также отмечено, что при соматическом эмбриогенезе рост эмбриональных трубок происходит полярно из нижнего слоя эмбриональных клеток.

Некоторые ученые считают, что зародыши наиболее перспективны для получения соматического эмбриогенеза у хвойных видов растений [Klimaszewska, Cyr, 2002], продолжают эксперименты по выведению СЗ и растений - регенерантов из эксплантов, полученных от деревьев, например, из вегетативных побегов. Важность выведения соматического эмбриогенеза (СЭ) из разных частей зрелых деревьев, является в возможности исследовать генетический потенциал размножаемого вида [Bonga, Durzan, 1987].

Несмотря на быстрое развитие СЭ у хвойных видов растений, регенерация путем СЭ все еще остается проблемной для ряда видов. Сложным моментом является процесс созревания СЗ, так как он влияет и на жизнеспособность, и на способность прорасти, и производить нормальные растения- регенеранты [Klimaszewska, Cyr, 2002, Круглова, 2006].

1.4 Современные достижения в области соматического эмбриогенеза у хвойных растений.

Соматический эмбриогенез (СЭ) у хвойных – сложный процесс, включающий в себя несколько стадий, следующих строго друг за другом. Каждая стадия описывается специальными характеристиками и требует определенных условий культивирования.

Соматический эмбриогенез (СЭ) разделяют на несколько стадий свойственных для всех видов хвойных растений: инициация, пролиферация, созревание соматических зародышей (СЗ), период после созревания соматических зародышей, прорастание СЗ и образование растений-регенерантов.

Инициация эмбриональной массы (ЭМ) может происходить на твердых и полутвердых средах из незрелых и зрелых зародышей [Cheliak, Klimazsewska, 1991], гипокотилей, мегагаметофитов, хвои [Gupta, Timmis, 1999]. Для инициации для большинства хвойных видов растений в качестве гормональных добавок используются ауксины с цитокининами. Образование белого или прозрачного эмбриогенного каллуса, состоящего из отдельных клеток является главным признаком удачной инициации [Klimaszewska, Cyr, 2002; Von Arnold et al., 2002]. Также на формирование эмбриогенного каллуса влияет стадия развития экспланта, вводимого в культуру, что крайне ценно при работе с зиготическими зародышами.

Накопление эмбриогенной массы происходит на полутвердых или жидких средах, гормональный состав которых не меняется вообще, либо изменяется концентрация ауксинов и цитокининов в меньшую сторону в несколько раз. Для поддержания эмбриогенной способности пролиферирующих культур нужно проводить регулярные пересадки каждые 14 суток. Во время пролиферации ауксины и цитокинины, стимулируют быстрое увеличение объема эмбриональной массы (ЭМ) и, подавляют формирование зародыша [Smertenko et al., 2003].

Индукция и пролиферация проходят без участия света, поэтому культуры хранятся в темноте, при комнатной температуре 24-25°C.

Одним из важных компонентов питательной среды в период созревания СЗ является абсцизовая кислота (АБК), которая обеспечивает понижение содержания воды в пролиферирующих культурах [Stasolla et al., 2002; Lelu et al., 1995].

Вызревание соматических зародышей происходит обычно на свету низкой интенсивности. Для созревания СЗ у большинства представителей родов *Piceae* и *Larix* [Gorbatenko, Nakman, 2001] необходимо проведение обработки эксплантов до пересадки для созревания. Первым делом у представителей данных родов культивирование эксплантов на безгормональной среде с добавлением активированного угля в течение 3-7 суток, так как удаление гормонов приводит к переходу от эмбриональной массы к образованию соматических зародышей [Klimaszewska, Cyr, 2002; Smertenko et al., 2003]. Важно отметить, что последующее развитие соматических зародышей подобно основному процессу зиготического эмбриогенеза *Pinaceae* [Singh, 1978; Yeung et al., 1998; Yeung, Stasolla, 2000].

Иные авторы выделяют также период после созревания соматических зародышей [Klimaszewska, Cyr, 2002]. Для данного периода может применяться и кратковременное хранение при низкой относительной влажности, и использование желлирующих компонентов.

Проращивание СЗ в культуре *in vitro* проводится на полутвердых средах содержащих сахарозу. Удлинение эпикотилия и появление хвои наблюдается в течение 12-16 недель и зависит от вида растения [Misra, Green, 1991]. Выращивание полученных растений-регенерантов проводится в теплицах при большей влажности воздуха для акклиматизации молодых растений [Hay, Charest, 1999].

Помимо всего этого, важным моментом, помогающим преодолеть ряд сложностей при соматическом эмбриогенезе, является метод криоконсервации – сохранение растительных тканей в жидком азоте. Первые

работы по получению криоконсервации эмбриогенных тканей хвойных видов растений были проведены с помощью Ели сизистой.

Главной целью исследователей, стремящихся сохранить эмбриогенные ткани, является постепенное уменьшение свободной воды в эмбриогенных клетках и предотвращение образования межклеточного льда при помощи метода медленной заморозки [Klimaszewska, Cyr, 2002]. Колбы с культурами немного выдерживаются при температуре до -80°C и погружаются в жидкий азот на сохранение.

Для реконструкции исследованных культуры оттаиваются при температуре 37°C в течение 2-3 минут и перемещаются на свежую среду. Восстановление роста культур обычно начинается в течение 1-2 недель.

Метод криосохранения дает возможность долго сохранять эмбриогенные культуры и соматические зародыши, которые после размораживания способны образовать здоровые растения-регенеранты.

1.5 Цитозмбриологическая характеристика развития соматического эмбриогенеза у хвойных видов растений.

До сих пор не сложилось единого взгляда на механизм формирования эмбриональной массы из эксплантов хвойных растений и, что еще более важно, на появление в ней соматических зародышей. Разными исследователями были предложены следующие механизмы формирования соматических зародышей:

- кливажная полиэмбриония путем мультипликации и «отпочковывания» эмбриональных клеток [Von Aderkas et al., 1991];
- формирование соматических зародышей в результате деления меристематических клеток, располагающихся в суспензоре [Stasolla, Yeung, 2003];
- формирование соматических зародышей в результате асинхронного деления отдельной клетки экспланта [Von Arnold, Nakman, 1988].

На примере рода *Picea* было описано более подробное описание образования эмбриональной массы [Von Arnold et al., 2002]. По полученным данным, тотипотентные клетки несимметрично делятся на несколько клеток и образуют полярную структуру, включающую в себя удлиненные клетки с примыкающими к ним маленькие шарообразные клетки. С данного этапа начинается формирование проэмбриональной массы. Маленькие, сферические клетки с плотной цитоплазмой, составляют эмбриональную массу. В результате асимметричных делений в большинстве клеток в эмбриональной массе возникает образование слоя состоящего из удлиненных клеток эмбриональных трубок, которые подвергаются дифференцировке и образуют один слой суспензорных клеток. Из этого следует то что, проэмбриональная масса проходит подряд все стадии ПЭМ I, ПЭМ II и ПЭМ III, и в результате чего возникает значительное увеличение числа клеток обоих типов с лишением полярности первоначальной структуры (рис. 1).

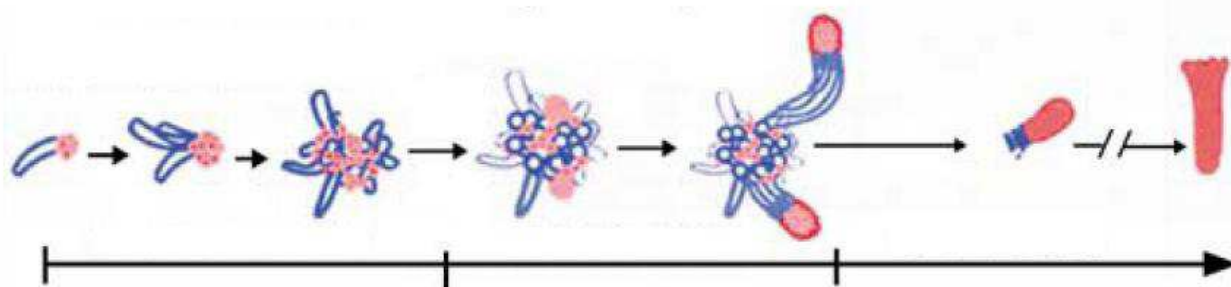


Рис. 1. Течение процесса соматического эмбриогенеза у хвойных видов растений рода *Picea* (иллюстрация по Filonova et al., 2000a).

Образование СЗ *de novo* происходит путем разделения проэмбриональной массы на ПЭМ III стадии. Поляризация зародыша происходит через образование двух разных конструкций: эмбриональной массы и суспензора, связанных между собой клетками эмбриональных трубок. Некоторыми авторами было открыто то, что суспензор СЗ–дифференцированная структура, устраняющаяся при помощи апоптоза в завершении раннего СЭ [Filonova et al., 2000a, 2002; Vozhkov et al., 2002].

Во всех работах, затрагивающих поздний эмбриогенез СЗ в культуре *in vitro*, выделяется то, что развитие СЗ на данной стадии проходит подобным образом развитию ЗЗ: происходит образование двух полярных меристем, эпидермиса, корневого. [Von Arnold et al., 2002].

Из всего этого следует то, что соматический эмбриогенез – это непростой многоуровневый процесс, первичные стадии которого могут происходить разными путями у различных представителей хвойных видов растений. Однако в результате сформируются соматические зародыши, представляющиеся аналогами зиготических зародышей, способные прорасти и сформировать полноценные растения-регенеранты. Полученные с помощью соматического эмбриогенеза растения обширно применяются в различных лесовосстановительных программах [Klimaszewska, Cyr, 2002; Campbell et].

1.6 Регуляторы роста растений

1.6.1. Фитогормоны: история открытия, механизмы действия и физиологическая роль

В 1880 году Ч.Дарвин впервые выдвинул идею о росте и развитии растительного организма при помощи химической (гормональной) регуляции данных процессов. Было выявлено, что с помощью фитогормонов возникает взаимосвязь клеток, тканей и органов в растениях, регулирование функций и обеспечение единства организма. Также было обнаружено то, что фитогормоны участвуют в процессах старения [Минина, Ларионова, 1979], перехода к состоянию покоя; в транспорте веществ, и адаптации к стрессовым воздействиям. Фитогормоны способны контролировать почти весь метаболизм растения в онтогенезе [Медведев, 2004].

Все фитогормоны имеют некоторые общие свойства: образуются в самом растении, представляют собой высокоэффективные регуляторы физиологических программ. Их действие происходит в достаточно низких концентрациях из-за высокой чувствительности растительных клеток. Фитогормоны образуются в одних тканях растительного организма и далее транспортируются в другие, что приводит к функциональным изменениям органов и тканей, но также они могут работать в том месте, где они и были образованы [Кулаева, 1995; Медведев, 2004].

В данный момент выделяют несколько основных групп гормонов – это ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая кислота (АБК) и этилен.

Ауксины приводят в действие деление и растяжение клеток, принимают участие в формировании сосудов и боковых корней, играют главную роль в ростовых движениях. Природным ауксином является β -индолилуксусная кислота (ИУК). В больших количествах данный гормон содержится в молодых листьях, цветках, и семенах. В растениях ауксины синтезируются в верхушке стебля, и далее двигаются в нижерасположенные части до корневой системы, где и обеспечивают нормальный рост корней.

Помимо природных ауксинов известен ряд синтетических ауксинов, которые подразделяются на три класса: производные индола – индолил-3-пропионовая (ИПК) и индолил-3-масляная (ИМК) кислоты; хлорзамещенные феноксипроизводные – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота (1,4,5-Т) и др.; и производные нафтилалкилкарбоновых кислот – 1-нафтилуксусная кислота (1-НУК), ее калиевая соль (КАНУ), 2-нафтоксиуксусная кислота (2-НОУК).

Цитокинины способны стимулировать деление клеток. Первый естественный цитокинин – зеатин, был выделен из незрелых зерновок кукурузы в 1963 году [Letham, 1963]. Также довольно часто в растениях встречаются другие природные цитокинины – кинетин и зеатинрибозид.

К специфическим характеристикам цитокининов относятся предотвращение распада хлорофилла, разрушения органелл и задержка старения листьев. Чаще всего действие цитокининов происходит в сочетании с ауксинами. Наиболее важным действием цитокининов вместе с ауксинами является контроль деление клеток. Цитокинины активируют репликацию ДНК и стимулируют деление клеток, контролируя переходы между этапами клеточного цикла (из G_1 в S , из G_2 в фазу митоза) [Медведев, 2004]. Более известным синтетическим подобием цитокининов является бензиламинопурин (БАП).

Первым выделившим гиббереллины являлись ученые из Японии [Yabuta, Sumiki, 1938]. Более позднее был выведен первый гиббереллин растительного происхождения [Mac Millan, 1958].

Гиббереллины обладают возможностью удлинять стебли растений, увеличивать количество междоузлий, образовать плоды и ягоды. Гиббереллины активизируют образование и рост плодов, стимулируют прорастание семян. Также они контролируют рост зародыша, участвуют в формировании пола у растений.

Также к числу гормонов растений относится абсцизовая кислота (АБК), выделенная в 1963 г. Ф.Уорингом из листьев березы и явора, и Ф. Эддикотом, [Уоринг, Филипс, 1984].

АБК играет ведущую роль в регуляции покоя, так как является активатором развития роста почек и прорастания семян. При водном дефиците накапливается АБК, активизируя закрывание устьиц. Абсцизовая кислота способствует замедлению роста, сопровождающееся ускорением старения тканей.

Главная роль АБК заключается и в процессе образования семян. Особенно важной функцией АБК является запуск экспрессии *LEA*-генов, кодирующих *LEA*-белки, которые способны повышать устойчивость растения к высуханию, засухе и заморозкам. Данные белки могут прочно связывать воду и предотвращать образование льда. Накопление АБК является важным фактором для переживания неблагоприятных условий в зимний период.

Присутствие этилена в регулировании роста растений впервые было обнаружено в 1901 году Д.Н. Нелюбовым, который показал, что светильный газ, который содержит этилен, приводит к задержке роста стебля у проростков гороха (диагравитропизм) [Кулаева, 1995]. Позже Р. Гэйн определил этилен как нормальный продукт метаболизма растений и назвал его гормоном [Gane, 1934].

Далее выяснилось, что этилен производится как плодами, так и листьями, цветами, корнями и семенами. [Медведев, 2004].

Спектр физиологических действий, в которых принимает участие этилен, достаточно обширен. Этилен участвует в созревании плодов и старению тканей, прорастании семян двудольных растений, развитии цветков, образовании корневых волосков и защите растений от патогенных бактерий, путем образования специальных ферментов, которые способны разрушать клеточную стенку патогенного вида.

Открытие brassinостероидов пришлось на 1979 год, тогда же, впервые был выделен из липидной фракции пыльцы рапса – brassинолид - стероидный фитогормон [Grove et al., 1979]. В данный момент найдено более 60 схожих веществ. Наивысшее количество brassиностероидов (БС) содержится в генеративных органах растений.

Жасминовая кислота и ее производные (метилжасмонат) способны контролировать созревание плодов, рост корня, и производство жизнеспособной пыльцы. Наиболее важная функция жасминовой кислоты заключается в ее участии в ответных реакциях на повреждение растений насекомыми и патогенными бактериями, при этом концентрация ЖК резко возрастает, что повышает устойчивость растения к вредителю.

Салициловая кислота (СК) повышает устойчивость растений к различным патогенным бактериям и инфекциям [Медведев, 2004]. Однако в данный момент механизм этой защиты мало изучен.

1.6.2. Действие регуляторов роста в культуре клеток и тканей древесных организмов

Регуляторы роста растений являются главными химическими средствами воздействия на растения, их использование дало крупное практическое применение в исследованиях, проводимых в культуре клеток и тканей растений [Кулаева, 1995].

Регуляторами роста растений являются не только фитогормоны, но и большое количество искусственно созданных - синтетических веществ, которые воздействуют на рост и развитие растения. Каждый вид регуляторов роста растительных организмов имеет широкий ряд физиологических действий на различные растения в культуре *in vitro*. Данное влияние определяется как видом регулятора роста, так и его концентрацией, присутствием или отсутствием других регуляторов роста [Minocha, 1987].

Несмотря на то, что некоторые исследователи находили индивидуальные ответы с влияниями культуры клеток и тканей регуляторами роста разнообразных видов растений [Bonga, Durzan, 1982; Zaerr, Marpe, 1982], воздействие разнообразных групп фитогормонов можно объединить.

1. Ауксины главным образом применяются для индукции каллуса из различных типов тканей. Гормон синтетической природы – 2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) является широко распространенным и эффективным ауксином для работы в культуре *in vitro*. Большинство видов древесных растений устойчиво к широкому спектру концентраций ауксинов (от 10^{-8} до 10^{-3} М). В общем 2,4-Д, НУК, ИМК и ИУК оказывают похожее действие, но некоторые ткани демонстрируют специфические качественные отличия [Zaerr, Marpe, 1982]. Корнеобразование побочных побегов при культивировании верхушек побегов и семядолей, и восстановления побегов из каллуса некоторых покрытосеменных растений получается с помощью использования низких концентраций ауксинов, но при этом ИМК и НУК оказывались наиболее эффективными в сравнении с ИУК и 2,4-Д [Amerson,

Mott, 1982; Mott, Amerson, 1984]. Как правило ауксины применяются в сочетании с другими фитогормонами.

2. С помощью цитокининов происходят все главные способы микроклонального размножения растений. При этом на питательную среду размещают изолированную стеблевую точку роста растений, которая при действии цитокининов дает появление нескольких побегов. При использовании данного метода растение размножается без изменения генотипа, что способствует сохранению и размножению редких видов растений.

Цитокинины в сочетании с ауксинами, используются для инициации и поддержания каллусных культур. При микроклонировании зародышей данные фитогормоны обеспечивают улучшение образования побегов. Данная реакция характерна и для покрытосеменных, и для голосеменных растений. С помощью цитокининов адвентивные почки возможно получить из сегментов листьев и междоузлий [Campbel, Durzan, 1976; Winton, Varhagen, 1977; Arnold, Eriksson, 1979]. При применениях цитокининов совместно с ауксинами в нужных концентрациях, могут вызывать образование эмбриогенного каллуса при культивировании разнообразных видов эксплантов голосеменных растений [Lelu, et al., 1994a; Malabadi, Van Staden, 2005]. Широко распространенными цитокининами при культивировании тканей являются бензиладенин, 6-бензиламинопурин (6-БАП) и кинетин.

3. Гиббереллины в большинстве случаев не имеют явного воздействия на морфогенез клеточных структур древесных растений при культивировании эксплантов *in vitro* [Zaerr, Mapes, 1982]. Однако присутствие гиббереллинов в индукции цветения многих голосеменных указывает на то, что вероятно гиббереллины могут вносить вклад в определение морфогенетической компетентности каллусных культур древесных видов растений [Stuard, Cathey, 1961; Minocha, 1987].

4. Доказано, что абсцизовая кислота, способствует каллусообразованию и эмбриогенезу у многих видов покрытосеменных растений [Altman, Goren,

1971; Ammirato, 1983; Jansson, Bornman, 1983]. Комплекс гиббереллиновой кислоты совместно с АБК может оказывать как подавляющее, так и стимулирующее действие. Похожим образом воздействие АБК может меняться с присутствием ауксинов или цитокининов в среде. К примеру, АБК в комплексе с ауксинами играет главную роль в созревании соматических зародышей хвойных видов растений [Lelu et al., 1994a].

5. Этилен является менее исследованным регулятором роста, как правило, он производится в клеточной культуре в низких количествах и изучается как замедлитель для деления клеток [Minocha, 1987], обеспечивая старение клеток [Romani, 1987].

6. Также выделяют и другие вещества, оказывающих влияние на морфогенез в культуре клеток и тканей: три - индобензойная кислота, разнообразные аналоги ауксинов и цитокининов, феноловые кислоты, и др.

Из всего выше сказанного, можно заключить то что, спектр воздействия различных регуляторов роста растений крайне велик, что увеличивает интерес ученых исследованиям в области культуры клеток тканей и органов растений, исследованию действия регуляторов роста, как на отдельные клетки, так и на ткани растений, и также к формированию новых растительных организмов в культуре *in vitro*.

1.7 Роль состава и консистенции питательных сред, pH, интенсивности освещения и температуры в процессе соматического эмбриогенеза.

Основными индукторами дифференциации соматических эмбриоидов и дальнейшей регенерации растений из них являются специфически необходимые регуляторы роста растений, осмотически активные вещества, консистенция и pH среды, интенсивность освещения, фотопериод, температура и влажность. Базовыми питательными средами для ели сибирской являются среды AI и DCR. Данные среды отличаются концентрацией макро- и микросолей, что значительно сказывается на образовании эмбриогенного каллуса и дальнейшей пролиферации клеток. Для каждого этапа соматического эмбриогенеза используются нужные питательные среды (Dunstan et al., 1995). Для культур необходимо содержание в питательной среде экзогенных регуляторов роста. Ауксины (2,4-Д) и цитокинины (БАП) нужны для индукции и пролиферации эмбриональной ткани, тогда как развитие ранних соматических зародышей идет при удалении данных компонентов из среды, так как при их присутствии ткани нового зародыша снова могут подвергнуться дедифференцировке (Зайнутдинова и др., 2005; von Arnold et al., 2002).

1.7.1 Влияние pH

Одним из необходимых условий удачной реализации процесса СЭ является правильно выбранный pH питательной среды. В соответствии с потребностями растений концентрация ионов водорода может быть варьироваться в пределах 4,0-7,5. Пониженное значение pH (4,0-4,5) способствует сохранению проэмбрио на преглобулярной стадии, а повышение pH до 5,8 дает возможность развития и формирования растений и повышает эффективность соматического эмбриогенеза [Митрофанова, 2009].

1.4.3 Роль интенсивности освещения и температуры

Большую роль в жизнедеятельности растений играют интенсивность освещения и температура. Между качеством света и накоплением в растении некоторых гормонов и ингибиторов роста имеется достаточно тесная связь [Константинова и др., 1987]. Для культивирования СЗ большинства видов растений благоприятной температурой является температурный диапазон в пределах 21—25 °С (Dunstan et al., 1995). В хвойных растениях влияние абиотических факторов, таких как свет, при созревании соматических эмбрионов, обычно не изучается. Относительно 25 недавно было исследовано влияние условий освещения при созревании соматических эмбрионов гибридной лиственницы (Kim, Moon 2007; LeluWalter, Pâques, 2009). Морфогенез соматических зародышей, вызревающих на свету и в темноте, не различался. Зародыши имели полный набор органов: семядоли, гипокотиль и зародышевый корешок. Однако свет отрицательно влиял на накопление белка, в то время как накопление полифенолов усиливалось (von Aderkas et al., 2015).

2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика *Picea obovata*

В данном исследовании объектами изучения являлись деревья ели сибирской (*Picea obovata*) и их незрелые зиготические зародыши.

Ель сибирская является представителем отдела голосеменные (*Gymnospermae* (*Pinophyta*)), класса хвойные (*Coniferales*), семейства сосновые (*Pinales*), Род – Ель (*Picea*).

Ель сибирская - произрастает на территории Западной и Восточной Сибири, на юге до Алтайских гор на северо-западе до Монголии и встречается равномернее других хвойных видов растений. Наиболее привычна, как сопутствующая порода в лесах разнообразного состава. Редко становится основным лесообразователем, преимущественно в долинных лесах.

Ель обитает на почвах самого разнообразного состава, в том числе и на холодных переувлажненных, но сухих песчаных почв в Средней Сибири, обычно избегает.

Ель сибирская - достаточно большое дерево. Некоторые виды высотой более 30 метров иногда наблюдаются в долинах рек. Но как правило, более крупные ели значительно ниже 30 метров. Диаметр больших деревьев данного вида, обычно, не превышает 68-72 сантиметров, но отдельные стволы достигают 1 метра в толщину. К северу и востоку области размер елей уменьшается, но не так значительно, как сосен и лиственниц.

Рост ели в высоту изменяется с возрастом и в основном зависит от освещения. Быстрее всего растет в стадии жердняка, далее рост замедляется, но продолжается до глубокой старости. Рост ели в первые годы (до пяти лет) очень медленный. В первый год ель вырастает всего до 4-5 сантиметров, к десяти годам достигает не более 1-2 метров. После 10-летнего возраста, при благоприятных условиях, дает хорошие приросты, иногда доходящие до одного метра в год. На восстановлении отрицательно сказывается задернение почвы злаками и периодические лесные пожары, губительные именно для

данной хвойной породы из-за её поверхностной корневой системы, тонкой коры и низко опущенной кроны. Ель умеренно требовательна к плодородию и влажности почв (мезофит, мезотроф), по данным показателям превосходит сосну обыкновенную. Очень теневынослива. Продолжительность жизни ели в среднем 250–300 лет.

Хвоя у ели сибирской линейно-шиловидная, зеленая, жесткая, колючая, на ветвях располагается поочередно, более густая и короткая, чем у ели обыкновенной 10-15 (30) миллиметров длиной и шириной до 1 миллиметра. Хвоинки четырехгранные, с каждой стороны имеют по 2-3 слабо выраженные устьичные полоски, что делает в целом охвоевание сизоватым.

Цветет в мае-июне с 8 лет, семена созревают в сентябре. Мужские колоски желто-оранжевые или фиолетово-красные, овальные, 12 миллиметров длины, 6-7 миллиметров толщины, сидят по несколько на концах ветвей. Женские шишки после опыления красноватые, прямостоячие, при созревании зеленые или фиолетовые, позднее глянцевые, темно-коричневые, висячие, яйцевидно-овальные, 3,5-8 сантиметра длины, 2,5-4 сантиметра в диаметре. Созревают на 4-6 месяце после опыления [Козубов и соавторы, 1974].

Семенные чешуи тонкие, выпуклые, веерообразные, на верхнем конце округлые, реже отсеченные, слегка притупленные, цельнокрайние, иногда слабо выемчатые. Чешуйка коричнево-желтая, блестящая, слегка покрыта матовым коротким пушком. Вид легче всего отличить от ели обыкновенной по семенным чешуям. Кроющие чешуи в 5 раз короче семенных, на верхушке грубозубчатые. Семена 4 миллиметра длиной, мелкие, черноватые, яйцевидные до бледно-желтоватых, с крылом в 3 раза длиннее семени, созревают к концу сентября в год опыления. Шишки намного мельче, тем более в неблагоприятных лесных условиях. Опыление у сибирской ели происходит несколько позднее, из-за этого семена имеют невысокую всхожесть (60-65%) и многие из них оказываются пустыми.

Также на плохое качество семян указывает и короткий вегетационный период, который снижает репродуктивную способность ели.

Репродуктивная способность у ели начинается в возрасте 15-18 лет, в древостоях несколько позже - с 30-50 лет. Плодородные годы возобновляются через 3-5 лет, в благоприятных лесных условиях немного чаще. В промежутках между ними ель практически не производит семян. Урожай может колебаться от 200 до 700 тысяч семян на 1 гектар.

На открытом местообитании хвоя и побеги ели подвергаются негативному воздействию поздними заморозками, что значительно удерживает возобновление.

Ель довольно сильно подвержена болезням, значительно сильнее, чем другие хвойные виды Сибири.

2.2 Характеристика условий произрастания объектов исследования

Деревья ели сибирской, использовавшиеся в данном исследовании, произрастают в естественных условиях на территории Красноярского края в Стационаре «Погорельский бор» Института леса СО РАН, а так же в зеленых насаждениях г. Красноярска.

В искусственных посадках в окрестностях г. Красноярска, изучаемые виды деревьев растут в Дендрарии Института леса СО РАН и в районе Академгородка.

2.3 Методы исследования

2.3.1. Материалы исследований

В роли эксплантов для индукции СЭ применялись отдельные незрелые зиготические зародыши на предсемядольной стадии развития, полученные во второй половине июля.

Для инициации эмбриогенного каллуса у ели сибирской использовали минеральные основы базовых сред АИ и DCR. Регуляторами роста выступали фитогормоны ауксин (2,4Д) - 2 мг/л и цитокинин (6-БАП) - 1 мг/мл. Запатентованный состав среды АИ и DCR размещен в приложении 2. Водородный показатель среды приводили к 5,8. Автоклавировали при 121°C, 110 кРа в течении 60 минут [Третьякова и соавторы, 2015].

2.3.2. Стерилизация помещений, посуды и эксплантов

Экспланты ели вводились в культуру *in vitro* в стерильной среде в ламинар-боксе. Помещение подвергалось обработке ультрафиолетовым облучением в течение 40 минут.

Посуда, дистиллированная вода и питательные среды подвергались обеззараживанию в автоклаве при давлении 1 А° и при температуре 120° С на протяжении 30-60 минут. Лабораторные инструменты обрабатывались 96 % спиртом.

Полученные семена очищались от покровных чешуй, поверхностно стерилизовались раствором 0,5% раствора марганца, далее в условиях стерильного ламинар-бокса, обрабатывались повторно 96% раствором спирта на протяжении 5 минут, обрабатывались 10% раствором перекиси водорода на протяжении 5-10 минут, несколькократно промывались в обеззараженной дистиллированной воде.

Из семян извлекались зародыши, которые далее переносились на питательную среду. На колбу приходилось 5 зародышей [Третьякова и соавторы, 2012]. Общее число эксплантов с одного дерева составляло 50 штук.

2.3.3. Получение соматического эмбриогенеза из зиготических зародышей *Picea obovata*

Для проведения экспериментов по культуре клеток *in vitro* требуются определенные питательные среды, отличающиеся по составу и концентрации макро- и микроэлементов, фитогормонов и других веществ, имеющих значительное влияние на развитие тканей в культуре *in vitro*.

Для проведения исследований по инициации и пролиферации эмбриональной массы из зиготических зародышей *Picea obovata* использовались базальные среды АИ с добавлением мезоинозита- 0,1 г/л, аскорбиновой кислоты- 0,4 г/л, гидролизата казеина- 1 г/л, L-глутамина -0,5 г/л, сахарозы - 30 г/л, агара – 7 г/л. и DCR с добавлением мезоинозита- 0,02 г/л, аскорбиновой кислоты- 0,3 г/л, казеина-0,5 г/л, L-глутамина -0,5 г/л, сахарозы - 30 г/л, агара – 7 г/л. В качестве регуляторов роста были применены ауксин (2,4Д) - 2 мг/л и цитокинин (6-БАП) - 1 мг/мл. (см. приложение 2). Ph среды до автоклавирования доводился до $5,7 \pm 0,1$.

В течении первого месяца эмбрионально- суспензорная масса подвергалась индукции и частых пересадок не требовала.

Пролиферация проводилась в течение следующих 5 месяцев, и требовала регулярных пересадок каждые 2 недели.

Инициация и пролиферация ЭСМ проводилась в темноте при температуре $24 \pm 1^\circ \text{C}$.

2.4. Получение и обработка данных

2.4.1. Морфометрический анализ

Для выявления интенсивности прироста каллуса размеры эксплантов измерялись каждые две недели.

Вычисление объема эксплантов проводилось по формуле:

$$V = \frac{2}{3} \cdot \pi \cdot S \cdot L \cdot h, \text{ где}$$

V – объем экспланта, мм³;

π – 3,14;

S – ширина экспланта, мм;

L – длина экспланта, мм;

h – высота экспланта, мм.

Прирост массы каллуса также измеряли каждые две недели с использованием лабораторных электронных весов DX-120[Молчанов и соавторы, 1967].

2.4.2. Цитологический анализ эмбриональных процессов

При проведении цитологического анализа полученные образцы фиксировались каждые две недели. Данный анализ осуществлялся при помощи давленных препаратов [Паушева, 1980, Горбунова, 1992]. Окраска полученных препаратов каллусов осуществлялась при помощи использования сафранина с применением метиленового синего. Полученные экспланты размещались на предметное стекло и 1-2 минуты выдерживались в красителе. Далее добавлялось немного глицерина для фиксации препарата, который позже фиксировался покровным стеклом.

При исследовании процесса морфогенеза протекающего в культурах *in vitro* выполнялось наблюдение 3 препаратов и измерение 25-100 клеток и клеточных структур. Наблюдение микроскопических образцов производился при помощи микроскопа МБИ-6 (СССР) и KS Imaging System (Германия). Замер клеток и эмбриональных структур производили окулярномикрометром с дальнейшим переводом полученных единиц в мкм.

2.4.3. Статистическая обработка данных

Полученные данные обрабатывались по стандартной методике при помощи программы Microsoft Excel (2007). Описательную статистику проводили по параметрам выборки среднеарифметического значения.

Стандартная ошибка общей средней рассчитывалась, как корень квадратный из суммы квадратов частных ошибок, деленный на число независимых экспериментов [Рокицкий, 1993].

3.РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Из текста выпускной квалифицированной работы изъяты с 34 по 42 страницу результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

ВЫВОДЫ

Соматический эмбриогенез является инструментом, с помощью которого возможно изучение процессов дифференцировки клеток растительных организмов, физиологических и молекулярно-генетических процессов (von Arnold et al., 1988). В данный момент полученная биотехнология обращена на получение и увеличение генетически важных видов деревьев, и увеличение производительности лесов при получении клонов элитных сеянцев, различающихся по улучшенным качествам древесины (Park, 2002; Pullman, 2014).

Основными моментами для удачного проведения соматического эмбриогенеза оказываются выбор деревьев, экспланты которых постоянно имеют эмбриогенный потенциал в культуре *in vitro*, а также правильный выбор физикохимических условий необходимых при культивировании, в том числе выбор правильных концентраций и соотношений фитогормонов, макро- и микроэлементов в питательной среде. Данные факторы являются индивидуальными для каждого вида растения.

По результатам данных исследований были сделаны следующие выводы:

1. Получены каллусные культуры ели сибирской от 11 деревьев-доноров в культуре *in vitro* на средах АИ и DCR;
2. Исследовано влияние состава питательных сред на прирост каллусной массы на средах АИ и DCR с различной концентрацией элементов. Наибольший прирост каллуса был выявлен на среде АИ с добавлением необходимых элементов в большем составе;
2. Пролиферация каллусной массы ели сибирской происходила на средах с тем же составом, что и для индукции, но с пониженным содержанием сахарозы (20 г/л) и уменьшенной концентрацией ауксина (2 мг/л) и цитокинина (0,5 мг/л);
3. Сохранность каллуса через 6 месяцев в среднем составила 10%;

4. У эксплантов трех генотипов ели сибирской получена эмбрионально-суспензорная масса (ЭСМ), которая способна пролиферировать в течение нескольких лет;

5. Цитологический анализ показал, что первоначально ЭМС состояла из удлинённых и изодиаметрических клеток. Через 1,5 мес. культивирования из удлинённых клеток развивались глобулярные соматические зародыши, которые активно мультиплицировали.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК – Абсцизовая кислота

БАП (6-БАП) – 6-бензиламинопурин

ИУК– β -индолилуксусная кислота

ИПК – Индолил-3-пропионовая кислота

ИМК – Индолил-3-масляная кислота

1-НУК – 1-нафтилуксусная кислота),

2-НОУК – 2-нафтоксиуксусная кислота .

СЗ – Соматический зародыш

СК – Салициловая кислота

СЭ – Соматический эмбриогенез

ЭМ – Эмбриогенная масса

ЭСМ– Эмбрионально -суспензорная масса

РЕФЕРАТ

Данная выпускная магистерская диссертация на тему «Разработка биотехнологии получения эмбриогенных культур ели сибирской *in vitro*» состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждений, заключения, списка литературных источников, списка сокращений и содержит 10 рисунков, 1 формулу и 2 приложения. Библиографический список включает 20 источников литературы на русском языке и 82 источника на иностранном языке.

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ, ЕЛЬ СИБИРСКАЯ, СОМАТИЧЕСКИЕ ЗАРОДЫШИ, КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ, ЭМБРИОНО-СУСПЕНЗОРНАЯ МАССА, ФИТОГОРМОНЫ, ЭМБРИОНАЛЬНАЯ МАССА.

Цель работы- изучить особенности введения в культуру *in vitro* ели сибирской и индукцию соматического эмбриогенеза у данного вида.

Задачи:

1. Разработать биотехнологию получения эмбрионально- суспензорной массы из незрелых зародышей ели сибирской;
2. Провести сравнительное исследование прироста каллусной массы на средах АИ и DCR;
3. Изучить цитоэмбриологическую характеристику протекания соматического эмбриогенеза у ели сибирской

Объект исследований- деревья ели сибирской и ее незрелые зиготические зародыши.

В процессе исследований был проведен цитологический и морфологический анализы протекания соматического эмбриогенеза у ели сибирской, подобраны оптимальные питательные среды, а также условия для успешного выращивания культур *in vitro*.

Данная работа по изучению соматического эмбриогенеза ели сибирской будет продолжена в дальнейшем.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Батыгина, Т. Б. Хлебное зерно / Т. Б. Батыгина. – Л.: Наука, 1987. – 103 с.
2. Батыгина, Т. Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей / Т. Б. Батыгина // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. № 6. – С. 884-898.
3. Бутенко, Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р. Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 146 с.
4. Горбунова, В. Ю. Эмбриоидогенез в культуре пыльников пшеницы: цитолого-гистологические аспекты / В. Ю. Горбунова, Н. Н. Круглова, Н. Н. Потапова. Ч. I. – Уфа: БНЦ УрО РАН, 1992. – 63 с.
5. Зайнутдинова Э.М., Круглова Н.Н., Шаяхметов И.Ф. Роль АБК в соматическом эмбриогенезе растений в культуре *in vitro* // Физиология и биохимия культ. растений. — 2005. — 37, № 3. — С. 208—219.
6. Круглова, Н. Н. Каллусогенез как путь морфогенеза в культуре пыльников злаков / Н. Н. Круглова, В. Ю. Горбунова // Успехи современной биологии. – 1997. – Вып. 1. Т. 117. – С. 83-94.
7. Круглова, Н.Н. Биотехнологическая оценка экспланта для получения растений-регенерантов яровой пшеницы в культуре *in vitro* в целях адаптационной селекции в условиях южного Урала / Н.Н. Круглова, О.А. Сельдимирова, Д.Ю. Зайцев, А.А. Катасонова // Известия Челябинского науч. центра. – 2006. – Вып. 2 (32). – С. 94-98.
8. Константинова Т.Н., Аксенова Н.П., Сергеева Л.И., Чайлахян М.Х. Взаимное влияние света и гормонов на регуляцию морфогенетических процессов в культуре *in vitro* // Физиология растений. — 1987. — 34, № 4. — С. 795—802.
9. Кулаева, О. Н. Восприятие и преобразование гормонального сигнала у растений / О. Н. Кулаева // Физиология растений. – 1995. – Т. 42. – С. 661-671.

10. Медведев, С. С. Физиология растений / С. С. Медведев // Изд-во Санкт-Петербургского университета. – 2004. – 336 с.
11. Минина, Е. Г. Морфогенез и проявление пола у хвойных / Е. Г. Минина, Н. А. Ларионова. – М.: Наука, 1979. – 216 с.
12. Митрофанова И.В. Методические аспекты в исследовании органогенеза и соматического эмбриогенеза *in vitro* представителей семейств Ranunculaceae, Smoraceae, Rosaceae, Oleaceae / И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова, Н.В. Корзина //Сборник научных трудов ГНБС/ Никитский ботанический сад- Национальный научный центр. Ялта, 2014.- Т.138.-С.102-136.
13. Митрофанова, И. В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений / И.В. Митрофанова // Физиология и биохимия культ. растений. – Киев, 2009. – Т. 41, №6 – С. 496-508
14. Молчанов, А.А. Методика изучения прироста древесных растений / А.А. Молчанов, В.В. Смирнов. – М.: Наука, 1967. – 100 с.
15. Паушева, З. П. Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева. – М.: Колос, 1980. – 340 с.
16. Полевой, В. В. Фитогормоны / В. В. Полевой. – Л.: Изд-во Ленинградского Университета, 1982. – 356 с.
17. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. – Минск: Высшая школа, 1993. – 320 с.
18. Третьякова, И.Н. Перспективы микроклонального размножения хвойных в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез/ И.Н Третьякова, Е.В.Ворошилова, Д.Н.Шуваев, М.Э. Пак// Хвойные бореальной зоны/ Учреждение Российской академии наук Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН.- 2012.- Т.30, №1-С.180-186.
19. Третьякова, И.Н. Соматический Эмбриогенез *Pinus Pumila* и продуктивность эмбриогенных линий при длительном

культивировании *in vitro*/ И.Н Третьякова, Д.Н.Шуваев //Онтогенез.- 2015.- Т.46, №5.-С.327-337.

20. Третьякова И.Н. Сходства и различия зиготического и соматического эмбриогенеза сибирских видов хвойных // Материалы XII съезда Русского ботанического общества «Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века», Петрозаводск, 22-27 сентября 2008. Ч. 1. С. 298-300.

21. Уоринг, Ф. Рост растений и дифференцировка / Ф. Уоринг, И. Филипс. – М.: Мир, 1984. – 343 с.

22. Чайлахян, М. Х. Регуляция цветения высших растений / М. Х. Чайлахян. – М.: Наука, 1988. – 230 с.

23.Amerson, H. Improved rooting of western white pine tissue culture produced shoots / H. Amerson, R. Mott // For. Sci. – 1982. – V. 28. – P. 822-825.

24.Attree, S. M. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers / S. M. Attree, L. C. Fowke // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 1993. – V. 35. – P. 1-35.

25.Batygina, T.B. Sexual and asexual growths in reproductive systems of flowering plants / T.B. Batygina // Acta Biol. Cracow. Ser. Botanica. – 2005. – V. 47. № 1. – P. 51-60.

26.Becwar, M. R. Development and characterization of *in vitro* embryogenic systems in conifers / M. R. Becwar, S. R. Wann, M. A. Johnson et al. // Somatic Cell Genetics of Woody Plants. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. – P. 1-18.

27.Berleth, T. Embryogenesis: pattern formation from a single cell / T. Berleth, S. Chatfield // The Arabidopsis Book. Amer. Society of Plant Biol. – 2002. – P. 2-27.

28.Bicknell, R. A. Understanding Apomixis: Recent Advances and Remaining Conundrums / R. A. Bicknell, A. M. Koltunow // The Plant Cell. – 2004. – V. 16. – P. 228-245.

- 29.**Bonga, J.M. The effect of various culture media on the formation of embryo-like structures in cultures derived from explants taken from mature *Larix decidua* / Bonga, J.M. // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2004. – V. 77. P. 43-48.
- 30.**Bonga, J. M. Cell and tissue culture in forestry / J. M. Bonga, D. J. Durzan. – Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987.
- 31.**Bozhkov, P. V. A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by a withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification / P. V. Bozhkov, L. H. Filonova, S. Von Arnold // *Biotech. Bioeng.* – 2002. – V. 77. – P. 658-667.
- 32.**Campbell, M. M. Forestry's fertile recent: the application of biotechnology to forest trees / M. M. Campbell, A. M. Brunner, H. M. Jones, S. H. Strauss // *Plant Biotechnology Journal.* – 2003. – V. 1. – P. 141-154.
- 33.**Chalupa, W. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) / W. Chalupa // *Karst. Communi. Inst. For. Cech.* – 1985. – V. 14. – P. 57-63.
- 34.**Cheliak, W. M. Genetic variation in somatic embryogenic response in open-pollinated families of black spruce / W. M. Cheliak, K. Klimazsewska // *Theor. Appl. Genet.* – 1991. – V. 82. – P. 185-190.
- 35.**Clapham, D. Transformation of *Picea* species / D. Clapham, R.J. Newton, S. Sen, S. Von Arnold // In: *Molecular Biology and Woody Plants (Forestry Science)*. Kluwer Academic Publishers. – Dordrecht, 2004. – P. 105-118.
- 36.**Deutsch, F. Stable haploid poplar callus lines from immature pollen culture / F. Deutsch, J. Kumlehn, B. Zeigenhagen, M. Fladung // *Physiologia plantarum.* – 2004. – V. 120. – P. 613-622.

- 37.**Durzan, D.J. Progress and promise in forest genetics / D.J. Durzan // In: Paper Science and Technology: The Cutting Edge, 50th Anniversary. Appleton: The Institute of Paper Chemistry, 1980. – P. 31-60.
- 38.**Durzan, D. J. Growth and metabolism of cells and tissue of jack pine (*Pinus banksiana*). III. Growth of cells in liquid suspension cultures in light and darkness / D.J. Durzan, V. Chalupa // *Can. J. Bot.* – 1976. – V. 54. – P. 456-467.
- 39.**Durzan, D. J. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures / D. J. Durzan, P. K. Gupta // *Plant Science.* – 1987. – V. 52. P. 229-235.
- 40.**Filonova, L. H. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking / L. H. Filonova, P. V. Bozhkov, S. Von Arnold // *J. Exp. Bot.* – 2000a. – V. 51. – P. 249-264.
- 41.**Gane, R. Production of ethylene by some ripening fruits / R. Gane // *Nature.* – 1934. – V. 134. – P. 1008.
- 42.**Garin, E. Effect of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations E. Garin, M. Bernier-Cardou, N. Isabel, K. Klimaszewska, A. Plourde // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2000. – V. 62. – P. 27-37.
- 43.**Cairney, J. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis / J. Cairney, G.S. Pullman // *New Phytologist.* – 2007. – № 176. – PP. 511-536
- 44.**Carneros, E. Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis / E. Carneros, C. Celestino, K. Klimaszewska, Y.-S. Park, M. Toribio, J.M. Bonga // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC): Journal of Plant Biotechnology.* – 2009. – Vol. 98, №2. – PP. 165–178
- 45.**Celestino, C. Cloning stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis / C. Celestino, E. Carneros, M. Ruiz-Galea, N.

Alonso-Blázquez, J. Alegre, M. // *Toribio Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens*. – 2013. – № 105. – PP. 89-96

- 46.** Farias-Soares, F. L. The transition of proembryogenic masses to somatic embryos in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze is related to the endogenous contents of IAA, ABA and polyamines / F. L. Farias-Soares [et al] // *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014. – Vol. 36, № 7. – PP. 1853– 1865.
- 47.** Farmer, E.E. Plant biology: jasmonate perception machines / E.E. Farmer // *Nature*. – 2007. – № 448. – PP 659–660
- 48.** George, E. F. The Components of Plant Tissue Culture Media I : Macro- and Micro-Nutrients / E. F. George, M. A. Hall, G-J. de Klerk // *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. – 2008. – Vol. 1. – PP. 65-114
- 49.** Gorbatenko, O. Desiccation-tolerant somatic spruce somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*) can be produced in liquid cultures and regenerated into plantlets / O. Gorbatenko, I. Hakman // *Int. J. Plant Sci.* – 2001. – V. 162. – P. 1211-1218.
- 50.** Grove, M. D. Brassionlide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen / M. D. Grove, G. F. Spencer, W. K. Rohwedder, N. B. Mandava, J.F. Worley // *Nature*. – 1979. – V. 281. – P. 216-217.
- 51.** Hakman, I. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce) / I. Hakman, L. C. Fowke, S. Von Arnold, T. Eriksson // *Plant Sci.* – 1985. – V. 38. – P. 53-59.
- 52.** Harry, I.S. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of red spruce / I. S. Harry, T. A. Thorpe // *Bot. Gaz.* – 1991. – V. 152. – P. 446-452.

- 53.** Iraqi, D. Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development / D. Iraqi, F. M. Tremblay // *J. Exp. Bot.* – 2001. – V. 365. – P. 2301-2311.
- 54.** Klimaszewska, K. Conifer somatic embryogenesis: I. Development / K. Klimaszewska, D. R. Cyr // *Dendrobiology.* – 2002. – V. 48. – P. 31-39.
- 55.** Lelu, M.-A. Induction of somatic embryogenesis in excised cotyledons of *Picea abies* and *Picea mariana* / M.-A. Lelu, C. H. Bornman // *Plant Physiol. Biochem.* – 1990. – V. 28. – P. 785-791.
- 56.** Lelu, M.-A. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): Part 2. Control for germination and plantlet development / M. A. Lelu, C. Bastien, K. Klimaszewska, P.J. Charest // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 1994a. – V. 36. – P. 117-127.
- 57.** Lelu, M.-A. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): Part 1. Somatic embryo maturation / M. A. Lelu, C. Bastien, K. Klimaszewska, C. Ward, P. J. Charest // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 1994b. – V. 36. – P. 107-115.
- 58.** Lelu M.-A. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix* / M. A. Lelu, K. Klimaszewska, P. J. Charest // *Can. J. For. Res.* – 1994c. – V. 24. № 1. – P. 100-106.
- 59.** Lelu, M.A. Transgenic in Larch / M.A. Lelu, G. Pilate // In: *Molecular Biology and Woody Plants (Forestry Science)*. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. – P. 119-134.
- 60.** Lelu-Walter, M. A. Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction / M. A. Lelu-Walter [et el.] // *Tree genetics & Genomes.* – 2013. – Vol. 9, № 4. PP. 883-899

- 61.**Malabadi, R. B. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula* / R. B. Malabadi, J. Van Staden // *Tree Physiology*. – 2005. – V. 25. – P. 11-16.
- 62.**Minocha, C. H. Plant growth regulators and morphogenesis in cell and tissue culture of forest trees / C. H. Minocha // *Tissue culture in forestry*. – 1987. – P. 50-66.
- 63.**Misra, S. Conifer zygotic embryogenesis, somatic embryogenesis, and seed germination: biochemical and molecular advances / S. Misra // *Seed Sci. Res.* – 1994. – V. 4. – P. 357-384.
- 64.**Misra, S. Developmental gene expression in conifer embryogenesis and germination. II. Crystalloid protein synthesis in the developing embryo and megagametophyte of white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) / S. Misra, M. J. Green // *Plant Sci.* – 1991. – V. 78. – P. 61-71.
- 65.**Mulgund, G.S. Role of salicylic acid on conifer somatic embryogenesis / G.S. Mulgund, N.T. Meti, R.B. Malabadi, K. Nataraja, S. V. Kumar // *Research in Biotechnology*, – 2012. – Vol. 3, №2. – PP 57-61
- 66.**Nagmani, R. Single cell origin and development of somatic embryos of *Picea abies* (L.) Karst. (Norway spruce) and *P. glauca* (Moench) Voss (white spruce) / R. Nagmani, M. R. Becwar, S. R. Wann // *Plant Cell Rep.* – 1987. – V. 6. – P. 157-159.
- 67.**Niskanen, A.-M. Clonal variation in Scots pine (*Pinus sylvestris*) and in transgenic Silver birch (*Betula pendula*): dissertations forestales 157 / A.-M. Niskanen. - Helsinki. – 2013. – 62 p.
- 68.**Norstog, K. Experimental embryology in gymnosperms / K. Norstog // *Experimental Embryology in Vascular Plants*. Springer-Verlag. – Berlin, 1982. – P. 25-51.

- 69.**Park, Y.-S. Implementation in conifers somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirement and development considerations / Park Y.-S. // Ann. For. Sci. – 2002. – V. 59. – P. 651-656.
- 70.**Park, Y.-S. Industrial Implementation of Multi-Varietal Forestry for Spruces in New Brunswick, Canada/ Y.-S. Park, G. Adams // Vegetative Propagation & Deployment of Varieties – The Scope for Europe: Treebreedex Meeting. – 2014.
- 71.**Park, Y.-S. Multi-Varietal Forestry: a new paradigm in tree breeding and deployment through partnerships / Y.-S. Park // Treebreedex Meeting October 12-14, 2010 - Limoges, France. - 2010.
- 72.**Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods / Eds. O.L. Gamborg, G.C. Phillips. – Berlin: Springer-Verlag, 1995. – 358 p.
- 73.**Pullman, G. S. Conifer somatic embryogenesis: improvements by supplementation of medium with oxidation-reduction agents / G. S. Pullman [et al.] // Tree Physiology. – 2015. – №35. – PP. 209–224
- 74.**Pullman, G. S. Gibberellin inhibitors improve embryogenic tissue initiation in conifers / G. S. Pullman, J. Mein, S. Johnson, Y. Zhang // Plant Cell Rep. – 2005. – Vol. 23, № 9. – PP. 596–605
- 75.**Pullman, G. S. Pine somatic embryogenesis: analyses of seed tissue and medium to improve protocol development / G. S. Pullman, K. Bucalo // New forests. – 2014. – Vol. 45, № 3. – PP. 353-377
- 76.**Reynolds, T.L. Pollen embryogenesis / Reynolds T.L. // Plant molecular Biology. – 1997. – V. 33. – P. 1-10.
- 77.**Ruaud, J. N. First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies* / J. N. Ruaud, J. Bercetche, M. Paques // Plant Cell Rep. – 1992. – V. 11. – P. 563-566.
- 78.**Singh, H. Embryology of gymnosperms / H. Singh. – Berlin-Stuttgart: Gebrüder Borntraeger, 1978. – P. 187-241.
- 79.**Smertenko, A. P. Re-organization of the cytoskeleton during developmental programmed cell death in *Picea abies* embryos / A. P.

- Smertenko, P. V. Bozhkov, L. H. Filonova, S. Von Arnold, P. Hussey // *Plant J.* – 2003. – V. 33. – P. 813-824.
- 80.** Smertenko, A. P. Somatic embryogenesis: Life and death processes during apical-basal patterning A. P. Smertenko, P. V. Bozhkov // *Journal of Experimental Botany*. Vol/65№5-2014.-PP.1343-1460
- 81.** Stasolla, C. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology / C. Stasolla, L. Kong, E. C. Yeung, T. A. Thorpe // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* – 2002. – V. 38. – P. 93-105.
- 82.** Stasolla, C. The effects of polyethylene glycol (PEG) on gene expression of developing white spruce somatic embryos / C. Stasolla, L. Van Zyl, U. Egertsdotter, D. Craig, W. Liu, R. Sederoff // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 131. – P. 49-60.
- 83.** Stasolla, C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality / C. Stasolla, E. C. Yeung // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* – 2003. – V. 74. – P. 15-35.
- 84.** Statistica for windows [Computer program manual]. – Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 1999.
- 85.** Steward, F. C. Growth and organized development of cultured cells. II. Growth and division of freely suspended cells / F. C. Steward, M. O. Mapes, K. Hears // *Am. J. Bot.* – 1958. – V. 45. – P. 705-708.
- 86.** Solís-Ramos, L. Y. Somatic Embryogenesis in Recalcitrant Plants/ L. Y. Solís-Ramos [et al.] // *Embryogenesis* : Edited by Dr. Ken-Ichi Sato InTech. – 2012. – PP. 597-618.
- 87.** Tautorus, T. E. Somatic embryogenesis in conifers / T. E. Tautorus, L. C. Fowke, D. I. Dunstan // *Can. J. Bot.* – 1991. – V. 69. – P. 1873-1899.
- 88.** Thorpe, T. A. Somatic embryogenesis / T. A. Thorpe, C. Stasolla // *Current Trends in the Embryology of Angiosperms.* – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. – P. 279-336.

89. Timmis, R. Bioprocessing for tree production in the forest industry: conifer somatic embryogenesis / R. Timmis // *Biotechnol. Prog.* – 1998. – V. 14. – P. 156-166.
90. Von Aderkas, P. Comparison of larch embryogeny in vivo and in vitro / P. Von Aderkas, J. Bonga, K. Klimaszewska, J. Owens // *Woody plant biotechnology.* – New York: Plenum press, 1991. – P. 139-155.
91. Von Aderkas, P. Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. / P. Von Aderkas, R. Rohr, B. Sundberg et al. // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2002. – V. 69. – P. 111-120.
92. Von Aderkas, P. Somatic embryogenesis of western larch (*Larix occidentalis*) / P. Von Aderkas, R.G. Thompson, M. Zaki, L. Benkrima // *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Somatic Embryogenesis and Synthetic Seeds.* Springer-Verlag. – Berlin, 1995. – V. 30. – P. 378-387.
93. Von Arnold, S. Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA) / S. Von Arnold, I. Hakman // *J. Plant Physiol.* – 1988. – V. 132. – P. 164-169.
94. Von Arnold, S. Developmental pathways of somatic embryogenesis / S. Von Arnold, I. Sabala, Bozhkov P. et al. // *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* – 2002. – V. 69. – P. 233-249.
95. Walter, C. Genetic engineering of conifer for plantation forestry. *Pinus radiata* transformation / C. Walter, L.J. Grace // In: *Molecular Biology and Woody Plants (Forestry Science).* – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. – P. 79-104.
96. Webster, F. B. Propagation of interior spruce by somatic embryogenesis / F. B. Webster, D. R. Roberts, S. M. McInnis, B. C. S. Sutton // *Can. J. For. Res.* – 1990. – V. 20. – P. 1759-1765.
97. Wilson, S. M. Somatic embryogenesis in *Picea glauca* (white spruce), *P. engelmannii* (Engelman spruce) and *P. engelmannii* complex (interior

spruce) / S. M. Wilson, T. A. Thorpe // Somatic Embryogenesis in Woody Plants. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. – V. 1. – P. 37-54.

- 98.** Yeung, E. C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis / E. C. Yeung // In Vitro Embryogenesis in Plants. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. – P. 205-249.
- 99.** Yeung, E. C. The use of histology in the study of plant tissue culture systems – some practical comments / E. C. Yeung // In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant. – 1999. – V. 35. – P. 137-143.
- 100.** Yeung, E. C. Somatic embryogenesis – apical meristem formation and conversion / E. C. Yeung, C. Stasolla // Korean J. Plant Tiss. Cult. – 2000. – V. 27. – P. 253-258.
- 101.** Yeung, E. C. Apical meristem formation during zygotic embryo development of white spruce / E. C. Yeung, C. Stasolla, L. Kong // Can. J. Bot. – 1998. – V. 76. – P. 751-761.
- 102.** Zaerr, J. Action of growth regulators / J. Zaerr, M. Mapes // Tissue culture in forestry. – 1982. – P. 231-255.

Местопрорастание деревьев ели сибирской

№ дерева	Местопрорастание деревьев	Число введенных эксплантов	Инициация каллуса,%	Сохранность каллуса через 6 месяцев,%	Число эмбриогенных культур
4А	Окрестности Академгородка	25	15%	0	0
1А	Окрестности Академгородка	25	20%	0	0
7А	Окрестности Академгородка	25	25%	0	0
1Ф	Окрестности института физики им. Л. В. Киренского СО РАН	25	25%	0	0
9Ф	Окрестности института физики им. Л. В. Киренского СО РАН	25	30%	0	0
10Ф	Окрестности института физики им. Л. В. Киренского СО РАН	25	30%	0	0
6А	Окрестности Академгородка	25	70%	15%	0
ПЗ	п.Погорелка	25	30%	25%	0
7Ф	Окрестности института физики им. Л. В. Киренского СО РАН	25	30%	25%	0
М4	Микрорайон Ветлужанка	25	75%	15%	1
П2	п.Погорелка	25	50%	20%	0

Состав питательных сред, используемых в экспериментах по соматическому эмбриогенезу из зиготических зародышей ели сибирской

Компоненты среды	Концентрация элемента в среде, мг/л	
	DCR	АИ
Макроэлементы:		
NH ₄ NO ₃	400	-
KNO ₃	340	1060
CaCl ₂ · 2H ₂ O	85	-
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	570
KH ₂ PO ₄	170	150
CaCl ₂ · 2H ₂ O	740	-
CaCl ₂	-	158
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	450
Микроэлементы:		
KI	0,83	1,2
H ₃ BO ₃	6,2	8,69
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	-
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	13,05
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	0,375
CuSO ₄ · 6H ₂ O	0,025	0,160
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,0515
Железо:		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	27,8
Na ₂ · ЭДТА	37,3	37,3
Витамины и органические вещества:		
Глицин	2,0	-
Тиамин	1,0	1,0
Пиридоксин	0,5	0,5
Никотиновая кислота	0,5	0,5
Мезоинозит	200	1000
Глутамин	500	500
Гидролизат казеин	500	1000
Аскорбиновая кислота	300	400
pH	5.8	5.8

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
Гладышев М.И.
подпись инициалы, фамилия

« ____ » _____ 20 ____ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Разработка биотехнологии получения эмбрионных культур ели сибирской
in vitro

06.04.01.Биология

06.04.01.02 Физиология растений

Научный руководитель И.Н. Третьякова проф., д-р.биолог.наук. Третьякова И.Н.
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник И.С. Шевелева 8.07.20 Шевелева И.С.
подпись, дата инициалы, фамилия

Рецензент _____ д-р.биолог.наук Антонова Г.Ф.
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Красноярск 2020