

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
институт

Кафедра водных и наземных экосистем  
кафедра

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ подписью \_\_\_\_\_ инициалами, фамилией

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

Индукция соматического эмбриогенеза *P. sibirica* в  
условиях культуры in vitro

Тема

Руководитель	_____	_____	<u>Т.И. Голованова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Руководитель	_____	_____	<u>И. Н. Третьякова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>А. В. Курилина</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия

Красноярск 2021

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 Обзор литературы .....	6
1.1 <i>P. sibirica</i> как объект исследования.....	6
1.1.1 Общая характеристика <i>P. sibirica</i> .....	6
1.1.2 Акселерация генеративного развития сосны сибирской .....	8
1.2 Зиготический эмбриогенез хвойных видов .....	10
1.3 Соматический эмбриогенез в культуре <i>in vitro</i> .....	14
1.4 Процесс и этапы соматического эмбриогенеза.....	19
1.4.2 Пролиферация .....	21
1.4.3 Созревание .....	21
1.4.4 Прорастание.....	22
1.5 Особенности соматического эмбриогенеза хвойных на примере <i>Pinus sibirica</i> .....	23
1.6 Роль состава питательной среды и условий культивирования в процессе индукции соматического эмбриогенеза.....	25
2 Объект и материалы исследования .....	29
2.1 Объект исследования.....	29
2.2 Материалы исследования.....	29
2.3 Процесс подготовки и стерилизации .....	29
2.4 Процесс приготовления питательных сред и введение эксплантов в культуру <i>in vitro</i> .....	33
2.5. Цитологический анализ и статистическая обработка данных.....	37
3 Результаты и обсуждения результатов .....	39

3.1 Получение каллусных культур из зиготических зародышей сосны сибирской.....	39
3.2 Влияние питательной среды на развитие эмбриогенного каллуса.....	40
3.3 Влияние генотипа дерева-донора.....	42
3.4 Статистический анализ полученных данных .....	42
3.4 Цитологический анализ .....	44
4 Заключение и выводы .....	46
Список литературы .....	47

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность.** Хвойные деревья - неотъемлемая часть жизни человека и жизненно важный компонент лесного биоразнообразия. В частности, хвойные деревья являются возобновляемыми источниками продуктов питания, кормов, дров, древесины и других ценных недревесных продуктов. Мировой спрос на древесину повышается каждый год и для того чтобы снизить нагрузку на существующие леса, необходимы глобальные усилия. Лесные плантации могут стать основным источником древесных материалов в ближайшем будущем. (Gupta. 2004; Malabadi R. et al. 2007c; Malabadi R. et al. 2008).

Сосна сибирская (*Pinus sibirica* Du Tour) – это ценная хвойная порода, произрастающая на территории России и имеющая широкий естественный ареал. Несмотря на широкую географию распространения, кедр сибирский кедр тяжело выращивать для промышленных лесосырьевых плантаций ввиду особенностей половой репродукции данного вида: семена кедровой сосны полиэмбриональны, и в одном только мегagamетофите может располагаться до шестнадцати зародышей. Такие полиэмбриональные семена требуют продолжительной стратификации, занимающей около полугода (Третьякова, 2017). В настоящее время вид также считается уязвимым вследствие лесных пожаров, антропогенного фактора, а также климатических изменений, происходящих во внешней среде.

Достижения в биотехнологии хвойных пород открывают новые возможности в области вегетативного размножения и генной инженерии. Разработка методов микрклонального размножения имеет множество потенциальных применений. В настоящее время многими учеными соматический эмбриогенез уже признается одним из наиболее перспективных направлений в области биотехнологии лесных видов деревьев (von Arnold et al., 2002, Klimaszewska 2007, Park 2013). Соматический эмбриогенез основан на тотипотентности соматических клеток растений - способности в полной мере реализовать генетическую информацию и давать начало целому организму.

Благодаря своей эффективности в регенерации растений соматический эмбриогенез стал незаменимым инструментом для ускорения развития разновидностей деревьев и их внедрения.

На данный момент в международной науке известны случаи успешного применения соматического эмбриогенеза и получения эмбриоидов более 30 видов рода *Pinus*. В нашей стране первые исследования данной проблемы и применения соматического эмбриогенеза к размножению хвойных пород начали проводить в Красноярском Институте леса, Сибирском отделении РАН (Третьякова, 2009).

В данной работе исследуется процесс инициации соматического эмбриогенеза сосны сибирской кедровой и влияние гормонов растительного происхождения на получение эмбриогенных каллусов в условиях *in vitro*. Следует отметить, что ранее подобные сравнения влияния гормонов в различных концентрациях на инициацию соматического эмбриогенеза в условиях культуры *in vitro* не проводилось.

Целью данной работы являлось получение эмбриогенных каллусов и изучение влияния гормонов ауксиновой и цитокининовой природы на инициацию и пролиферацию эмбриогенных культур *P. Sibirica*.

Задачи исследования:

- 1 Изучить процесс инициации и получения эмбриогенных культур из эксплантов различных генотипов.
- 2 Получить маркёры эмбриогенных каллусов на морфологическом и цитологическом уровнях.
- 3 Установить связь между концентрацией гормонов ауксиновой и цитокининовой природы и получением эмбриогенных каллусов

## 1 Обзор литературы

### 1.1 *P. sibirica* как объект исследования

#### 1.1.1 Общая характеристика *P. sibirica*

*Pinus sibirica* Du Tour – представитель рода *Pinus*, самого многочисленного среди отдела *Pinophyta*. Согласно современной классификации (Gernandt D. S. et al, 2009) род *Pinus* включает 2 подрода: *Strobus* и *Pinus*. Сосна сибирская относится к подроду *Strobus* Lemmon, секции *Quinquefolius* Duhamel и подсекции *Strobi* Loudon, включающую в себя 21 вид, в том числе *Pinus sibirica* Du Tour – сосна сибирская кедровая.

Сосна сибирская является важной лесообразующей породой, представленной в Западной и Восточной Сибири, а также Монголии, на Алтае и Урале. Сосну зачастую относят к эдификаторам растительного покрова.

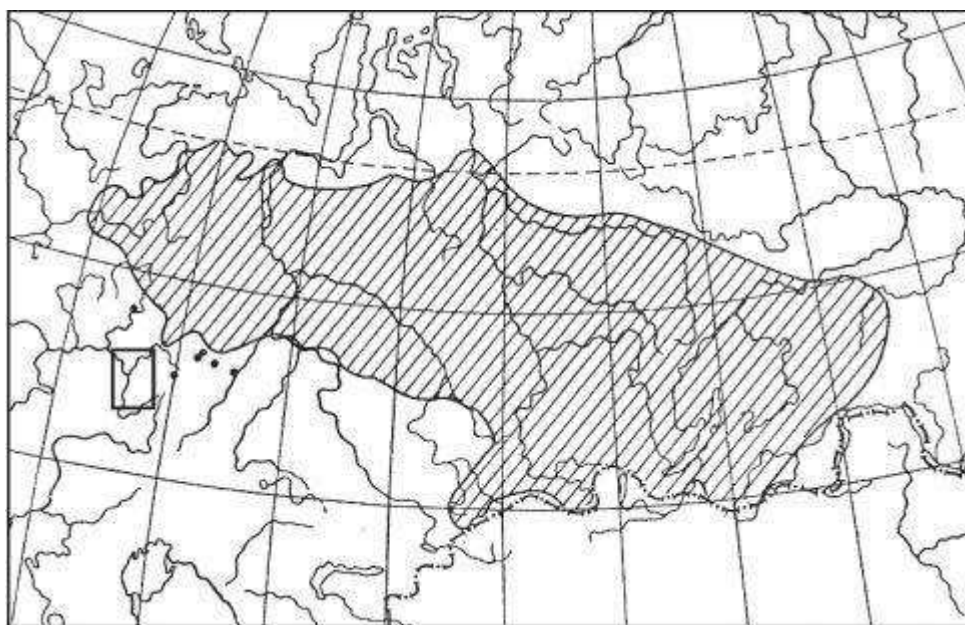


Рисунок 1 – Ареал сосны сибирской (Ареалы деревьев..., 1977)

Сосна сибирская – вечнозеленое однодомное дерево до 40-45 м высотой с диаметром ствола до 1-1,5 (2) м. При этом, деревья могут повышать относительную высоту при ухудшениях условий роста. Это объясняется

приспособлением растений к изменившимся неблагоприятным условиям, вызывающим повышенный рост (Овчинникова, 2006). Однолетние побеги отличаются ржаво-волосистой или же желтовато-коричневой окраской. Немаловажной особенностью является длинная (5-12 см), трехгранная в разрезе хвоя, собранная в пучках по 5 хвоинок, которая может сохраняться на ветвях до 5-6 лет. Цвет хвои темно-зеленый с сизым налетом. Рост хвои у кедровых сосен связан с погодой (преимущественно с температурой) текущего года (Кузнецова, 2009). Данный вид сосны имеет мощную корневую систему, представленную стержневым корнем и корневыми волосками с развитой микоризой. Ветвление мутовчатое, в наиболее благоприятных условиях крона узкояйцевидной формы, при разреженном стоянии крона приобретает широкояйцевидную форму, на верхней границы распространения в горах встречается форма флага (Горошкевич, 2000).

Можно выделить следующие типы лесов, содержащих сосну кедровую: зеленомошный, осоковый (низкотравный), высокотравный, травяно-болотный, лишайниковый, сфагновый (Соколов, 1977).

Широчайший типологический спектр - в средней тайге, основной лесобразующий вид здесь - кедр сибирский. На границе между центральной и северной частями Западно-Сибирской равнины сибирский кедр встречается как примесь, особенно во влажных, заболоченных районах (Жук, 2010). В подтайге и южной тайге сосна сибирская встречается в высокотравных и низкотравных типах лесов, в южной же части хребта сосна представлена вторичным компонентом дендроценозов и встречается в сосновых лесах и болотах.

Природные популяции сосны сибирской встречаются на северо-западном склоне западного Саяна, где данный вид является основным видом растительного покрова. Верхняя граница сибирской сосны находится на высоте 1800-2000 метров, на высоте 1700-1750 метров образует субальпийские кедровые леса. В подножия гор встречается редко и чаще встречается в долинах рек.

Сосна кедровая - анемофильный вид. Мужские колоски или пыльники

(микростробилы) красного цвета образуются у основания надземной части. Женские стробилы (макростробилы) пурпурные, сформированы в количестве 2-7 штук на концах побегов. Развитие женских генеративных органов длится три года. Длина шишек кедра сибирского в естественном ареале и в посевах варьируется от 30 до 50 до 130 мм, ширина от 30 до 80 мм; однако типичный диапазон составляет от 50 до 80 мм для длины колбочек и от 40 до 60 мм для ширины (Путенихина, 2014).

Шишки сосны сибирской отличаются характерной чертой – под семенными чешуйками образуется лишь одно развитое семя, вместо обычных двух. Помимо этого, встречается явление, получившее название «череззерница», когда при образовании двух семяпочек наблюдается развитии только одной из них. Данное явление носит свойства дефекта и для сбора урожая не годится. Причиной являются, скорее всего, генетические точечные мутации.

Вид сибирской сосны уязвим к вредителям и болезням. Встречаются многочисленные данные о значительных поражениях популяций сосны сибирским шелкопрядом, хермесом, а также шишковой огневкой. Также были отмечены грибные и бактериальные болезни: фузариум, корневая губка, бактериальная водянка (Кривец, 2009).

### **1.1.2 Акселерация генеративного развития сосны сибирской**

В горах южной Сибири периодически появляются формы вида *Pinus sibirica*, отличающиеся уникальным циклом развития женской шишки. У таких форм созревание женской шишки происходит всего за два месяца вместо положенных полутора лет (14–15 месяцев); кроме того, развившиеся таким образом шишки дают начало деревьям, которые не просто не уступают по развитию обычным, но и превосходят их по развитию кроны, отличаясь более интенсивным ростом. Такое явление называется акселерацией генеративного развития. Данные особи расцениваются как гибриды, которые обладают



свойством гетерозиса. Помимо этого, была отмечена склонность к «апомиксису» (Минина Ларионова 1979; Третьякова, 1990; Третьякова и др., 2003).

Данные особи привлекают внимание ученых, которые пытаются выяснить причины возникновения подобного явления. В целом, авторы склоняются к мнению о прогрессивных эволюционных чертах деревьев-акселерантов (Минина, Ларионова, 1979). Среди возможных причин возникновения в природе таких гибридов с однолетним циклом развития выделяют подходящее физиологическое сочетание генотипов родительских особей, идеально подошедших к условиям окружающей среды. Из этого следует, что данные гибридные особи являются более эволюционно прогрессивными, демонстрируя положительный гетерозис и выделяясь среди прочих особей Западно-Саянской популяции кедровой сосны

Ускорение генетического роста у изученных форм сосны сибирской обычно проявляется в самом раннем развитии гаметофитов. Процесс образования гамет проходит за срок от полутора до двух месяцев, а не за год. Через неделю после гаметогенеза развиваются архегонии, и сразу после опыления за 2-2,5 месяца созревают ооциты. При этом немедленного оплодотворения не происходит, поскольку пыльцевые трубки растут медленно. Иногда такие особи демонстрировали гаплоидное деление яйцеклеток, из-за чего формировался пре-эмбрион; тем не менее, зародыш у сосен с акселерацией генеративного развития найти не удалось. Это свидетельствует о том, что естественное воспроизводства уникальных видов сибирского кедра половым путём на данном этапе невозможно.

Свидетельства ускоренного развития гаметофитов и в целом женских шишек периодически обнаруживаются у деревьев *Pinus sibirica* в Западном Саяне. Эти формы деревьев образуют женские шишки и семена за один вегетационный период вместо обычных двух. Ускорение происходит за счет снижения свободной ядерной стадии развития женского гаметофита, которая занимает 30-40 дней (как у *Larix*, *Picea*, *Abies*). Тем не менее, оплодотворение

яйцеклеток у особей *Pinus sibirica* с ускоренным генеративным циклом не происходит из-за несовместимости мужских и женских гамет (Третьякова, 1990), так как обычно такие яйцеклетки семяпочек подвергаются гаплоидному делению, т.е. вступают на путь партеногенеза. Иногда отмечается формирование проэмбрио, но развитие зародыша не совершается. Семена без зародышей при этом образуют развитый эндосперм. Исследование физиологических и биохимических свойств аномальных особей *Pinus sibirica* показали, что их органы характеризуются высоким физиолого-биохимическим потенциалом, который проявляется в аминокислотном, гормональном и углеводном обмене (Минина, Ларионова, 1979).

## **1.2 Зиготический эмбриогенез хвойных видов**

Эмбриогенез хвойных включает в себя процессы роста и дифференциации, происходящие от момента оплодотворения до образования семени. Учёные в основном делят эмбриогенез на две основные фазы: морфогенную и фазу созревания, во время которой происходят метаболические модификации, чтобы подготовить эмбрион и обеспечить питательными веществами, необходимыми для раннего роста после прорастания.

Зародыши хвойных растений возникают в результате единственного оплодотворения в семяпочке, образуя диплоидную зиготу, которая продолжает развитие внутри гаплоидного женского гаметофита. Если сравнивать с покрытосеменными, то эмбрионы данной группы растений развиваются после двойного оплодотворения, когда один сперматозоид оплодотворяет гаплоидную яйцеклетку с образованием диплоидной зиготы, а второй сперматозоид сливается с двумя полярными ядрами в большой центральной клетке, создавая триплоидное ядро, которое станет эндоспермом.

При этом важно отметить, что зародыш хвойных деревьев развивается внутри женского гаметофита; в семенах хвойных нет эндосперма (Singh, 1978). Формирование женского гаметофита у хвойных растений начинается примерно

на полпути до оплодотворения, тогда как у покрытосеменной эквивалентной ткани эндосперма развивается только после оплодотворения (Ohad et al., 1996; Grossniklaus et al., 1998; Luo et al., 1999).

При оплодотворении двух и более яйцеклеток происходит образование нескольких эмбрионов, полученных от разных опылителей, в одном мегаспорофите (Третьякова, 2009)

Зиготический эмбриогенез делится на три доминирующие фазы: проэмбриогенез, ранний эмбриогенез и поздний (Singh, 1978). Данные о связи между размером зародыша и продолжительностью развития представлены на рис.2.

Проэмбриогенез происходит от первого деления вплоть до до удлинения суспензора. Для того чтобы более подробно описать процесс проэмбриогенеза, необходимо подчеркнуть, что он происходит внутри архегония. Ядро яйцеклетки делится дважды, образуя четыре ядра, которым необходимо опуститься в основание проэмбрио. После этого каждое из ядер делится вертикально, что приводит к образованию двух одинаковых ярусов клеток (Misra, 1994). Далее ярусы делятся снова, формируя четыре уровня: два эмбриональных, суспензорный и верхний ярус (von Aderkas et al., 1991). Таким образом, эмбриогенез хвойных проходит несколько этапов ядерного дублирования без цитокинеза, чтобы вступить в свободную ядерную фазу после оплодотворения, сопровождаемую клеткуляризацию с образованием двух ярусов клеток и восьмиклеточного проэмбрио.

Всё это приводит к тому, что получившийся 16-клеточный проэмбрио содержит в себе одинаковые клетки, которые отличаются лишь местом расположения относительно друг друга. Суспензорный ярус клеток, который является третьим, удлиняется и проталкивает верхний ярус в ткань гаметофита. На этом стадия проэмбриогенеза оканчивается и начинается стадия раннего эмбриогенеза.

Таблица 1 – Стадии эмбриогенеза зиготических зародышей в разные периоды времени (Третьякова, 2009).

Стадия развития	Размер зародыша	Продолжительность развития после оплодотворения (нед.)
Оплодотворение: Проэмбрио	0	1
Ранний эмбриогенез: -кливаж	4 – 16 клеток	2
-глобулярное эмбрио	0,5 – 1 мм	4-5
Поздний эмбриогенез: стадия торпедо	1,5 – 2 мм	6
-предсемядольная стадия	3 мм	7-8
-формирование оси зародыша	4 мм	8-9
Зародыш в период созревания шишки	5-10 мм	10-12
Зрелый зародыш (окончание периода стратификации)	11-12 мм	16-17

Затем наступает стадия раннего эмбриогенеза, которая длится до установления корневой меристемы. Во время раннего эмбриогенеза наблюдается удлинение клеток первичного суспензора (von Aderkas et al., 1991).

Данный рост идет с неодинаковой скоростью, наблюдается кливаж, свойственный представителям семейства *Pinaceae*, на четыре независимые друг от друга единицы. Образуются эмбриональные глобулы, на конце которых

происходит деление и отмирание эмбриональных трубок, позволяющий продвигаться вглубь тканей мегагаметофита. Во время данного процесса на месте старой эмбриональной трубки, которая претерпевает дегенерацию, появляется новая.

Полиэмбриония является характерным свойством голосеменных растений и выделяется два вида подобного явления: простая полимэмбриония и кливажная. В случае простой полиэмбрионии происходит оплодотворение нескольких яйцеклеток. Это было показано на примере представителей рода *Picea* (Chowdhary, 1962), где каждый проэмбрио генетически отличается, так как является результатом оплодотворения гамет из разных пыльцевых зерен.

Во время кливажной полиэмбрионии отмечается образование генетически одинаковых эмбрио, что является следствием деления первого эмбрио. Род *Pinus* характеризуется именно кливажной полиэмбрионией. (Chowdhary, 1962; Misra, 1994). Полиэмбриония приводит к конкуренции между зародышами, из-за чего выживает только наиболее развитый. Что касается остальных, то они дегенерируют (Gupta, Grob, 1995).

После того как происходит заложении апикальных меристем побега и корня в эмбриональной массе клеток наступает переход к стадии позднего эмбриогенеза. В дальнейшем будет наблюдаться гистогенез, а также накопление питательных веществ в клетках (Третьякова, 2008). Под гистогенезом в данном случае понимается формирование меристем, так как в это время происходит интенсивное образование меристем корня, а также побега, вплоть до формирования полноценного зародыша с видимыми развитыми семядолями (Singh, 1978; Третьякова, 1990). Во время позднего эмбриогенеза зародыш растет до созревания эмбриона: гипокотиль и семядоли удлиняются, происходит образование сосудистой ткани. У зрелого зародыша можно наблюдать семядоли, центральный цилиндр, апекс побега, корня и корневой чехлик, у которого внутри формируется колонка (von Aderkas et al., 1991).

Зародыши хвойных растут и развивается в «коррозионной полости»

внутри женского гаметофита. Запрограммированная смерть женских мегagamетофитовных клеток, примыкающих к коррозионной полости, обеспечивает питательные вещества, которые поглощаются растущим эмбрионом, который расширяется так, что эмбрион всегда тесно прилагается к окружающей поверхности мегagamетофита.

### **1.3 Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro***

Среди живых организмов только растения способны производить морфологически устойчивые и жизнеспособные эмбрионы, которые впоследствии способны образовывать целые растения, из недифференцированных соматических клеток. Впервые соматические зародыши были получены из клеток моркови более 60 лет назад (Steward et al., 1958), после чего данный потенциал был признан и многочисленно использован для регенерации растений из клеточных культур, а также как потенциальная модель для изучения ранних регуляторных и морфогенетических событий в эмбриогенезе растений.

Анализ литературы показал, что за последние несколько лет произошел резкий подъем интереса к процессу соматического эмбриогенеза. Значительно выросло число видов, которые теперь могут быть регенерированы из клеточных культур в целые растения посредством данного метода. Встречаются сотни исследований, описывающих специфические манипуляции, необходимые для влияния на процесс развития соматических зародышей и индукции соматического эмбриогенеза различных сельскохозяйственных, садоводческих и лесных видов растений.

Соматический эмбриогенез - это процесс развития, посредством которого соматическая клетка или группа соматических клеток дает начало зародышу, способного развиться в единое целое растение (Белоруссова, 2008). Данный процесс основан на свойстве тотипотентности клеток. Соматический эмбриогенез может быть инициирован несколькими путями: Прямой

эмбриогенез из отдельных клеток через тотипотентное зиготическое состояние. Данный процесс происходит без этапа каллусообразования и эмбрионид развивается из проэмбриогенных и детерминированных клеток. Непрямой эмбриогенез происходит от кластера эмбриогенных клеток, составляющих каллус. Образуются проэмбриональные структуры, а затем и биполярные эмбриониды. Здесь уже главную роль играют «индуцированные эмбриогенные детерминированные клетки».

Переход от соматического к эмбриогенному состоянию предполагает под собой согласованные изменения на нескольких уровнях, производимые экзогенными регуляторами роста растений (Klimaszewska K. et al 2007). Впоследствии регуляторы роста растений, наравне с физическими и химическими обработками, регулируют переход между каждой стадией эмбрионального развития вплоть до превращения зародыша в растения (Sharp et al., 1980).

Соматический эмбриогенез представляет собой эмбриоподобные структуры, или эмбриониды - зачатки растений, из отдельных соматических клеток или их групп. Одновременно с этим эмбрионид развивается под влиянием имеющейся у него гормональной регуляторной системы, изначально представляя собой целый организм с побегами и корнями. В процессе своего морфогенеза эмбриониды проходят следующие стадии развития: шаровидную, сердцевидную и торпедообразную.

События оплодотворения и последующего развития эмбриона обычно происходят глубоко в тканях матери. Ранний эмбрион крошечный и окружен как эндоспермом, так и материнскими клетками. Хотя морфологическое описание развития эмбриона широко регистрировалось с помощью микроскопии, молекулярный и биохимический анализ раннего эмбриогенеза все ещё затруднен из-за физической недоступности. Как следствие, не так много известно о генах, участвующих в раннем эмбриогенезе высших растений, и еще меньше известно об их регуляции.

Соматический эмбриогенез в настоящее время является крайне

популярным методом культивирования растений. Этот факт подтверждается тем, что более половины опубликованных работ по выращиванию растений *in vitro* приходится на долю использовавших соматический эмбриогенез в своих экспериментах (Третьякова, Пак, 2028). Способ микрклонального размножения – эффективный метод быстрого и массового воспроизводства, позволяющий воспроизводить генетически улучшенные варианты. Соматический эмбриогенез дает большое преимущество перед другими методиками в технологии в лесной промышленности и лесовосстановлении. Соматический эмбриогенез имеет множество применений, таких как:

- использование в качестве модельной системы в эмбриологических исследованиях и исследованиях клеточных, молекулярных и генетических механизмов, участвующих в приобретении компетенции для соматического эмбриогенеза или дифференцировки клеток;
- масштабное размножение избранных генотипов;
- производство синтетических семян;
- консервация зародышевой плазмы;
- исследование методов регенерации, что позволяет использовать биотехнологические методы, такие как генетическая трансформация, соматические вариации, мутагенез *in vitro*, производство гаплоидов и двугаплоидные растения, соматическая гибридизация и селекция *in vitro* против биотических или абиотических стрессогенных агентов (Шестибратов, 2008)..

Таким образом, соматический эмбриогенез является мощным средством для использования в условиях *in vitro*.

К преимуществам соматического эмбриогенеза, делающим его мощным инструментом для размножения практически любых видов растений относят:

- Ускоренный рост эмбриональной массы клеток на стадии пролиферации, что позволяет получать новые особи намного быстрее, сравнивая, например, с методом микрочеренкования;
- Возможность криоконсервация эмбриотического каллуса, что



обеспечивает сохранение жизнеспособности на протяжении длительного промежутка времени;

- Точное воспроизведение уникального генетического материала, что является преимуществом перед половым размножением (Шестибратов, 2008).;

- Возможность использования клонов для генетических исследований, генетической оценки селекции деревьев или изучения фенотипической изменчивости (Pullman G. S., Bucalo K, 2014);

- Проверка стабильности селекционных материалов на различных средах, имитирующих среду коммерческого использования. в особенности «элитных» генотипов (Pullman G. S., Bucalo K, 2014);

- Возможность воспроизводить равномерно растущий клоновый материал, делая его управление более предсказуемым, а также производство однородного и более качественного продукта (древесина или волокно), что может оказать важное влияние на затраты и переработку материалов (Pullman G. S., Bucalo K, 2014);

Однако, при имеющихся преимуществах метод соматического эмбриогенеза имеет ряд преград на пути к обширному использованию культур клеток в селекции. Как основную сложность отмечают низкую регенерационную способность большинства исходных линий и сортов растений. Установлено, что морфогенетический потенциал культивируемых тканей обуславливается совокупностью факторов: органом, из которого выделен эксплант; условия прорастания растений-доноров; условиями культивирования; генотипом; составом используемых питательных сред. Сложность заключается в том, что каждому виду и даже разновидности необходимы свои условия для восстановления растений. Например, начало соматического эмбриогенеза у большинства сосен ограничивается введением эксплантов в первые несколько недель развития зародыша до появления зачатка семядолей. .

На данный момент осуществление микрклонального размножения

растений через метод соматического эмбриогенеза имеет ряд проблем, среди которых: необходимость минимизировать влияние генетического материала образца на эффективность инициации эмбриогенеза; создание и поддержание наиболее благоприятных условий созревания зародышей для увеличения доли проросших экземпляров; сама инициация эмбриогенеза из ткани взрослых, зрелых растений. Ещё одна немаловажная проблема — улучшение качественных и количественных характеристик развивающихся из проэмбриональной массы эмбриоидов. На пути к созреванию проэмбриональные массы претерпевают множество изменений, которые можно охарактеризовать в три этапа. Толчком к началу данной трансформации является изменение содержания фитогормонов экзогенного действия: цитокинины и ауксины должны быть заменены на абсцизовую кислоту. Тем не менее, одной только замены недостаточно для улучшения качества эмбриоидов: помимо изменения экзогенных фитогормонов, необходимо подобрать наиболее благоприятные характеристики среды, среди которых: её осмотический потенциал, концентрация и состав питательных веществ (сахаров), и присутствие этилена ( klimaszewska et al., ).

Несмотря на вышеперечисленные трудности, соматический эмбриогенез стал основным способом вегетативного размножения, поскольку соматические эмбрионы развивают как апикальную, так и корневую меристему. Эмбриогенный каллус является основой для крупномасштабного регенерирования растений и служит важным материалом для экспериментов в области генетической трансформации, а также является идеальной системой для изучения целостности одноклеточной дифференцировки и проявления тотипотентности (Lelu-Walter et al.2018).

Первым древесным растением, полученным методом соматического эмбриогенеза, является *Santalum album* (Rao, 1965), а первые зрелые соматические зародыши хвойного дерева *Picea abies*, способные к прорастанию, были получены в середины 1980х годов.

В настоящее время перечень стран, активно использующих метод

соматического эмбриогенеза для лесовыращивания велик: Япония, Юго-Восточная Азия (Индия, Индонезия), Северная и Южная Америка (Канада, США, Бразилия), Западная Европа (Чехия, Финляндия, Польша, Франция) (Klimaszewska K. et al. 2007).

#### **1.4 Процесс и этапы соматического эмбриогенеза**

Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* - это многоступенчатый процесс, который проходит стадию проэмбрионального развития, раннего и позднего эмбриогенеза и заканчивается формированием биполярной структуры эмбриона, несущего на одном конце семядольный гипокотиль и на другом - зародышевый корень. Процесс соматического эмбриогенеза хвойных проходит через четыре этапа: инициация, пролиферация, созревание и прорастание.

##### **1.4.1 Инициация соматического эмбриогенеза**

Для процесса инициации соматического эмбриогенеза обычно используются как незрелые мегагаметофиты, так и извлечённые незрелые зиготические зародыши. В целом, авторы сходятся во мнении, что семена с незрелыми зародышами демонстрируют более высокие адаптационные свойства, т.е. способность приспосабливаться к самым неблагоприятным условиям. Таким образом, именно с неразвитыми зародышами был достигнут наибольший успех.

Для начала процесса инициации, оплодотворенные мегагаметофиты извлекаются из предварительно стерилизованных семян и помещаются на чашки Петри, содержащие питательную среду. Состав культуральной питательной среды является существенным фактором в методике соматического эмбриогенеза, так как он заменяет содержимое мегагаметофита. Для инициации соматического эмбриогенеза видов рода *Pinus* наиболее часто

применяемыми являются среды Litvay , DCR, и MSG.

Для инициации соматического эмбриогенеза недостаточно только питательной среды, её необходимо «обогатить» регуляторами роста растений. Для таких целей используются гормоны растительного происхождения, ауксиновой и цитокининовой природы. Что касается деревьев рода *Pinus*, то здесь это анализ литературы показал, что это в первую очередь 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота (2,4 - Д) и 6-бензиладенинпурин (6 - БАП).

Для проверки результата процесса инициации необходимо оценить внешние морфологические характеристики каллуса. Индикатором успешной инициации является образование белого или прозрачного волокнистого эмбриогенного каллуса, представляемого собой эмбрионально-суспензорную массу и состоящего из отдельных клеток, клеточных скоплений, в некоторых случаях также ранних соматических зародышей, (Klimaszewska, Cyr, 2002; von Arnold et al., 2002). Неэмбриогенную ткань в данном случае можно отличить по коричневому цвету и твердой структуре.

Внутри эмбрионально-суспензорной массы выделяют два варианта клеток, отличающихся по своей морфологии. Первые – маленькие, плотные цитоплазматические клетки, они представляют собой эмбриональную головку волокнистого зародыша. Второй тип – удлиненные клетки с большими вакуолями, которые формируют суспензор. Необходимо отметить, что механизм формирования эмбрионально-суспензорной массы из эксплантов хвойных растений до сих пор остаётся неясен. Однако существуют предположения, объясняющие процесс формирования соматических зародышей (Третьякова, Минеев .2021);. К ним относятся:

– кливажная полиэмбриония, когда путем умножения и «отпочкования» эмбриональных клеток образуются соматические зародыши в случае сосны и пихты;

– соматические зародыши формируются благодаря делению клеток, расположенных в суспензоре;

– процесс образования соматических зародышей начинается после асинхронного деления отдельной клетки эксплантов с дальнейшим умножением;

Во время данной стадии культуры не требует света и процесс происходит в темноте при температуре 24-25 С.

После завершения этапа инициации зародыши перемещаются на среду с пониженным содержанием гормонов.

### **1.4.2 Пролиферация**

Стадия пролиферации происходит на среде с низким содержанием гормонов, при этом концентрация именно цитокининов снижается чаще всего. Эмбриональную суспензионную массу необходимо пересаживать каждые две-три недели, удаляя при этом коричневую неэмбриогенную ткань, которая образует каллус, не участвующий в процессе соматического эмбриогенеза. Этот процесс во время отбора важен для сохранения эмбриогенной ткани по мере старения культуры.

Данный этап, как и этап инициации, проходит в темноте при температуре 24-25°С.

### **1.4.3 Созревание**

Получившейся эмбрионально-суспензорной массе необходима дальнейшая дифференциация и образование семядолей, зародышевого корешка и прочих органов, и тканей, наблюдаемых у зрелых и развитых зародышей. Для данного процесса необходим этап созревания соматических зародышей. Для перехода от процесса пролиферации к созреванию необходима культивация без использованием гормонов, однако с добавлением активированного угля. Данная подготовка занимает 3-7 дней. Активированный уголь в данном случае отвечает за контроль гормонального баланса и адсорбцию нежелательных

компонентов.

Уровень солей, сахара, микроэлементов также является пониженным. Культуры необходимо хранить в темноте или же на свету с низкой интенсивностью, но установленной температурой строго 22-24°C. Необходимым условием является также повышенная плотность питательной среды, которая достигается при высокой концентрации желирующего компонента. Этап созревания длится в течение 7-15 недель и не требует пересадок на свежую среду.

#### **1.4.4 Проращание**

Этап проращания является итогом проведенной работы и завершением соматического эмбриогенеза. Как и в предыдущем случае, культуры находятся на средах без регуляторов роста и пониженным содержанием микро- и макроэлементов. Также повторно может быть использован и активированный уголь. Его применяют для удаления остаточных гормонов. В целом, интенсивность проращания отличается не только у разных видов, но и внутри популяции, в зависимости от генотипа отдельной особи, что значительно усложняет задачу.

Было показано, что высушивание зародышей перед проращанием, прямое или косвенное воздействие эктомикоризного гриба *Psolithus tinctorius*, а также стратификация – выдерживание при 4°C в течение нескольких недель, увеличивает проращание соматических зародышей.

Процесс соматического эмбриогенеза можно считать успешным и завершенным при появлении корешка. Однако придаточное укоренение побегов часто неэффективно из-за различных проблем, таких как недостаток корней и прекращение их роста, которые ограничивают применение вегетативного размножения у некоторых видов хвойных пород. На случайное укоренение побегов влияют многие факторы, включая физические и химические, такие как регуляторы роста растений, углеводы, качество света,

температура и субстраты для укоренения или среды. Были проведены исследования, демонстрирующие влияние также биологических факторов, стимулирующие укоренение. К таким факторам относят прививки *Agrobacterium rhizogenes*, ризобактерии, способствующие росту растений, и другие эндофиты, а также микоризные грибы, которые, как было обнаружено, стимулируют случайное укоренение. Эти микроорганизмы могут способствовать не только развитию придаточных корней, но также помочь в защите хвойных растений от патогенных микроорганизмов, облегчить акклиматизацию и пересадку, а также внести вклад в создание более устойчивых, свободных от химикатов лесов.

Как правило, клоновые деревья имеют единообразие в форме и росте (Timmis 1998). В течение 12-16 недель можно ожидать удлинение эпикотилия и появление хвои, длительность также варьирует зависит от вида растения. После достижения желаемого размера, проростки необходимо перенести в почву в теплицу для акклиматизации. После периода роста в теплице растения пересаживаются в лесные участки или питомники для дальнейшего выращивания и использования.

### **1.5 Особенности соматического эмбриогенеза хвойных на примере *Pinus sibirica***

Первые работы, посвященные исследованию соматического эмбриогенеза хвойных растений, появляются в середине 80-х годов прошлого столетия. Впервые этот процесс описан ещё 1985 году канадскими учёными Ларри Фоуком и Ингером Хакманом. В своей работе учёные рассматривали процесс развития образца канадской сизой ели (*Picea glauca*) из зиготических зародышей. В том же году и институте Р. Нагамани и Дж. М. Бонга проводили похожую работу, однако, рассматривая формирование европейской лиственницы (*Larix decidua*) уже из мегагаметофитов. В данном случае зародыши, полученные из соматических клеток, были способны к прорастанию

и развитию во взрослое растение-регенерант, в чём были аналогичны зиготическим зародышам (Lelu et al., 1994).

На данный момент уже имеются растения-регенеранты, полученные из эмбриоидов методом микроклонального размножения. Среди таких растений разные представители хвойных родов *Pinus* (30 видов), *Picea* (13 видов), *Abies* (4 видов и 2 гибридов) и *Larix* (6 видов). Для индукции соматического эмбриогенеза хвойных пород используются разнообразные составляющие растений, среди которых: зародыши (как зрелые, так и не созревшие), мегагаметофиты и отдельные органы растений (гипокотили или семядоли). Помимо этого, встречаются исследования, в которых в качестве источника соматических клеток используют хвою и даже вегетативные побеги зрелых деревьев (Митрофанова, сом жмбриогенз как система).

За последние 25 лет был достигнут огромный прогресс в разработке систем для индукции и развития соматических зародышей хвойных пород. Это стало возможным благодаря совершенствованию условий культивирования и понимания физиологических и биохимических факторов, играющих важную роль во время эмбриогенеза *in vivo*. В частности, это исследования, посвященные абсцизовой кислоте (АБК) или влиянию полиэтиленгликоля (ПЭГ), необходимы для функционального развития соматических эмбрионов. В последние несколько лет физиологические и биохимические исследования помогли расширить наши знания о механизме действия АБК и ПЭГ во время развития эмбриона. Тем не менее, по сравнению с цветковыми растениями, наше понимание молекулярных механизмов, регулирующих эмбриогенный процесс у хвойных пород, все еще очень ограничено.

Важной ролью соматического эмбриогенеза хвойных является создание многовариантного лесного хозяйства, определяемого как внедрение генетически протестированных сортов деревьев, в том числе трансгенных деревьев (Парк и др., 2006). Известно, что хвойные виды очень ценны и являются экономически значимыми породами древесных растений, распространенных в северном полушарии. Создание и развитие методов



биотехнологии позволяют получать клоны сосны, используемые в лесовосстановлении и промышленных целях. На сегодняшний день эта биотехнология позволяет ученым получать и массово воспроизводить растения с улучшенным генотипом, что, в свою очередь, повысит продуктивность леса в результате посадки полученных клональных саженцев с лучшим качеством древесины (Park, 2002; Pullman, 2010). Способность задерживать физиологическое созревание эмбрионных тканей в криогенном хранилище во время проведения полевых испытаний, за которыми следует возможность массовое распространение проверенного материала на более позднее время, делает этот подход еще более привлекательным.

Стадии эмбриогенеза у полученных соматических зародышей соответствуют развитию половых: они проходят проэмбриогенез, ранний эмбриогенез, а затем и поздний эмбриогенез. Однако, имеются и различия. Так, например, при соматическом эмбриогенезе все структуры зародыша возникают из одной клетки, в то время как у зиготических зародышей получается 16-клеточный проэмбрио, клетки которого выполняют различные функции (Третьякова, 2008). Заканчивается соматический эмбриогенез представителей семейства *Pinaceae* формированием биполярной структуры зародыша, у которого на одном конце гипокотилия зародышевый корешок, а на другом – семядоли.

На проведение процедуры соматического эмбриогенеза в целом уходит около одного года, но несмотря на это преимущества и возможности данного процесса зачастую покрывают все затраты. (Klimaszewska, Cyr, 2002).

### **1.6 Роль состава питательной среды и условий культивирования в процессе индукции соматического эмбриогенеза**

Такие факторы как состав питательной среды и физические характеристики окружающей среды и условий культивирования оказывают значительное влияние на процесс индукции соматического эмбриогенеза не

только хвойных видов, но и растений в целом.

Так, например, для каждого этапа соматического эмбриогенеза применяются, как правило, соответствующие отличающиеся друг от друга питательные среды. Важность питательной среды в соматическом эмбриогенезе обуславливается тем, что в её задачу входит заменять содержимое мегагаметофита, тем самым удовлетворяя потребности в необходимом количестве макро- и микроэлементов. (Pullman, Bucalo, 2014). Для рода *Pinus* чаще всего используются следующие питательные среды: базальная солевая смесь DCR (разработана Gupta и Durzan в 1985 г.), среда Литвея (Litvay et al., 1985; Nagmani, Bonga, 1985) и смесь MSG (Vecwar et al., 1990). Далее данные питательные среды помещаются в автоклав и стерилизуются при температуре 121°C в течение 20 минут. Процедура стерилизации среды позволяет предотвратить заражение и порчу эксплантов и является необходимым этапом при микроклональном размножении в целом. После того, как автоклавируемые среды остынут до 55°C, к ним добавляют стерилизованные растворы L-глутамина который является источником органического азота. Иногда к L-глутамину добавляют аскорбиновую кислоту и гидролизат казеина.

Данные регуляторы роста необходимы для индукции и пролиферации эмбриональных тканей, при этом развитие ранних соматических зародышей происходит при изъятии этих компонентов из среды. При наличии данных гормонов клетки зародышей могут вновь подвергнуться дифференцировке.

Для развития соматических эмбрионов до стадии созревания необходимо присутствие абсцизовой кислоты (АБК). Данный гормон стимулирует накопление запасных веществ и ингибирует раннее прорастание (Arnold et al., 2002). Комбинация абсцизовой кислоты (АБК) и активированного угля стимулирует формирование и развитие семядолей соматических зародышей ели европейской (*Picea abies* L., Karst.). В данном эксперименте семядольные зародыши образовывались намного чаще, а сами соматические зародыши быстрее увеличивались в размерах, имели большие апикальные области, становились морфологически более похожими на зиготические и

демонстрировали более интенсивное развитие эпикотилия на этапе после прорастания. Зародыши в данном случае были бело-желтого цвета, удлиненные. При культивировании без активированного угля и с абсцизовой кислотой полученные образцы имели желтый оттенок, а по форме были короткими и плоскими в области апикальной меристемы корня (Pullman et al., 2005). В 2002 году на образце лиственницы было проведено исследование, однозначно подтверждающее тот факт, что АБК является критически важным компонентом для правильного развития и созревания здоровых соматических зародышей хвойных пород (von Aderkas et al., 2002).

В обозреваемой литературе также были описаны варианты использования других гормонов и регуляторов роста: так, вместо бензиладенинпурина может быть использован кинетин (Montalbán et al., 2013); также кинетин может применяться вместе с бензиладенином (Pullman, Johnson, 2002). Дихлорфеноксиуксусную кислоту может заменить ауксин-1-нафталинуксусная кислота (Pullman, Johnson, 2002), либо данные кислоты могут применяться комплексно в единой комбинации (Montalbán et al., 2013).

Для успешной индукции соматического эмбриогенеза необходимо учитывать pH питательной среды, который может варьироваться в пределах 4,0-7,5, в зависимости от потребностей растений. Для того чтобы сохранить проэмбрио на преглобулярной стадии необходимо поддерживать низкое значение (4,0-4,5), а для развития и формирования растения поднимать до 5,8 (Митрофанова, 2009).

Помимо перечисленных факторов значительное влияние на жизнь растений, на их рост и развитие, оказывают также спектральный состав света, интенсивность применяемого освещения и температура. Было установлено, что существует взаимосвязь между накоплением гормонов в растении и качеством света (Константинова и др., 1987). В настоящее время применяется оптимальная температура в пределах 21—25 °С, подходящая для культивации большинства видов растений (Dunstan et al., 1995).

Для того чтобы увеличить процент успешной инициации при

соматическом эмбриогенезе иногда применяется предварительная обработка шишек низкими положительными температурами (4–5 ° C) в течение 1–3 недель. Это оказывает положительное влияние на индукцию соматического эмбриогенеза для некоторых видов сосны: *P. sylvestris* (Häggman et al., 1999); *P. radiata* (Montalbán et al., 2015). Помимо этого, обработка холодом позволяет справиться с проблемой узкого «окна» компетентности эксплантов, которые необходимо ввести в культуру в течение короткого периода времени после сбора шишек (Park, 2002; Salajova, Salaj, 2005; Yildirim et al. ., 2006).

## **2 Объект и материалы исследования**

### **2.1 Объект исследования**

Объектом исследования служили 7 деревьев сосны сибирской (кедра сибирского, *Pinus sibirica* DuTour), произрастающих в окрестностях г. Красноярска и в естественном древостое на Китаевой горе вблизи поселка Танзыбей (Ермаковский район Красноярского края). Приблизительный возраст деревьев составлял 45-50 лет.

Для индукции соматического эмбриогенеза, в период с 15 по 25 июля 2020 года, с деревьев *Pinus sibirica* были собраны 22 шишки.

В том числе были собраны шишки сосны сибирской с аномальным однолетним циклом развития женских шишек (дерево № 7). Шишки аномальных деревьев отличаются от обычных по морфометрическим показателям и вариативностью размеров семян в одной шишке от 2мм-до 13мм. Развитие эмбриональных структур от опыления до развития архегониев у данного дерева проходило за 2-2,5 мес. вместо одного года у типичных деревьев.

### **2.2 Материалы исследования**

В качестве эксплантов были использованы зиготические зародыши и мегагаметофиты на разных стадиях их развития.

Зародыши шишек, собранные с дерева №7, с однолетним циклом развития, находились на стадии формирования архегониев и зародышевого канала. Оплодотворение в данном случае не происходило.

### **2.3 Процесс подготовки и стерилизации**

Стерилизация и ввод в культуру *in vitro* производились в стерильном

ламинар-боксе. Перед использованием помещение подвергалось обработке ультрафиолетом на протяжении 25 минут.

До начала каждого эксперимента подготавливалась посуда и стерильная вода, которые стерилизовались в автоклаве при температуре 120 С в течение одного часа.

При работе с объектами внутри ламинар-бокса инструменты и перчатки обрабатывались 96% раствором спирта.

Перед началом работы производились измерения длины и ширины каждой шишки, а также подсчет семян и семенной продуктивности каждой шишки. Семенная продуктивность рассчитывалась по формуле:

$$C = \frac{\text{число семян}}{\text{число сем.чешуй}} * 100\%$$

В таблице 1 приведены морфометрические показатели шишек *Pinus sibirica*, используемых в данном эксперименте. Шишки сосен отличаются размерами и формой. Форма шишек влияет на их длину и массу, количество и вес содержащихся в них семян. Также выделяют параметр, отображающий наполненность шишки семенами — выход семян. Выход семян определяется как отношение числа семян к числу семенных чешуй. Данный показатель обратно пропорционален выходу семян относительно размера шишки.

Таблица 2 – Морфометрические показатели шишек

№ Шишки	№ Дер.	Дл. ш.	Шир.ш.	Коэф-т формы	Кол-во семян	Кол-во семенных чешуй	Семенная прод-ть, %
1	1	9	7	1,3	102	114	89
2	1	8	5,4	1,5	82	103	80
3	2	7,5	5,5	1,4	55	82	67
4	2	8,1	4,9	1,7	50	64	78
5	3	8,5	6	1,4	93	106	88
6	3	9	5,5	1,6	85	135	62
7	3	7,5	5,5	1,4	78	106	74
8	3	8	4,9	1,6	82	96	85

9	4	5,8	6,2	0,9	35	72	49
10	4	6	4,5	1,3	27	89	30
11	4	7	4,7	1,5	29	58	50
12	4	6,8	5,5	1,2	43	79	54
13	5	10	7,5	1,5	72	90	80
14	5	10	6,8	1,7	81	101	80
15	6	11	7	1,5	68	89	77
16	7	6	4	1,5	49	55	89
17	7	5,5	4,5	1,2	78	86	90
18	7	6	4	1,5	65	76	85
19	7	6	4,5	1,3	67	73	91
20	4	7	5,3	1,3	32	76	42
21	5	11	6,8	1,6	83	135	61
22	4	7,6	6	1,3	40	97	41
Cp.:		7,8	5,3	1,41	65.3	90.1	70



Рисунок 2 – Морфометрические показатели шишек *P. sibirica*:  
 1 – Измерение длины типичных шишек; 2 – Измерение длины шишек с однолетним циклом развития 3 – Измерение ширины; 4 – Сравнение мегагаметофитов сосны с однолетним циклом развития (а) и типичной (b).

Сразу после произведения процедуры замера семена сосны сибирской были очищены от покровных чешуй и подвергались стерилизации раствором гипохлорида натрия на протяжении 15 минут, после чего были тщательно промыты дистиллированной водой три раза.





Рисунок 3 – Процесс стерилизации семян гипохлоридом натрия в течение 15 минут

В качестве экспланта использовались изолированные зиготические зародыши, которые извлекались из мегагаметофитов и помещались на питательную среду по 4-5 экспланта в колбу. В случае деревьев № 6 и 7 использовались мегагаметофиты, которые в условиях ламинар-бокса разрезались в продольном направлении, и половина мегагаметофита с находящимся в ней зиготическим зародышем (дерево №6) или без зародыша (дерево №7) помещалась на питательную среду.

#### **2.4 Процесс приготовления питательных сред и введение эксплантов в культуру *in vitro***

Методика получения соматических зародышей хвойных включает в себя ряд последовательных действий, каждая из которых требует определенные питательные среды с отличающимся составом гормональных компонентов. Стадии соматического эмбриогенеза включают в себя: инициацию эмбриогенного каллуса, пролиферацию эмбриогенного каллуса, созревание соматических зародышей и их прорастания.

Состав культуральной питательной среды является существенным фактором в методике соматического эмбриогенеза, так как он заменяет содержимое мегагаметофита. Для инициации соматического эмбриогенеза видов рода *Pinus* наиболее часто применяемыми являются среды Litvay, DCR,

и MSG (Litvay, 1985). Для инициации были использованы следующие базовые питательные среды: LV, дополненная сахарозой (30г/л), казеином (0,5 г/л), глутамином (1г/л) и аскорбиновой кислоты (0,3 г/л), питательная среда LV с пониженным в два раза содержанием макроэлементов, а также базовая питательная среда DCR (Gupta and Durzan,1985), дополненная сахарозой (30г/л), казеином (1 г/л), меоинозитом (200 мг/л), глутамином (0,5г/л) и аскорбиновой кислоты (0,3 г/л). Состав гормонов в данных питательных средах варьировался, благодаря чему было получено 7 типов питательных сред.

Показатель рН доводился до показателя 5,8, после чего производилось автоклавирование при 121 С, 110 кРа в течении 60 минут. Культивирование производилось в темноте в течении 30-35 дней.

Данные о составах питательных сред, использованных для инициации представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Состав питательных сред и концентрация гормонов

Вещество	DCR (2,4Д+ 6БАП)	DCR (NAA+ 6 БАП; 2:1)	DCR (NAA+ 6 БАП; 4:2)	LV ½ (2,4Д; 0,8 мг/л)	LV½ (2,4Д- 6БАП; 2:1)	LV (NAA+ 6 БАП; 2:1)	LV (NAA+ 6 БАП; 2:1, x2)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400	400	400	825	825	1650	1650
KNO <sub>3</sub>	340	340	340	950	950	1900	1900
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	370	370	370	925	925	1850	1850
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	170	170	170	340	340
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	85	85	85	11	11	22	22
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	6,2	31	31	31	31
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	22,3	21	21	21	21
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	8,6	43	43	43	43
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	1,25	1,25	1,25	1,25
CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5

CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,125	0,125	0,125	0,125
KI	0,83	0,83	0,83	4,15	4,15	4,15	0,15
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA * 2H <sub>2</sub> O	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3
Сахароза	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000
Никотиновая кислота	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Тиамин	1	1	1	0,1	0,1	0,1	0,1
Пиридоксин	0,5	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1
Мизоинозит	200	200	200	100	100	100	100
Глицин	2	2	2	-	-	-	-
Казеин	500	500	500	1000	1000	1000	1000
2,4-Д	1	-	-	0,8	1	-	-
альфа-нафтилукс. к-та	-	2	4	-	-	1	2
6-БАП	0,5	1	2	-	0,5	0,5	1

В общей сложности работа была проведена с 22 шишками и более чем с 500 эксплантами. Период ввода эксплантов продолжался с 30 июля 2021 года по 7 сентября 2021 года. Было использовано 179 чашек Петри с 3-5 эксплантами в каждой из них, что продемонстрировано в таблице 4. Каждую неделю культивирования проводился внешний осмотр образцов на наличие эмбрионального рыхлого каллуса беловато-прозрачного цвета. Образцы, которые подвергались заражению, утилизировались.

Таблица 4 – Ввод эксплантов зародышей (з) и мегагаметофитов ( мг) в культуру *in vitro*

Дерево-донор, №	Дата введения в культуру <i>in vitro</i>	Эксплант (мг/з)	Количество шишек	Питательная среда и кол-во эксплантов (шт.)	№ чашек Петри
1	30.07.2020	з	2	DCR NAA – 16;	1-16

				DCR 2,4 – 8; LV ½- 20; LV NAA -20.	
2	30.07.2020	3	1	DCR NAA – 7; DCR 2,4 – 10.	17-20
2	06.08.2020	3	1	DCR NAA – 5; LV NAA – 20; LV ½ - 20.	21-29
3	06.08.2020	3	2	DCR NAA - 20; DCR 2,4 - 10; LV ½ - 12; LV NAA - 12;. LV 2,4 - 15.	30-54
3	10.08.2020	3	2	DCR NAA - 10; DCR 2,4 - 17; LV ½ - 12; LV 2,4 - 12.	55-72
4	13.08.2020	3	1	DCR NAA - 20.	73-78
4	24.08.2020	3	3	LV ½ - 20; LV NAA - 24; LV 2,4 - 23.	79-90
5	24.08.2020	3	1	DCR NAA - 17 , DCR 2,4 - 17.	91-103
5	27.08.2020	3	1	LV ½ - 15; LV NAA - 10; LV 2,4 - 12.	104-118
6	31.08.2020	3	1	DCR NAA - 13; DCR 2,4 - 14; LV ½ - 14.	119-129
7	31.08.2020	МГ	3	DCR NAA - 20; DCR 2,4 - 20; LV ½ - 20; LV 2,4 - 20.	130-148
7	03.09.2020	МГ	1	DCR NAA - 4; LV NAA - 4.	149-156
4	03.09.2020	3	1	DCR 2,4 - 15.	157-160

5	07.09.2020	3	1	DCR NAA - 8;	161- 176
				LV NAA - 6.	
4	07.09.2020	3	1	DCR NAA - 2;	175- 179
				LV 1/2 - 3.	

После завершения процесса инициации проводился тщательный отбор каллусных культур и подсчитывался процент отклика на каждом образце питательных сред, данные вносились в таблицу. Если после инициации наблюдается возникновение белого, состоящего из отдельных клеток или зародышей каллуса, то инициация прошла успешно. Экспланты, которые образовали каллус, переходили к следующему этапу пролиферации. Коричневый неэмбриогенный каллус удалялся при каждой пересадке.

Питательные среды готовились с соблюдением тех же условий, что и для процесса инициации, в стерильной посуде и с рН равным 5,8. Использовали питательные среды 1/2 LV и DCR с добавлением альфа-нафтилуксусной кислоты и пониженным содержанием сахарозы (20г/л) и 6-БАП (0,5 г/л). Проллиферация каллусных культур производилась в течении следующих 3-9 месяцев в темноте при температуре 24С с пересадками на свежие среды каждые 14 дней.

## **2.5. Цитологический анализ и статистическая обработка данных**

Цитологический анализ давленных препаратов полученных эксплантов был начат с первого месяца пролиферации клеток и производился регулярно. Препараты окрашивались путём выдерживания образцов эксплантов на предметном стекле в течение 1-2 минут в однопроцентном растворе сафранина с последующей фиксацией препарата глицерином.

После этого накладывалось покровное стекло и производился осмотр объектов с помощью микроскопа МБИ-6. Замеры клеток и полученных эмбриональных структур осуществлялся через окуляр-микромметр с последующей конвертацией полученных значений в микрометры.

Для анализа полученных данных был применён однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). При этом тип питательной среды выступил в качестве исследуемого фактора (качественная характеристика), а объёмы выросших эксплантов — как зависимая величина (количественная характеристика).

Расчёт объёма каллуса производился по формуле:

$$V = \frac{2}{3} \pi SLH,$$

где S, L и H — это ширина, длина и высота экспланта соответственно.

Анализ был осуществлён средствами программы для работы с данными Microsoft Excel 2019 года.

### 3 Заключение и выводы

Соматический эмбриогенез является современной моделью исследования процессов дифференцировки и дедифференцировки растительных клеток, а также физиологических и молекулярно-генетических внутренних процессов (von Arnold et al., 2002). В настоящее время данный метод активно используется для получения и распространения генетически ценных особей деревьев, и повышения продуктивности лесов в результате насаждения полученных клоновых сеянцев, отличающихся улучшенным качеством древесины (Park, 2002; Pullman, 2010).

В проведенном исследовании был запущен процесс соматического эмбриогенеза сосны сибирской *P.sibirica*. Была исследована зависимость от концентрации гормонов растительного происхождения на процесс инициации соматического эмбриогенеза. Были получены каллусные культуры из зиготических зародышей деревьев №1-6. При этом формирование каллуса и индукция эмбриогенных культур были получены у эксплантов, собранных с деревьев №3 и 4.

По результатам проведенного исследования были сделаны следующие выводы:

1. Наиболее интенсивный рост каллусных культур был отмечен на среде DCR с применением гормона растительного происхождения альфа-нафтилуксусной кислоты и 6-бензиламинопурина в соотношении 2:1 и 4:2.
2. Наибольшей каллусной активностью обладали образцы семян с зиготическим зародышем находившихся на стадии инициации семядолей (3-3,5 мм.)
3. Индукция соматического эмбриогенеза зависит от дерева-донора. Рост каллусной массы наиболее активно шел у эксплантов двух деревьев (№3 и 4 из 7).
4. Удлиненные клетки неэмбриогенного каллуса способны сохраняться в культуре 9 мес. без субкультивирования.

## Список литературы

1. Бабилова А. В., Горпенченко Т. Ю., Журавлев Ю. И. Растение как объект биотехнологии // Комаровские чтения. – Вып. LV. – 2007. – С. 184-211.
2. Баранчиков Ю.Н. Этапы морфогенеза вегетативных почек лиственницы сибирской и его модификации насекомыми галлообразователями // Ботанические исследования в Сибири. 1995. № 4. С. 12–18.
3. Барсукова А. В. Регуляция соматического эмбриогенеза у видов лиственницы в культуре *in vitro* / автореферат дис. 03.01.05 – Красноярск, 2011 – с. 1-15.
4. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений: Учебник. — СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2002. — 232 с.
5. Белоруссова, А.С. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты/ А.С. Белоруссова, И.Н. Третьякова // Онтогенез. - 2008. Т. 39. - №2. - С.1-10.
6. 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.
7. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. — Киев: Наук. думка, 1992. — 232 с.
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. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1973. 343 с.
10. Минина Е.Г. Пол у сосны обыкновенной // Вопросы физиологии половой репродукции хвойных / Красноярск: ИЛиД, 1975. С. 68–89.
11. Минина Е.Г., Третьякова И.Н. Геотропизм и рост хвойных / Под ред. Реймерса Ф.Э. Новосибирск: Наука, 1983. 200 с.



12. 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
13. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980. 340 с.
14. Рокицкий П. Ф. Биологическая" статистика. — Минск : Вышэйш. школа, 1973. — 319 с.
15. Третьякова И.Н., Барсукова А.В. Соматический эмбриогенез лиственниц и кедра сибирского в Сибири // Лесоведение, 2012, № 6, с. 63–70.
16. Третьякова И.Н. Способ микроклонального размножения лиственницы сибирской в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез на среде АИ для плантационного лесовыращивания: Патент № 245344 // Федеральная служба по интеллектуальной собственности. 2012. Бюл. №20. 7 с.
17. 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.
18. Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных: физиологические аспекты. Новосибирск, Наука, 1990. 157 с.
19. Третьякова И.Н., Баранчиков Ю.Н., Буглова Л.В., Белоруссова А.С., Романова Л.И. Особенности формирования генеративных органов лиственницы сибирской и их морфогенетический потенциал // Успехи современной биологии. 2006. Т. 126. № 5. С. 472–480.
20. Чавчавадзе Е.С., Яценко-Хмелевский А.А. Порядок сосновые (Pinales) // Жизнь растений в шести томах. Т.4 / Под ред. Грушвицкого И.В. М.: Просвещение, 1978. С. 350-354.
21. Alvarez J.M., Bueno N., Cortizo M., Ordas R.J. Improving plantlet yield in *Pinus pinaster* somatic embryogenesis. *Scandinavian Journal of Forest Research* 28: 613–620; 2013.

22. Ammirato P.V. Patterns of development in culture // Tissue culture in forestry and agriculture / Eds. R.R. Henke, K.W. Hughes, M.J. Constantin, A. Hollaender. — New York: Plenum Press, 1985. — P. 9—29.
23. Attree S.M., Dunstan D.I., Fowke L. Initiation of embryogenic callus and suspension cultures, and improved embryo regeneration from protoplasts of white spruce (*Picea glauca*) // *Can J Bot.* 1989. V. 67. P. 1790–1795.
24. Attree, S. M.; Fowke, L. C. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 35:1–35; 1993.
25. Chalupa W. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) // *Karst. Com. Inst. For. Cech.* 1985. V. 14. P. 57–63.
26. Chowdhary, C.R. The embryogeny of conifers: a review. // *Phytomorphology*, 12. 1962. P. 313-338. 33. Corredoira E., Ballester A., Vieitez A.M. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants // *Ann. Bot.* — 2003. — 92. — P. 129—136.
27. Corredoira E., San-Jose M.C., Ballester A., Vieitez A.M. Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut // *Cryo Lett.* — 2004. — 25, N 1. — P. 33—42.
28. de Vries SC, Booij H, Meyerink P, Huisman G, Wilde DH, Thomas TL & van Kammen A . Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension culture. *Planta* 176: 196–204, 1988a.
29. Dodeman V.L., Ducreux G., Kreis M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis // *J. Exp. Bot.* — 1997. — 48, N 313. — P. 1493—1509. 37. Dunstan D.I., Tautorus T.E., Thorpe T.A. Somatic embryogenesis in woody plants // *In vitro Embryogenesis in Plants* / Ed. T.A. Thorpe. — Netherlands, Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995. — P. 471—538.
30. Engelmann F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: Engelmann F, Takagi H (eds) *Cryopreservation of tropical plant germplasm – current research progress and application*. JIRCAS, Tsukuba/IPGRI, Rome, 2000, pp 8–20.

31. Filonova L, Bozhkov P & von Arnold S. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J. Exp. Bot.* 51: 249–264, 2000a.
32. Find, J. I. Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, desiccation and germination. *Plant Sci.* 128:75–83; 1997.
33. Finer J.J., Kriebel H.B., Becwar M.R. Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.) // *Plant Cell Rep.* 1989. V. 8. P. 203-206. 46
34. Fujimura T., Komamine A. Involvement of endogenous auxin in somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture // *Ztschr. Pflanzenphysiol.*, 1979, 95, № 1, p. 13-19.
35. Gao, Fang, et al. "Selection of culture conditions for callus induction and proliferation by somatic embryogenesis of *Pinus koraiensis*." *Journal of Forestry Research* 32 (2021): 483-491.
36. Gower ST, Richards JH. Larches: deciduous conifers in an evergreen world. *Biosciences* 40:818-826; 1990.
37. Gray D.J. Nonzygotic embryogenesis // *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises* / Eds. R.H. Trigiano, D.J. Gray. — Tokyo: CRC Press, 1996. — P. 133—147.
38. Gray D.J., Purohit A. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology // *Crit. Rev. Plant Sci.* — 1991. — 10. — P. 33—61.
39. Gupta P.K., Grob J.A. Somatic embryogenesis in conifers // In: Jain S., Gupta P., Newton R. (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants* / Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 1995. V. 1. P. 81–98.
40. Gupta P.K., Timmis R., Timmis K. et al. Increase in forest productivity through biotechnology // *Crop Productivity and Sustainability-Shaping the Future* / Eds. V.L. Chopra, R.B. Singh, A. Verma. — New Delhi: Oxford&IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., 1999. — P. 745—752.
41. Gupta PK, Holmstrom DG, Larson B, Zucati J. Development and

stratification of pine somatic embryos using a liquid system. US Patent 20050026281, 2005.

42. Gupta, P.K. and D.J. Durzan. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Rep.* 4:177-179; 1985.

43. Gutmann M, von Aderkas P, Label P, Lelu M-A. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *J Exp Bot* 47: 1905-1917; 1996.

44. Hay EI, Charest PJ. Somatic embryo germination and desiccation tolerance in conifers. In: Mohan JS, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol 4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 61–69, 1999.

45. Joy IV, R. W.; Kumar, P. P.; Thorpe, T. A. Long-term storage of somatic embryogenic white spruce tissue at ambient temperature. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 25:53–60; 1991a.

46. Kartha, K. K.; Fowke, L. C.; Leung, N. L.; Caswell, K. L.; Hakman, I. Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). *J. Plant Physiol.* 132:529–539; 1988.

47. Klimaszewska K, Hargreaves C, Lelu-Walter M-A, Trontin J-F. Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. In: Germanà MA, Lambardi M (eds)

48. Klimaszewska K. Plantlet development from immature zygotic embryos of hybrid larch through somatic embryogenesis. *Plant Sci* 63:95-103; 1989a.

49. Klimaszewska K., Bonga J.M., Park Y.S., Lelu-Walter M.-A., Harvengt L., Trontin J.F., MacEacheron I. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2006. V. 86. P. 87–101.

50. Klimaszewska K., Cyr D.R. Conifer somatic embryogenesis: I. Development // *Dendrobiology.* 2007. V. 48. P. 31–39.

51. Klimaszewska K., Park Y.-S., Overton C., McEacheron I., Bonga J.M. Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. // *In Vitro Cell Dev. Biol.Plant.*

2001. V. 37. P. 392–399.

52. Klimaszewska, K.; Bernier-Cardou, M.; Cyr, D. R.; Sutton, B. C. S. Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36:279–286; 2000.

53. Klimaszewska, K.; Smith, D. R. Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiol. Plant.* 100:949–957; 1997.

54. Kong, L.; Yeung, E. C. Effects of silver nitrate and polyethylene glycol on white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development: enhancing cotyledonary embryo formation and endogenous ABA content. *Physiol. Plant.* 93:298–304; 1995.

55. Lambardi M, De Carlo A. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. In: Jain SM, Ishii K (eds) *Micropropagation of woody trees and fruits*. Kluwer Academic, Dordrecht, 2003, pp 815–840.

56. Lelu M.-A., Bastien C., Dugeault A., Gouez M.L, Klimaszewska K. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without plant growth regulators // *Physiol. Plant.* 1999. V. 105. P. 719–728. 48

57. Lelu M.A., Klimaszewska K., Charest P.J. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix* // *Can. J. For. Res.* 1994. V. 24. № 1. P. 100–106.

58. Lelu-Walter M.-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. Clonal Plant Production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2008. V. 92. P. 31–45.

59. Lelu-Walter M-A, Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait) // *Plant Cell Rep.* 2006. V. 25. P. 767–776.

60. Lelu-Walter M-A, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M,

Pâques L.E. Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genet Genomes* 9: 883-899; 2013.

61. Lelu-Walter M-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. Clonal plant production from self- and crosspollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2008. V. 92. P. 31–45.

62. Lelu-Walter M-A., Paques L.E. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x marschlinsii*). Perspectives for breeding // *Ann. For. Sci.* 2009. V. 66. P. 104.

63. Li, X. Y.; Huang, F. H.; Grur, E. E. Polyethylene glycol-promoted development of somatic embryos in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 33:184–189; 1997.

64. Litvay, J. D.; Verma, D. C.; Johnson, M. A. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Rep.* 1985. 4:325–328; 1985.

65. Malabadi R. B., Teixeira da Silva J. A., Mulgund G. S. Induction of somatic embryogenesis in *Pinus caribaea*. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 5(1), 27-32, 2011b.

66. Malabadi R.B., Choudhury H., Tandon P. Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Pinus kesiya* (Royle ex. Grod.) // *Appl Biol Res.* 2002. V. 4. P. 1–10.

67. 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. 78. Merkle S.A., Dean J.E. Forest tree biotechnology // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2000. — 11, N 3. — P. 298—302. 79. Merkle S.A., Parrott W.A., Flinn B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis // *In vitro embryogenesis in plants / Ed. T.A. Thorpe.* — Netherlands: Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995. — P. 155—203. 49

68. Nomura K., Komamine A.I. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant*

Physiol. 79: 988–991; 1985.

69. Nunes, Sandra, et al. "Somatic embryogenesis of hybrid *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *P. caribaea* var. *hondurensis* and ploidy assessment of somatic plants." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 132.1 (2018): 71-84.

70. Singh H. *Embryology of Gymnosperms*. Berlin: Gebruder Borntraeger. 1978. 302 p.

71. Skolmen R.G. *Acacia (Acacia koa Gray) // Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees 1 / Ed. Y.P.S. Bajaj. — Vol. 1. — Berlin: Springer Verlag, 1986. — P. 375—384.*

72. Stasolla C., Kong L., Yeung E.C., Thorpe T.A. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 2002 V. 38. P. 93–105. 9

73. Stasolla C., Yeung E. C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2003. V. 74. P. 15– 35

74. Von Arnold S, Sabala I., Bozhkov P. et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2002. V. 69. P. 233–249.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
институт

Кафедра водных и наземных экосистем  
кафедра

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ подписью \_\_\_\_\_ инициалами, фамилией



« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

Индукция соматического эмбриогенеза *P. sibirica* в  
условиях культуры in vitro

Тема

Руководитель	_____	_____	<u>Т.И. Голованова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
	<u>28.06.2021</u>	<u>д.б.н., проф.</u>	<u>И. Н. Третьякова</u>
Руководитель	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
	<u>28.06.2021</u>		
Выпускник			<u>А. В. Курилина</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия

Красноярск 2021