

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
**«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ М.И. Гладышев  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

**06.03.01 – Биология**

«Инициация соматического эмбриогенеза у *Larix sibirica*»

Руководитель \_\_\_\_\_ профессор, д.б.н. Т.И. Голованова  
подпись, дата

Консультант \_\_\_\_\_ профессор, д.б.н. И.Н. Третьякова  
подпись, дата

Выпускник \_\_\_\_\_ Д.А. Титова  
подпись, дата

Красноярск 2023

## РЕФЕРАТ

Данная выпускная работа на тему «Инициация соматического эмбриогенеза у *Larix sibirica*» состоит из введения, обзора литературы, объектов и методов исследования, результатов и обсуждений, заключения, списка литературы, содержит 44 страницы текстового документа, 15 рисунков и 3 таблицы.

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ, ЛИСТВЕННИЦА СИБИРСКАЯ, СОМАТИЧЕСКИЕ ЗАРОДЫШИ, *LARIX SIBIRICA*, КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ, ЭМБРИОНО-СУСПЕНЗОРНАЯ МАССА.

Целью исследования является разработка биотехнологии соматического эмбриогенеза у *larix sibirica* в культуре *in vitro*.

Исходя из цели были поставлены следующие задачи:

1. Подобрать оптимальные условия культивирования *in vitro* для инициации эмбриогенного каллуса, пролиферации эмбриональной массы и созревания соматических зародышей для лиственницы сибирской.
2. Провести наблюдение за динамикой роста эмбриогенного каллуса при использовании различных питательных сред.
3. Изучить цитологические особенности образования соматических зародышей в культуре *in vitro*.

Объект исследований – деревья лиственницы сибирской, материал исследования- зиготические зародыши.

В процессе исследований были иницированы 5 эмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской, которые будут введены в коллекцию эмбриогенных культур Института леса им. В.Н Сукачева ФИЦ КНЦ СО РАН, а также проведен цитологический и морфологический анализы протекания соматического эмбриогенеза у лиственницы сибирской.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1. Соматический эмбриогенез.....	7
1.2. Индукция соматического эмбриогенеза.....	9
1.3. Соматический эмбриогенез в культуре <i>in vitro</i> .....	11
1.4. Соматический эмбриогенез хвойных.....	11
1.4.1. Индукция.....	14
1.4.2. Пролиферация.....	15
1.4.3. Созревание соматических зародышей.....	16
1.4.4. Прораствание соматических зародышей.....	17
1.5. Соматический эмбриогенез <i>Larix</i> .....	18
1.6. Соматический эмбриогенез <i>Larix sibirica</i> .....	18
2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ.....	20
2.1. Объекты исследования.....	20
2.2. Методы исследования.....	22
Индукция эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ).....	22
Пролиферация эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ).....	23
Предсозревание соматических зародышей.....	23
Созревание соматических зародышей.....	23
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	25
3.1. Инициация эмбриогенных культур <i>Larix sibirica</i> .....	25
3.2. Пролиферация эмбриогенных культур <i>Larix sibirica</i> .....	27
3.3. Созревание соматических зародышей <i>Larix sibirica</i> .....	34

ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	38
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	39

## ВВЕДЕНИЕ

Соматический эмбриогенез — это изучаемое необыкновенное явление. В основе соматического эмбриогенеза лежит способность уникальная для растительных клеток реализовывать генетическую информацию, имеющуюся у неё, и давать начало целому организму при определенных условиях (тотипотентность) (Бутенко, 1999).

Стадии развития соматического эмбриогенеза, с точки зрения механизмов развития и регуляции, сходны с процессом зиготического эмбриогенеза. Таким образом, соматический эмбриогенез может служить моделью для изучения ранних событий развития зиготического эмбриона в жизненном цикле высших растений (Guan et al, 2016).

Лесообразователем сибирских лесов одним из основных среди хвойных видов является *Larix sibirica* (Led., 1833). Ей свойственна низкое качество семян и неравномерность урожаев в многолетнем цикле. Деревья лиственницы могут поражаться лиственничной почковой галлицей, которая в свою очередь оказывает отрицательное влияние на урожай семян (Баранчиков, 1995). Поэтому важно осуществлять отбор устойчивых к вредителю растений-доноров и выращивать посадочный материал с применением технологии соматического эмбриогенеза (Третьякова, 2013).

Метод соматического эмбриогенеза предоставляет возможность получить массовое размножение элитных линий растений для плантационного лесовыращивания, тем самым повышая продуктивность лесов, не прибегая к генетическим модификациям, решая экономические и технологические вопросы программ лесовозобновления.

Соматический эмбриогенез у лиственниц и других хвойных представляет собой активно изучаемую тему, однако до сих пор остается много нерешенных вопросов. Например, не понятно до конца, как реализовывается переключение соматических клеток на путь соматического эмбриогенеза и каким образом

созревание соматических зародышей происходит. Поэтому важно продолжать научные исследования в этой области.

Одним из ключевых вопросов является то, какие факторы влияют на получение полноценных зародышей, регенерантов и семян при соматическом эмбриогенезе у лиственниц. На данный момент не существует единой точки зрения на этот вопрос, поэтому необходимо проводить дальнейшие исследования и выявлять новые факторы, которые могут повлиять на процесс соматического эмбриогенеза.

Также важно учитывать, что хвойные деревья играют важную роль в экологическом балансе и промышленности, поэтому соматический эмбриогенез может быть использован для создания новых сортов деревьев и повышения их устойчивости к различным факторам окружающей среды. Однако для этого необходимо более глубокое понимание процессов, происходящих при соматическом эмбриогенезе у хвойных деревьев, что подчеркивает важность дальнейших исследований в этой области (Park, 2002; Белоруссова, Третьякова, 2008).

Целью исследования является разработка биотехнологии соматического эмбриогенеза у *larix sibirica* в культуре *in vitro*.

Исходя из цели были поставлены задачи:

1. Подобрать оптимальные условия культивирования *in vitro* для инициации эмбриогенного каллуса, пролиферации эмбриональной массы и созревания соматических зародышей для лиственницы сибирской;
2. Провести наблюдение за динамикой роста эмбриогенного каллуса при использовании различных питательных сред;
3. Изучить цитологические особенности образования соматических зародышей в культуре *in vitro*.

# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Соматический эмбриогенез

Соматический эмбриогенез — это самый быстрый, самый гибкий и эффективный способ массового воспроизводства, который позволяет произвести генетически улучшенный материал (Lelu - Walter et al, 2013).

Для микрклонального размножения покрытосеменных и голосеменных растений широко применяется соматический эмбриогенез (Klimaszewska, Cyr, 2002).

Соматический эмбриогенез — основан на тотипотентности клеток - приобретении или функционировании стволовых клеток, которые могут дать начало эмбриону *in vitro*. Согласно Бутенко (1999), соматический эмбриогенез — образование в каллусной или суспензионной культуре эмбриоидов, т.е. зачатков растения, способных развиваться во взрослое растение.

Впервые соматический эмбриогенез был получен у моркови в суспензионной культуре (*Daucus carot*) в 1975 г. Ф. Стюардом. Позже ученые в шутку предложили ввести новое название науки — «морковеология» (Митрофанова, 2009; Бутенко, 1999).

Сегодня уже известно, что соматические зародыши появляются у растений, принадлежащих к различным таксонам и растущих в разных экологических зонах. Зародыши были получены вначале из нуцеллуса цитрусовых, затем из цветочных бутонов, эндоспермов, семядолей, гипокотилей, зиготических зародышей, чуть позже вегетативные органы стали, тоже использовать в качестве эксплантов для создания систем соматического эмбриогенеза *in vitro* (Митрофанова, 2009).

Стадии развития соматического эмбриогенеза, с точки зрения механизмов развития и регуляции, сходны с процессом зиготического эмбриогенеза. Таким образом, соматический эмбриогенез может служить моделью для изучения

ранних событий развития зиготического эмбриона в жизненном цикле высших растений (Guan et al, 2016).

Одним из ключевых этапов в развитии соматических зародышей является формирование апикальных меристем стебля и корня. По мере развития, соматические зародыши проходят три стадии развития: глобулярную, сердцевидную и торпедовидную. И только после завершения всех стадий развития, они превращаются в проросток. Не смотря на то, что этот процесс изучается достаточно давно, однако до сих пор мало известно о механизмах перехода от морфогенных клеток к эмбриогенезу (Бабикова и др., 2007).

Существует два способа образования соматических эмбриоидов: прямой и непрямой. В первом случае формируется эмбриоид из клеток экспланта, исключая стадию промежуточного каллуса, а во втором способе - сначала образуется каллус, из которого формируются клеточные эмбриогенные комплексы, развивающиеся в проэмбриональные структуры и в последующем в биполярные эмбриоиды (Митрофанова, 2009; Guan et al, 2016). Различие между прямым и непрямым соматическим эмбриогенезом затруднено, так как оба процесса наблюдались одновременно в одних и тех же условиях культивирования тканей. Стоит отметить, что соматические эмбриоиды точно воспроизводят генотип исходного растения, они являются их клонами.

Современные исследования показывают, что клональное микроразмножение является более эффективным способом размножения растений, чем традиционные методы генеративного и вегетативного размножения. Это преимущество неоспоримо и подтверждено научными исследованиями. Они могут быть использованы в сельском и лесном хозяйстве, цветоводстве, медицинской и пищевой промышленности. В настоящее время, появляется тенденция к расширению областей их применения, таких как сохранение редких и исчезающих видов растений и охрана окружающей среды. Большое значение имеет разработка условий длительного хранения пробирочных растений и создание резервного банка культур *in vitro* и



криоконсервирования их для длительного хранения генофонда ценных видов, форм и сортов разных культур (Кутас и др., 2015).

Схема развития соматических зародышей очень похожа у большинства древесных видов, исследованных на сегодняшний день. Развитие соматических зародышей подвержено влиянию многих факторов - как абиотических, так и биотических. Ключевыми индукторами для индукции дифференциации соматических эмбриоидов являются регуляторы роста растений, осмотически активные вещества, консистенция и pH среды, интенсивность освещения, фотопериод, температура и влажность. Для последующей регенерации растений эти индукторы тоже важны.

## 1.2. Индукция соматического эмбриогенеза

**Стерильность.** Изолированные от растения фрагменты (экспланты) легко поражаются микроорганизмами, поэтому так важно при посадке/пересадке соблюдать стерильность: работать в асептическом помещении стерильными инструментами, стерилизовать питательные среды.

**Питательные среды.** Изолированные клетки и ткани культивируют на многокомпонентных питательных средах. Они могут различаться по своему составу, но в каждую среду должны входить макро- и микроэлементы, углеводы и витамины. Для соматического эмбриогенеза, углеводами наиболее распространенными считаются глюкоза и сахароза. Иногда использованы могут быть лактоза, мальтоза, сорбит, галактоза и маннит.

Немаловажное значение имеют экзогенные регуляторы роста растений — ауксины (2,4-Д), отвечающие за рост и дифференцировку клеток и цитокинины, стимулирующие клеточные деления. Для обеспечения правильного развития при созревании и регенерации соматических зародышей применяют абсцизовую кислоту, которая способствует накоплению запасных веществ и предотвращает раннее прорастание. Кроме того, выведение остаточных

гормонов и токсичных метаболитов, таких как фенольные соединения, осуществляется с помощью активированного угля. Однако, следует учитывать, что активированный уголь может выводить и необходимые гормоны, ионы металлов и витамины, поэтому это нужно учитывать (Pullman et al, 2005).

Сочетание АБК и активированного угля способствует развитию семядолей соматических зародышей, которые увеличиваются в размере, имеют апикальные области крупные. Однако, зародыши, культивируемые на среде только с абсцизовой кислотой, могли быть короткими и плоскими в апикальной плоскости корня (Pullman et al, 2005).

Загустители среды в качестве желирующего агента используют разные: Gellan gum, агар-агар. Чтобы клеткам эмбриональной массы обеспечить эффективную обеспеченность водой, используются желирующие агенты. Они специально используются для увеличения плотности среды и уменьшают для клеток количество доступной воды.

При приготовлении питательных сред для растений необходимо учитывать множество факторов, включая рН среды. От потребностей растений зависит концентрация ионов водорода (может находиться в пределах от 4,0 до 7,5). рН с низким уровнем (от 4,0 до 4,5) помогает сохранить на преглобулярной стадии проэмбрио, повышение же рН до 5,8 способствует формированию и развитию растений, что многократно может повысить эффективность соматического эмбриогенеза.

**Освещение.** Существует связь между света качеством и накоплением отдельных регуляторов и ингибиторов роста в растении. Обычно, отсутствие освещения необходимо для пролиферации и созревания соматических зародышей, однако для прорастания соматических зародышей необходим свет с фотопериодом 16 ч.

**Температура.** Оптимальная температура находится в пределах 21-25°C для растений большинства видов (Митрофанова, 2009; Дитченко, 2007; Бутенко, 1999).

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

Перед учеными разных биологических специальностей стоит задача сохранения редких и исчезающих растений, диких сородичей культурных растений для притока генов, создание коллекций сельскохозяйственных культур.

При решении главных и прикладных задач селекции ценных видов растений широко используются различные методы культуры клеток и тканей *in vitro*. Одним из наиболее значимых методов для биотехнологий является соматический эмбриогенез, который позволяет создать высокоэффективную систему получения устойчивых растений - регенерантов, повысить качество посадочного материала, ускорить селекционный процесс и сохранить ценные генотипы растений (Park et al, 2016).

Этот метод широко применяется в различных регионах мира, включая Западную Европу (Чехия, Польша, Франция, Италия), Северную и Южную Америку (Канада, США, Бразилия), Японию, а также Юго-Восточную Азию (Индия) (Klimaszewska et al, 2016).

### **1.4. Соматический эмбриогенез хвойных**

Соматический эмбриогенез хвойных имеет важное значение в биотехнологии по ряду причин: этот метод позволяет производить неограниченное количество проростков, и эмбриогенная культура может быть использована для генетической трансформации (Kim et al, 1998).

Со времени открытия соматического эмбриогенеза у *Picea abies* (Накман, Fowke, 1985) и *Larix decidua* (Nagmani, Bonga, 1985) соматический эмбриогенез у хвойных был исследован у многих других видов, причем подавляющее большинство из них относится к семейству Pinaceae, и лишь немногие к

Cupressaceae, Taxaceae, Cephalotaxaceae и Araucariaceae (Klimaszewska et al., 2016).

В настоящее время соматический эмбриогенез направлен на получение и распространение генетически ценных деревьев, повышение продуктивности лесов, так как клоновые сеянцы, полученные путем соматического эмбриогенеза, отличаются улучшенным качеством древесины (Pullman, Bucalo, 2011).

Важнейшим преимуществом производства хвойных растений с помощью соматического эмбриогенеза является то, что эмбрионные клеточные линии могут подвергаться криоконсервации и хранению длительный промежуток времени, что невозможно достичь другими методами вегетативного размножения деревьев. Это позволяет проводить длительные испытания, последующий отбор и поиск протестированных клеточных линий для массового размножения. За последние годы реализация соматического эмбриогенеза привела к реализации мульти-сортового лесного хозяйства (MVF) в восточной Канаде компанией JD Irving Limited (Park et al., 2016).

Несмотря на значительные достижения в области соматического эмбриогенеза хвойных, биотехнология этого процесса для большинства видов не разработана (Bonga et al., 2010).

Регенерация растений хвойных через соматический эмбриогенез получена у 16 видов рода *Pinus*, у 11 видов рода *Picea*, у 4 видов и 2 гибридов рода *Abies*, у 6 видов и гибридов рода *Larix*, у *Pseudotsuga menziesii* также (Klimaszewska, Cyr, 2002).

Для соматического эмбриогенеза хвойных растений биотехнология, с момента открытия в 1985 году непрерывно развивалась, и постоянно совершенствуется. По поиску литературы видно, что примерно 46 журнальных статей с 2000 года было выпущено, и в них сообщалось об улучшении методик соматического эмбриогенеза для *Pinus strobus*, *Pinus taeda*, *Pinus sylvestris*, *Pinus patula*, *Pinus pinaster*, *Pinus radiata*, *Pseudotsuga menziesii*, *Abies nordmanniana*, *Picea mariana*, *Picea abies*, *Picea glauca*, *Larix hybrids*. Кроме того, опубликовано

около 40 статей для видов хвойных, для которых соматический эмбриогенез описан впервые, что является показателем важности этой технологии для клонального размножения хвойных видов (Klimaszewska et al, 2016).

Соматический эмбриогенез копирует путь развития зиготических зародышей у хвойных: проэмбриогенез, состоит из стадии формирования проэмбрио, а так же формирование его и удлинение его первичного суспензора; ранний эмбриогенез — формирование глобулярного зародыша; и поздний эмбриогенез — заложение меристем корня, побега, семядолей в зародыше (Singh, 1978; Третьякова, 1990)

Однако существуют определенные различия в процессах формирования соматических и зиготических эмбрионов. Морфологически идентичные клетки 16-клеточного проэмбриона формируются в зиготическом эмбрионе, выполняя разные функции, то есть формирование будущих зиготических эмбрионов предопределено их положением в системе проэмбриона, в процессе соматического эмбриогенеза все структуры соматических эмбрионов происходят из одной и той же клетки, по ее удлинению, поляризация, затем ассимиляционное разделение. Последующее эмбриональное развитие клеток у соматических и зиготических эмбрионов происходит одинаково. Они образуют две группы клеток - эмбриональная инициаль и удлиненную клетку (возможно, первую эмбриональную трубку). Эмбриональные глобулы образуются из исходных эмбриональных клеток, а эмбриональные трубочки образуются из базальных клеток эмбриональных глобул, составляющих суспензор. Следует отметить, что эмбриональные глобулы содержат большое количество ауксина, а эмбриональные трубки и суспензия в целом оставались слабо окрашенными ауксинами и цитокининами (Третьякова, Пак, 2018).

Пролиферация эмбриогенных культур и активное нарастание эмбрионально-суспензорной массы при соматическом эмбриогенезе обусловлено проявление кливажа, архивированного в клетках зиготического эмбриогенеза. Выявлено, что у зиготических и соматических зародышей различается две структурные единицы, одна из которых образует зародыш, а

другая эмбриональные трубки и, впоследствии, клетки суспензора. При соматическом и зиготическом эмбриогенезе при увеличении эмбриональных глобул идет образование эмбриональных трубок, а затем их отмирание и образования новых. При зиготическом и соматическом эмбриогенезе образование клеток суспензора идет упорядоченно в области будущего зародышевого корешка (Третьякова, 2008; Белоруссова, Третьякова, 2008).

Пролиферирующая эмбриогенная культура хвойных характеризуется, как полупрозрачная масса незрелых соматических (глобулярных) зародышей — эмбрионально-суспензорная масса (*embryonal suspensor masses* — ЭСМ) (Stasolla et al, 2002). До сих пор не сложилось единого взгляда на механизм инициации и увеличение числа глобулярных зародышей в ЭСМ.

Разными исследователями были предложены следующие механизмы формирования соматических зародышей: формирование соматических зародышей в результате асинхронного деления отдельных клеток экспланта (von Arnold, Накман, 1988; Белоруссова, Третьякова, 2008); кливажная полиэмбриония (von Aderkas et al, 1991); формирование соматических зародышей в результате деления клеток, располагающихся в суспензоре (Stasolla, Yeung, 2003).

Было установлено, что регенерация у хвойных видов через соматический эмбриогенез является многоступенчатым процессом. Соматический эмбриогенез хвойных проходит несколько стадии: индукция, пролиферация, созревание соматических зародышей, прорастание, получение растений - регенерантов и акклиматизацию соматических сеянцев.

#### 1.4.1. Индукция

Индукция эмбриогенной ткани у хвойных видов зависит от выбора экспланта. В отличие от цветковых растений, где эмбриогенный процесс инициируется из зрелых эксплантов, у хвойных используются молодые ткани.

В качестве источника клеток для индукции соматического эмбриогенеза успешно используются зародыши у *Pinus taeda* (Gupta et al, 1987), *Picea abies* (Von Arnold et al, 1996), *Pinus rigida*×*P.taeda* (Kim, Moon, 2007), *Larix* × *eurolepis* (Klimaszewska, 1989). У некоторых видов, таких как *Picea mariana* (Lelu, Bornman, 1990), *Pinus taeda* (Becwar et al, 1990) для индукции используют мегагаметофиты.

Самым успешным является использование в качестве эксплантов незрелых зиготических эмбрионов, так как в результате этого образуется массовый эмбриогенный материал, который может привести к увеличению числа соматических зародышей (Cairney, Pullman, 2007). Использование зрелых тканей в качестве эксплантов препятствует реализации тотипотентности клетки и ее дифференцировки в культуре ткани. При введении в культуру *in vitro* незрелых зиготических зародышей возникает ряд проблем, которые связаны с трудностями выделения экспланта, его стерилизацией и высоким процентом гибели.

На индукцию зародышей влияют так же факторы, рассмотренные в предыдущей главе: это специфический состав сред, физические условия культивирования, а также воздействие регуляторов роста (ауксины, цитокинины) (Митрофанова, 2009).

В зависимости от вида, для индукции используются различные базовые питательные среды (MS, MSG, SH, LV, АИ и др.), содержащие ауксины (обычно 2,4-Д или НУК) и цитокинины (6-БАП). Для инициации соматического эмбриогенеза у лиственницы и видов сосен стандартной концентрацией гормонов является 9 мМ 2,4-Д и 4,5 мМ 6-БАП (Klimaszewska et al, 2001, Третьякова и др., 2015). Однако ряд исследований по оптимизации соматического эмбриогенеза рекомендуют снижение концентрации гормонов.

#### 1.4.2. Пролиферация

Поддержание эмбриогенных культур проводится для накопления массы эмбриогенной ткани на полутвердых или жидких средах с тем же составом что и для индукции, но с пониженным содержанием сахарозы и уменьшенной концентрацией ауксина и цитокинина. Во время пролиферации эмбриональной массы ауксина и цитокинины, стимулируют быстрое увеличение её объема, и происходит массовое формирование глобулярных зародышей. Культуры держатся в темноте, и регулярно пересаживаются на свежую питательную среду каждые 10-14 дней (на твердой среде) и 7 дней (на жидкой среде) (Gupta, 1987). В результате длительного субкультивирования, как правило, наблюдается потеря эмбриогенного потенциала и увеличение числа эмбрионов с аномальными структурами (Stasolla et al, 2002).

#### 1.4.3. Созревание соматических зародышей.

Это процесс гистологической дифференциации незрелых (ранних) зародышей, в результате чего происходит формирование семядолей, гипокотыля, зародышевого корешка и других органов и тканей, характерных для зрелого зародыша.

Для достижения полного созревания, соматические зародыши должны достигнуть морфологической и физиологической зрелости. Развитие зародыша у хвойных начинается с остановки клеточной пролиферации путем удаления ауксина и цитокинина и продолжается при добавлении абсцизовой кислоты (АБК) и наложения осмотического стресса. Эти изменения в составе растительных регуляторов роста являются важным механизмом для успешного завершения эмбрионального развития (Bozhkov et al, 2002; Stasolla et al, 2002).

АБК присутствует во всех стадиях развития семени только в разных концентрациях. Обычно, низкое содержание АБК наблюдается в начальной стадии развития, далее ее уровень повышается при развитии эмбриогенных структур и в течение последней стадии созревания, к периоду высушивания,



снова снижается. В семенах содержится больше АБК, чем в соматических зародышах, так как источником АБК является мегагаметофит (Якушкина, 2005; Tretyakova et al, 2019). Поэтому для нормального роста соматических зародышей, АБК должна быть добавлена в зависимости от вида. Оптимальные концентрации АБК, установленные для *Larix* - 40-60  $\mu\text{M}$ ; для *Pinus* - 60-120  $\mu\text{M}$ ; для *Abies* 10-80  $\mu\text{M}$ ; для *Picea* 12-60  $\mu\text{M}$  (Klimaszewska, Cyr, 2002)

Для контроля осмотического давления в течение созревания эмбрионов используют два метода. Первый - добавление в среду сахарозы, мальтозы, сахарных спиртов, полиэтиленгликоля или комбинации этих осмолитиков. Второй метод - добавление в среду сильного желирующего агента для снижения оводненности. Так же используют комбинацию этих методов. Это необходимо для выработки устойчивости к последующему полному обезвоживанию (Stasolla et al, 2002)

#### 1.4.4. Прорастание соматических зародышей

Прорастание зрелых соматических зародышей и превращение в растение производится на базовой среде свободной от растительных регуляторов роста, с пониженным содержанием сахарозы и, иногда, добавляется активированный уголь.

Удлинение эпикотилия и появление семядолей наблюдается в течение 12-16 недель и зависит от вида растения. После достижения желаемого размера, проростки переносятся в почву в теплицу для акклиматизации (Misra, 1994). Таким образом, вся процедура соматического эмбриогенеза у хвойных растений продолжается около года.

### **1.5. Соматический эмбриогенез *Larix***

Среди видов хвойных соматический *Larix* стал моделью для частого использования. У лиственниц соматический эмбриогенез был получен у нескольких видов. Первоначально у гибридных лиственниц *Larix x eurolepis* Henry (*L. decidua* x *L. Kaempferi*) и *Larix x marschlinsii* Coaz (*L. kaempferi* x *L. decidua*) (Klimaszewska, 1989).

С тех пор соматический эмбриогенез был получен у лиственницы европейской (*L. decidua* Mill.) (Cornu, Geoffrion 1990; von Aderkas et al, 1990; Szczygieł 2005), лиственницы японской (*L. kaempferi* Gond.) (von Aderkas et al, 1990; Kim et al, 1999), лиственницы западной (*L. occidentalis* Nutt.) (Thompson, von Aderkas 1992), восточной лиственницы *L.laricina*) (Klimaszewska et al, 1997) и совсем недавно для лиственницы сибирской (*L. sibirica*) (Третьякова и др., 2012) (Lelu-Walter M. A. et al, 2016).

Необходимым условием для запуска соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* у видов *Larix*, также как и у других видов хвойных, является растяжение соматических клеток зиготического зародыша и возникновение у них полярности, которое возникало, вероятно, под действием 2.4-Д и их асимметричное деление (прямой путь) (Третьякова, Пак, 2018).

### **1.6. Соматический эмбриогенез *Larix sibirica***

Исследование соматического эмбриогенеза у сибирских видов лиственницы проводятся Институтом леса СО РАН им В.Н. Сукачева. Основанием для данных исследований послужило то, что лиственница является основным лесообразователем, ее древесина считается более устойчивой к гниению, имеет высокую механическую прочность - пользуется высоким спросом. Однако при выращивании на плантациях лиственница сибирская дает

низкий урожай семян и так же поражается сильно лиственничной почковой галлицей *Dasyneura laricis* F. Lw (Баранчиков, 1995).

Соматический эмбриогенез был индуцирован у лиственницы сибирской из клеток зиготических зародышей введенных в культуру *in vitro*, и является, как и у всех хвойных, многоступенчатым процессом, включающий:

- Индукцию эмбриогенной ткани;
- Пролиферацию эмбриогенной ткани;
- Созревание соматических зародышей;
- Прорастание зародышей и формирование растений — регенерантов (Пак, Третьякова, 2018).

Процесс заканчивается формированием биполярной структуры зародыша. несущего на одном конце гипокотилия семядоли и апекс побега, а на другом — зародышевый корешок (Белоруссова, Третьякова, 2008).

## 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объекты исследования

В качестве объекта исследования были взяты два дерева-донора лиственницы сибирской *Larix sibirica*, произрастающие в дендрарии Института леса им. В. Н. Сукачева СО РАН. Возраст деревьев 50 лет.

Лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb) относится к:  
отделу Хвойные (*Pinophyta*)  
классу Хвойные (*Pinopsida*)  
порядок Сосновые (*Pinales*)  
семейство Сосновые (*Pinaceae*)  
род Лиственница (*Larix*).

Систематика рода *Larix* сложна. Это объясняется активной гибридизацией её в природных условиях и слабо проявляющейся репродуктивной изоляцией у видов. До настоящего времени нет общего мнения о числе видов лиственницы. Например, В.Н. Сукачев выделял 14 видов, Комаров В.Л. – 25, Дылис Н.В. – 20, Бобров Е.Г. - 16 и т.д. (Милютин, 2003).

Лиственница – основной, наиболее распространенный лесообразователь России. Площадь, занимаемая лиственничниками - 278 млн. га, что составляет около 40% всей лесопокрытой площади страны. Наиболее изученным видом на территории России является лиственница сибирская, насаждения которой занимают примерно 14% всех лиственничных лесов страны (Рысин, 2010; Милютин, 2003).

На западе ареал лиственницы сибирской начинается от берегов Белого моря и Онежского озера. Северная граница распространения вида пересекает Полярный Урал примерно на 68° с.ш.; в Сибири он доходит до низовьев р. Енисей. Южная часть ареала на территории Европейской части России охватывает бассейны рек Унжи и Ветлуги. где чаще встречается в виде примеси

к сосновым лесам. Так же в составе сосновых боров растет в низовьях р. Вятки и в бассейне р. Кама.

Лиственница сибирская обитает на склонах Урала, преимущественно, в качестве примеси к сосне. Произрастает также в Западной Сибири, Средне - Сибирском плоскогорье до южного Забайкалья, Алтае; встречается на территории северо-западной Монголии (Рысин, 2010).

Лиственница сибирская достигает в высоту 30-40 м, диаметр ствола 80-100 см. Крона молодых деревьев пирамидальная, позже становится овально-округлой. Кора на старых стволах серовато-бурая толстая, с продольными трещинами, глубоко-бороздчатая; на молодых — гладкая, светло – соломенного цвета. Верхушечные почки широко-конические; боковые — полушаровидные, желтовато-бурые. Хвоя мягкая, светло-зелёная, с сизоватым налётом, собрана по 30—40 штук в пучке, осенью хвоинки, как и у других видов лиственницы, опадают. Мужские колоски (микростробилы) одиночные, расположены на концах укороченных побегов: женские — широкояйцевидно - конические. длиной 10-15 мм, пурпурные или розовые. Опыление происходит в апреле-мае. Шишки яйцевидные или продолговато-овальные, сначала пурпурного, затем светло-бурого или светло-жёлтого цвета, длиной 2-4 см. Семена косо-обратнояйцевидные, мелкие, длиной 2-5 мм, шириной 3-4 мм (Комаров, 1934).

Лиственница сибирская является одним из самых светолюбивых древесных видов, причем в южных районах своего ареала менее требовательна к свету, чем в северных районах. Холодостойка и морозоустойчива, мало требовательна к влажности воздуха и почвы. Обитает на почвах с разными и химическими и механическими свойствами (Рысин, 2010; Дылис, 1947).

Лиственница сибирская характеризуется значительной полиморфностью. При этом сильной изменчивостью охвачены не только признаки мелкие и второстепенные, но и такие, которые в систематике лиственниц имеют главнейшее диагностическое значение, такие, как размер и форма шишек, число чешуй в них, размер чешуй и их форма, размер семян и их летучек и др. Значительной изменчивостью характеризуются так же и некоторые эколого-

биологические черты вида, в том числе имеющие такое крупное жизненное значение, как, например, всхожесть и энергия прорастания семян, сроки созревания семян, быстрота и совершенство вылета их из шишек (Дылис, 1947).

*Larix sibirica* декоративна, хорошо переносит задымленность и загазованность воздуха, обладает высокой газопоглощительной способностью, поэтому часто используется в озеленении городов. Древесина отличается большой плотностью и твердостью, значительно превосходит по качественности древесину других хвойных видов. Древесина устойчива против гниения, в связи с этим использовалась в подводных сооружениях, при изготовлении железнодорожных шпал, столбов для линий связи и электропередач и т.д. Так же древесина, кора используются в качестве сырья для химической переработки. В горных условиях лиственница предотвращает эрозию на склонах, ослабляя размыв и сохраняя почвенный слой (Рысин, 2010).

Лиственнице сибирской свойственна неравномерность урожаев в многолетнем цикле и низкое качество семян (Третьякова, 2013). Помимо этого, деревья поражаются лиственничной почковой галлицей, так же оказывающей отрицательное влияние на урожай семян (Баранчиков, 1995).

## **2.2. Методы исследования**

### **Индукция эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ).**

Для инициации соматического эмбриогенеза из зиготических зародышей лиственницы использовали базовую среду АИ (Третьякова, 2012). В качестве регуляторов роста применяли 2.4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2.4-Д) ( $2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ) и 6-бензиламинопурина (6-БАП) ( $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ). Водородный показатель среды приводили к 5.8 до автоклавирования. В каждой чашке Петри культивировали по 10 зародышей на 20 мл индукционной среды в темноте при  $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

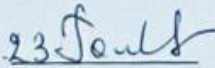
Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра водных и наземных экосистем


УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ М.И. Гладышев  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 г.


**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

**06.03.01 – Биология**

«Инициация соматического эмбриогенеза у *Larix sibirica*»

Руководитель 13.06.23  профессор, д.б.н. Т.И. Голованова  
подпись, дата

Консультант 13.06.23  профессор, д.б.н. И.Н. Третьякова  
подпись, дата

Выпускник 13.06.23  Д.А. Титова  
подпись, дата

Красноярск 2023