

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_

подпись инициалы, фамилия

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Оптимизация технологии соматического эмбриогенеза плюсовых деревьев  
*Pinus sylvestris* L.

06.04.01. Биология

06.04.01.02. Физиология растений

Научный руководитель	_____	проф., д-р. биол. наук.	Т. И. Голованова
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Научный руководитель	_____	проф., д-р. биол. наук.	И. Н. Третьякова
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		М. А. Носкова
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	ст. науч. сотр., канд. биол. наук	А. С. Казаченко
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2018

## РЕФЕРАТ

Выпускная магистерская диссертация по теме «Оптимизация технологии соматического эмбриогенеза плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L.» изложена на 82 страниц, состоит из введения, 3 глав, заключения, библиографического списка, списка сокращений, списка опубликованных работ и содержит 14 иллюстраций, 3 таблицы, 1 формулу и 2 приложения. Библиографический список включает 60 источников литературы на русском языке и 54 – на английском.

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ, СОСНА ОБЫКНОВЕННАЯ, ЭМБРИОГЕННЫЕ ЛИНИИ, ФОРМЫ НЕОРГАНИЧЕСКОГО АЗОТА, ПРОЛИФЕРАЦИЯ, СИНХРОНИЗАЦИЯ ЭМБРИОГЕННЫХ МАСС, СОЗРЕВАНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ ЗАРОДЫШЕЙ, IN VITRO.

**Цель работы** – освоение и оптимизация технологии соматического эмбриогенеза плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L.

### **Задачи:**

1. Подобрать оптимальные соотношения неорганических форм азота в питательных средах для пролиферации и сохранения эмбриогенных масс.
2. Выявить наиболее эффективные условия предобработки и созревания;
3. Установить факторы, негативно влияющие на созревание соматических зародышей;
4. Получить семядольные зародыши и регенеранты.

**Объект исследований** – стабильно-пролиферирующие эмбриогенные линии №№ 28, 41 и 911 сосны обыкновенной, полученные в 2012-2014 гг. в лаборатории биотехнологии с/х и лесных культур ИАЭТ ФГБОУ ВПО Красноярского ГАУ в процессе инициации соматического эмбриогенеза.

В процессе работы были подобраны наиболее оптимальные значения соотношения форм неорганического азота индивидуально для каждой линии, выявлены наиболее эффективные условия и установлены негативные факторы для предобработки эмбриогенных масс и созревания соматических зародышей,

получены семядольные зародыши и их проростки. В ходе обсуждения результатов были сформулированы проблемы, выявленные во время исследований, и намечены планы их решения.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	6
1. Обзор литературы .....	10
1.1. Краткая характеристика вида .....	10
1.1.1. Биология вида.....	10
1.1.2. Хозяйственное значение .....	11
1.2. Перспективы соматического эмбриогенеза в решении проблемы воспроизводства лесов сосны обыкновенной .....	12
1.3. Селекционные генотипы сосны обыкновенной.....	14
1.4. Понятие соматического эмбриогенеза.....	17
1.5. История соматического эмбриогенеза у хвойных в России.....	18
1.6. Программа многосортного лесоводства (MVF) как международный опыт использования соматического эмбриогенеза в лесном хозяйстве .	20
1.7. Особенности соматического эмбриогенеза у хвойных.....	21
1.7.1. Этапы соматического эмбриогенеза .....	22
1.7.2. Исследования соматического эмбриогенеза .....	24
1.7.2.1. Роль азота .....	27
1.7.2.2. Регуляторы роста растений .....	29
1.8. Соматический эмбриогенез у сосны обыкновенной .....	33
2. Объект и методы исследования .....	35
2.1. Характеристика объекта исследования .....	35
2.1.1. Морфолого-анатомические характеристики эмбриогенных масс	36
2.2. Контроль над морфолого-анатомическим развитием эмбриональных структур .....	37
2.3. Оптимизация культуральной среды по соотношению форм неорганического азота для пролиферации и сохранения эмбриогенных масс .....	38
2.4. Предобработка (синхронизация) эмбриогенных масс .....	41
2.5. Созревание соматических зародышей .....	42

2.6. Проращивание и укоренение семядольных соматических зародышей	43
2.7. Дезинфекция помещения и подготовка рабочего места	44
2.8. Статистическая обработка данных	45
3. Результаты и обсуждение	46
3.1. Оптимизация культуральной среды по соотношению форм неорганического азота для пролиферации и сохранения эмбриогенных масс	46
3.2. Предобработка (синхронизация) эмбриогенных масс	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3. Созревание соматических зародышей	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.4. Проращивание и укоренение семядольных соматических зародышей	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Выводы	47
Список сокращений	49
Список использованных источников	50
Список опубликованных работ	66
Приложения	68

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Наиболее важным лесобразующим видом в Сибири является сосна обыкновенная. Она имеет огромное биосферное значение (противоэрозийное, водоохранное, климаторегулирующее), является хозяйственно значимым и экономически важным видом.

Из-за продолжительного жизненного цикла сосна оказывается наиболее уязвимой в условиях быстрых изменений среды обитания, связанных с человеческой деятельностью.

Изменение климата, наблюдаемое в последние десятилетия, пожары, усиление антропогенной нагрузки: рост городов, увеличение техногенных выбросов, рост лесозаготовок – ведет к ослаблению жизненного потенциала и деградации лесов, к сокращению лесных площадей. Возникает необходимость проведения лесовосстановительных мероприятий (О состоянии..., 2013).

Поскольку сосна обыкновенная *in vivo* вегетативно не размножается, основным способом для этого вида является семенное размножение.

Проблема лесовосстановления в последние годы все чаще осложняется нехваткой качественного семенного материала вследствие снижения репродуктивных способностей сосны обыкновенной в условиях стресса (Третьякова, Носкова, 2004; Носкова, Третьякова, 2011). В связи с этим, становится актуальным использование биотехнологических методов размножения сосны обыкновенной (Доронин, 2014) в частности, путем соматического эмбриогенеза (Третьякова и др., 2007). Эта технология позволяет получить сортоклоны на основе селекционных генотипов сосны обыкновенной со свойствами, заранее отобранными в естественных древостоях или с заданными путем трансгенных манипуляций, отличающихся устойчивостью к негативным факторам окружающей среды, обладающих экономически полезными свойствами (Park, 2010). Используя местный генетический материал можно получать сорта с высокой адаптированностью к погодно-климатическим условиям отдельных территорий. Особенно

привлекает идея создания высокопродуктивных плантаций сосны обыкновенной целевого назначения на принципах непрерывного, равномерного и неистощительного пользования лесом, размещая их на территориях прежних вырубок, расположенных вблизи населенных пунктов с развитой инфраструктурой, и не затрагивая территории девственного леса (Носкова, 2013).

Таким образом, данная технология имеет не только научное значение, но также будет способствовать решению экологических, экономических и социальных вопросов края и Сибири в целом.

**Цель работы** – освоение и оптимизация технологии соматического эмбриогенеза плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L.

**Задачи:**

1. Подобрать оптимальные соотношения неорганических форм азота в питательных средах для пролиферации и сохранения эмбриогенных масс;
2. Выявить наиболее эффективные условия предобработки и созревания;
3. Установить факторы, негативно влияющие на созревание соматических зародышей;
4. Получить семядольные зародыши и регенеранты.

Исследования проводились при поддержке грантовой программы «У.М.Н.И.К.» (номер договора 2391ГУ1/2014) в Инновационно-научной лаборатории биотехнологии с/х и лесных культур ИАЭТ Красноярского ГАУ.

**Научная новизна.**

- Впервые в условиях Сибири для сосны обыкновенной были проведены эксперименты:

- по освоению и оптимизации технологии соматического эмбриогенеза;
- по получению соматических зародышей и регенерантов;

- В экспериментах по получению соматического эмбриогенеза сосны обыкновенной впервые использовали плюсовые генотипы, произрастающие на территории Ангарской лесосеменной плантации Тальцинского лесничества Ангарского лесхоза Иркутской области.

**Практическая значимость.** Полученные данные представляют интерес при дальнейшем исследовании соматического эмбриогенеза данного вида. Проведенные эксперименты являются базовой работой и в дальнейшем будут основой для высокопродуктивного плантационного лесовыращивания сосны обыкновенной в Сибири.

**Апробация работы.** Материалы, составляющие основу диссертации, были представлены на:

1. XXI Международной экологической студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий» (Новосибирск, 2016 г., Новосиб. гос. ун-т.). Сертификат участника;
2. XX Международной научной школе-конференции студентов и молодых ученых «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий» (Абакан, 2016 г., ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет» им.Н.Ф. Катанова). I-е место в секции «Флора, растительность и экология растений южной Сибири и сопредельных территорий»;
3. XXII XXI Международной экологической студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий» (Новосибирск, 2017 г., Новосиб. гос. ун-т.). Сертификат участника.
4. Годичном собрании ОФР. Научная конференция и школа для молодых ученых “Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты” (Крым, Судак, 18-24 сентября 2017 г.). Стендовый доклад. Сертификат участника.
5. VII международном культурно-историческом форуме "Историко-культурное наследие как ресурс социокультурного развития" – «Сибир Ил»; секция «Экология жизни. Здоровое поколение» (29.06-3.04.2017, Учебный центр РусГидро);
6. Агропромышленном форуме – демонстрация и представление экспонатов эмбриогенных линий сосны обыкновенной, сосны сибирской и кедрового стланика (Красноярск, 15-17 ноября 2017 г.);



**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 6 работ (см. Список опубликованных работ, стр. 80).

**Благодарности.** Автор выражает искреннюю признательность и глубокую благодарность своему руководителю зав. лаб., канд. биол. наук. Н.Е. Носковой за предоставленную возможность в проведении исследования по данной теме в лаборатории биотехнологии с/х и лесных культур, за всестороннюю помощь в проведении экспериментов, в обсуждении результатов исследований и подготовке магистерской диссертации. Так же автор искренне благодарит своих научных руководителей проф., д-р биол. наук Т.И. Голованову и проф., д-р биол. наук. И.Н. Третьякову за всемерную помощь, терпение и ценные советы; коллегу по лаборатории, студента 4 курса ИФБиТ М.А. Аксиненко за оказанную помощь в проведении исследований.

# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Краткая характеристика вида

### 1.1.1. Биология вида

Сосна обыкновенная – основной лесообразователь Сибири, играет важную экономическую и средообразующую роль (Шейкина и др., 2013), имеет огромное биосферное значение.

Сосна обыкновенная – вечнозеленое однодомное хвойное дерево семейства сосновых. В естественных условиях размножается только семенами. В высоту достигает 40 м. Кора красно-бурая, на ветвях желтоватая, отслаивающаяся. Почки удлинённо-яйцевидные, заостренные, длиной 6-12 см, смолистые, окруженные треугольно-ланцетовидными чешуями с прозрачным пленочным краем. Хвоя располагается попарно, сизо-зеленая, несколько изогнутая, жесткая, длиной 4 - 7 см, сохраняется на побегах 2 - 3 года. Мужские шишки многочисленные, желтые, собранные у основания побегов текущего года, женские – красноватые, одиночные или сидячие по 2 - 3 на загнутых книзу коротких ножках. Пыление происходит в мае-июне, семена созревают на второй год. После оплодотворения шишки разрастаются, деревенеют, созревают в течение 18 мес. Семена удлинённо-яйцевидные, длиной 3 - 4 мм, с крылом, длина которого в 3 раза превышает длину семени (Чиков, 1983).

Для особей сосны обыкновенной характерен быстрый рост, особенно в молодом возрасте (до 30 - 40 лет): прирост в высоту в благоприятных почвенно-климатических условиях достигает 70 - 80 см в год. Продолжительность жизни сосны обыкновенной составляет 350 - 400 лет (Чиков, 1983), отдельные деревья могут достигать 570 (Буш, 1959), и даже 600 лет (Альфа и Омега..., 1991).

Сосна обыкновенная характеризуется высоким адаптивным потенциалом, что позволяет этому виду занимать обширный ареал с разнообразными экологическими условиями: довольствоваться низким уровнем влажности

воздуха, малыми запасами воды и питательных веществ в почве; существовать в условиях крайнего севера при абсолютном зимнем минимуме температуры воздуха  $-60^{\circ}\text{C}$  и в субтропических районах при абсолютном максимуме  $+40^{\circ}\text{C}$  и выше, в условиях полярного длинного дня и короткого дня юга, короткого вегетационного периода на севере и продолжительного на юге, а так же, произрастать на болотах и сухих песках. Ареал сосны обыкновенной простирается на материке Евразии от  $70^{\circ}$  до  $37^{\circ}$  с. ш. и от  $7^{\circ}$  з. д. до  $126^{\circ}$  в. д., поднимается в горы на высоту до 2100 м н.у.м. Если на самых северных местообитаниях сосна образует лишь небольшие насаждения или встречается отдельными деревьями, то на южной границе ареала произрастает в виде изолированных островных боров, отстоящих друг от друга на больших расстояниях (Правдин, 1964).

Из-за большой протяженности ареала, характеризующегося значительным разнообразием экологических условий, сосна имеет высокую морфологическую изменчивость и образует большое число форм, различающихся по строению и качеству древесины, характеристик хвои, побегов, шишек (Правдин, 1964). В пределах данного вида выделяют подвиды: *P. sylvestris* L. ssp. *sylvestris*, *P. s. ssp. sibirica*, *P. s. ssp. kulundensis*, *P. s. ssp. lapponica*, *P. S. ssp. ursina* и *P. s. ssp. amurensis* (Кузьмина, 1982; Кузьмина, 1997; Орлова, 2000). При изучении внутривидовой изменчивости древесных пород описаны 84 климатипа сосны обыкновенной на территории бывшего СССР (Кузьмина, 1982; Кузьмина, 1997).

### **1.1.2. Хозяйственное значение**

Хозяйственное значение сосны обыкновенной исключительно велико. Древесина ее обладает высокими техническими качествами и широко используется в строительстве, идет на шпалы, телеграфные столбы, крепежный лес и т. д. (Букштынов, 1981).

Сосна широко используется в химической промышленности, медицине и косметологии (Букштынов, 1981). Из древесины добывают живицу, получают скипидар, канифоль, деготь, древесный уксус и уголь (Чиков, 1983). Из хвои получают «сосновую шерсть», хлорофиллокаротиновую пасту, витамин С, витаминную хвойную муку для подкормки сельскохозяйственных животных и домашней птицы (Букштынов, 1981).

Значение древесины сосновых как идеального по своим техническим качествам столярного и строительного материала особенно возросло за последние два столетия, когда расширяющаяся механизация производства потребовала максимально однородного сырья. Однако наибольшее значение приобрела древесина сосновых в целлюлозно-бумажной промышленности, где ценится длинное волокно (Чавчавадзе, Яценко-Хмелевский, 1978).

Таким образом, сосна обыкновенная является хозяйственно ценным и экономически важным видом в России.

## **1.2. Перспективы соматического эмбриогенеза в решении проблемы воспроизводства лесов сосны обыкновенной**

Интенсивная эксплуатация лесов, ухудшение экологических условий, пожары ведут к ослаблению жизненного потенциала и деградации лесов, к сокращению лесных площадей. Так по данным государственного лесного реестра в период с 2012 по 2015 гг. площадь древостоев сосны обыкновенной в России сократилась на 922 тыс. га и составила 15,5% всей площади земель, занятых лесными насаждениями (рис. А.1, О состоянии ..., 2013; О состоянии ..., 2017). Доступные для эксплуатации продуктивные спелые и перестойные леса в значительной степени истощены в результате интенсивного использования, а остальные расположены в основном на удаленных и труднодоступных территориях, в неблагоприятных климатических условиях на бедных мерзлотных почвах с избыточным увлажнением (О состоянии ..., 2013). Причины стремительного сокращения сосновых лесов связывают с

недостаточной обеспеченностью подростом приспевающих и спелых сосняков (Хатмуллин, 2011). Таким образом, естественное воспроизводство лесов сосны обыкновенной не поспевает за ростом хозяйственных потребностей и последствиями отрицательных антропогенных воздействий (О состоянии..., 2013). Все это приводит к необходимости проведения эффективных лесовосстановительных мероприятий. В России преобладающим способом лесовосстановления остается содействие естественному возобновлению (около 75%), и лишь около 22% приходится на долю плантационного лесовыращивания. А доля лесных культур, созданных на основе селекционного посадочного материала (с улучшенными наследственными свойствами) составила в 2016 г. 2,4% (О состоянии ..., 2017). В тоже время доказано, что наиболее надежным способом получения высокопродуктивных насаждений являются именно лесные культуры (Ловков, 2007).

Поскольку сосна обыкновенная в естественных условиях вегетативно не размножается, основным способом для этого вида является семенное размножение. В последние годы лесовосстановление все чаще осложняется нехваткой качественного семенного материала. В связи с этим, становится актуальным использование современных методов биотехнологии размножения, одним из которых является соматический эмбриогенез. Эта технология позволяет получить сортовой посадочный материал (сомаклоны) на основе селекционных генотипов сосны обыкновенной со свойствами, заранее отобранными в естественных древостоях или с заданными путем трансгенных манипуляций, отличающихся устойчивостью к негативным факторам окружающей среды и обладающих экономически полезными свойствами. Используя местный генетический материал, можно получать сорта с высокой адаптированностью к погодно-климатическим условиям отдельных территорий. Особенно привлекает идея создания высокопродуктивных плантаций сосны обыкновенной целевого назначения на принципах непрерывного, равномерного и неистощительного пользования лесом, размещая их на территориях прежних вырубок, расположенных вблизи населенных пунктов с развитой

инфраструктурой, и не затрагивая территории девственного леса (Носкова, 2013).

Таким образом, соматический эмбриогенез является одним из самых перспективных методов микроклонального размножения хвойных, поскольку позволяет получать и длительно сохранять гермоплазму на основе селекционных генотипов с важными экологическими и экономическими свойствами и выращивать из нее высококачественный посевной материал.

### **1.3. Селекционные генотипы сосны обыкновенной**

Для успешной реализации плантационного лесовыращивания необходимо создание высокопродуктивных сортов, отличающихся высокой пластичностью и устойчивостью к стрессовым факторам. Результативность данной работы может быть обусловлена использованием методов традиционной селекции в сочетании с современными биотехнологическими приемами, такими как соматический эмбриогенез (Lelu-Walter et al, 2013).

Следовательно, при использовании биотехнологии соматического эмбриогенеза для получения высококачественного посадочного материала наибольший интерес представляют плюсовые и элитные деревья.

Проведение генетико-селекционных работ в лесных хозяйствах на территории России, тогда еще в Советском союзе, развернулось в 60х годах XX века. В те годы в большинстве стран стала популярной идея о значительном повышении продуктивности лесов за счет использования потомства отобранных в естественных древостоях генотипов, обладающих преимущественными экономически полезными свойствами. В естественных древостоях изыскивались высокопроизводительные деревья, которые впоследствии выносились на клоновые и/или семенные плантации, служащие в настоящее время генетическими резерватами уникальных деревьев (Рогозин, 2013).

Ученые Дании и Швеции в начале 50 годов предложили термины,

подразделяющие насаждения и деревья на селекционные категории исходя из их фенотипов: плюсовые, лучшие, нормальные, минусовые (Рогозин, 2013). В России при селекционной инвентаризации деревья подразделяют на три основные категории: плюсовые, нормальные и минусовые (Царев и др., 2003). Плюсовые деревья – это деревья, значительно превосходящие по одному или комплексу хозяйственно ценных признаков и свойств окружающие деревья одного с ними возраста и фенологической формы, растущие в тех же условиях. Нормальные деревья – это деревья, составляющие основную часть насаждения, хорошие и средние по росту, качеству и состоянию. Минусовые деревья – это низкокачественные с различными пороками и дефектами (кривоствольность, многовершинность, вильчатость, сильная сучковатость, фаутность и т.д.) деревья верхнего яруса, а также деревья, отставшие в росте и имеющие высоту и диаметр в одновозрастном насаждении менее 80% от среднего или усыхающие (Царев и др., 2003).

В категорию плюсовых отбирают прямоствольные, полнодревесные, деревья с хорошим очищением стволов от сучьев и отсутствием вильчатости, устойчивые к неблагоприятным факторам среды, вредителям и болезням (Родин и др., 2009). В одновозрастных, чистых по составу высокополнотных насаждениях плюсовое дерево должно превышать средние показатели древостоя не менее чем на 10 % по высоте, и на 30 % по диаметру, а при селекции на интенсивность роста и продуктивность биологической массы соответственно на 15 и 60 - 70 %; в разновозрастном насаждении к плюсовому дереву относят и менее крупные по диаметру, но более молодые деревья, с хорошим качеством ствола, кроны, высоким приростом по высоте и диаметру. На каждое плюсовое дерево составляют паспорт и ставят на государственный учет, как особый генофонд (Родин и др., 2009).

При селекции сосны обыкновенной используют следующие основные критерии:

- высокая продуктивность;
- устойчивость к болезням (пузырчатой ржавчине, корневой губке,

шютте, сосновому вертуну и др.) и вредителям (подкорковому клопу, сосновому пилильщику и т.п.);

- достаточная репродуктивная воспроизводимость;
- хорошая форма ствола и высокое качество древесины;
- некоторые другие особые свойства, например высокая смолопродуктивность или засухоустойчивость.

Для создания насаждений плантационного типа, уместно получение сортов-клонов и сортов-гибридов, которые реализуют свой высокий потенциал зачастую только при определенных условиях, например высоком агрофоне (Царев и др., 2003).

В лесном фонде Красноярского края зарегистрировано 369 плюсовых деревьев сосны обыкновенной, из которых 42% деревьев располагаются в эксплуатационных лесах, 1,4% – в заказнике, 2,2% – в лесах степной и малолесистой горной территории, 11,9% – в нерестоохраняемых лесах, 1,1% – в водоохраняемых лесах, 18,2% – зеленой лесопарковой зоне, 19,8% – в плюсовом насаждении Енисейского лесничества (участковое Епишенское лесничество, расположено на 18 га), 0,3% – в защитных полосах вдоль автодороги, 0,5% – в лесах, имеющих научное / историческое значение, 2,7% – в запретных полосах вдоль водных объектов (Сведения ..., 2012). Таким образом, на территории Красноярского края отсутствуют клоновые архивы плюсовых деревьев сосны обыкновенной, и все плюсовые деревья расположены в естественных древостоях различного назначения на значительном расстоянии друг от друга.

В Иркутской области еще в 70-х г. были организованы лесосеменные плантации, куда были вынесены плюсовые деревья и заложены маточники и архивы клонов для сохранения ценных селекционных генотипов и получения улучшенного семенного материала. Итак, на сегодняшний день лесосеменные плантации сосны обыкновенной расположены на площади 73 га – это постоянные лесосеменные участки сосны обыкновенной в Кировском и Ангарском лесничестве (Щербаков, 2012).



Таким образом, здесь уже проведены предварительные селекционные работы, и созданы лесосеменные плантации 1-го и 2-го поколения, которые являются перспективными источниками селекционного материала сосны обыкновенной для получения на основе биотехнологии соматического эмбриогенеза высокопродуктивных и обладающих другими ценными свойствами сортоклонов, предназначенных для создания искусственных высокотехнологичных насаждений.

#### **1.4. Понятие соматического эмбриогенеза**

Микроклональное размножение растений – вегетативное размножение в условиях *in vitro*, – может осуществляться через органогенез и путем соматического эмбриогенеза (Митрофанова и др., 2014).

Соматический эмбриогенез – асексуальный способ микроклонального размножения, процесс регенерации целого растения, идентичного материнскому генотипу, из одной соматической клетки (Батыгина, 1987; Третьякова и др., 2012), являет собой наиболее яркое свидетельство тотипотентности растительной клетки, как фундаментальной основы биологии высших растений (Митрофанова, 2009). Многие дифференцированные клетки растительного организма сохраняют способность к перепрограммированию или трансдифференциации для дальнейшего существования в новом качестве (Pullman, Bucalo, 2014). Соматический эмбриогенез – это получение *de novo* структур, подобных зиготическим зародышам, которые имеют биполярную структуру, т.е. обладают корневым и стеблевым полюсами. Соматические зародыши можно получить путем прямого или непрямого эмбриогенеза (через формирование каллуса; Генетические..., 2012). Это способ массового тиражирования генотипов, посредством которого может быть достигнута чрезвычайно высокая частота регенерации растений в культуре *in vitro* (Третьякова и др., 2013; Митрофанова и др., 2014).

Исследования, направленные на глубокое изучение процессов соматического эмбриогенеза в условиях *in vitro*, весьма актуальны, так как соматический эмбриогенез представляет собой уникальную модельную систему для исследования различных физиологических процессов, факторов, влияющих на морфогенез и развитие зародыша (Митрофанова и др., 2014). С помощью соматического эмбриогенеза можно изучать развитие морфогенетических программ (индукция, пролиферация, детерминация и дифференциация), проводить молекулярные исследования (изучение функции генов) (Барсукова, 2011).

### **1.5. История соматического эмбриогенеза у хвойных в России**

Первые растения-регенеранты у голосеменных через соматический эмбриогенез были получены в 1985 г. Накман and von Arnold у *Picea abies* (L.) Н. Karst. и *Larix deciduas* Mill. (Klimaszewska, D. R. Smith, 1997). До настоящего времени, регенерация растений посредством соматического эмбриогенеза у хвойных получена у 27 видов рода *Pinus* (Pullman, Bucalo, 2014), у 11 видов рода *Picea*, у 4 видов и 2 гибридов рода *Abies*, у 6 видов и гибридов рода *Larix*, а также у *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (Klimaszewska, Cyr, 2002).

Работы по соматическому эмбриогенезу хвойных в России начались в конце 80-х гг. прошлого века в Санкт-Петербургском научно-исследовательском институте лесного хозяйства. Коллектив ученых во главе с канд. биол. наук Г.А. Ширяевой занимался исследованиями клонального микроразмножения ели европейской, в том числе, на основе соматического эмбриогенеза тканей зиготического зародыша (Шабунин, 2014). Исследования соматического эмбриогенеза у хвойных в России шли в ногу с работами ведущих зарубежных исследователей. За короткий срок были достигнуты значительные успехи (Божков и др., 1992; Ширяева и др., 1992), получено авторское свидетельство на изобретение (Пат., 1992), успешно защищена диссертация кандидата биологических наук (Божков, 1994). Проведенная работа

явилась первым опытом успешной адаптации соматических проростков ели обыкновенной *in vivo* для северных регионов (Божков, 1994). Таким образом, работа была выполнена на высоком международном уровне и явилась пионерной для делающей первые шаги, лесной биотехнологии России. Результатами работы не только были подтверждены выдвинутые зарубежными коллегами закономерности, но и получены новые данные, послужившие основой для дальнейших исследований.

В это же время вышла статья В.И. Долголикова и И.И. Попившего (1992) с обсуждением положительных сторон и недостатков клоновой селекции ели. В частности среди недостатков авторы указывали на низкий уровень наследуемости ценных признаков (10...20%) посадочного материала, полученного через соматический эмбриогенез. Однако за рубежом работы П.В. Божкова и его коллег были замечены и получили высокую оценку. Там технология соматического эмбриогенеза для размножения и сохранения хвойных видов развивалась довольно интенсивно, в некоторых странах были приняты государственные программы по проведению мероприятий в этом направлении и с использованием данной технологии. Когда в 90-е годы работы по соматическому эмбриогенезу у хвойных в России прекратились, П.В. Божков продолжил свои дальнейшие исследования уже в качестве профессора Шведского университета сельскохозяйственных культур (Swedish University of Agricultural Sciences).

Работы по соматическому эмбриогенезу хвойных в России возобновились в начале XXI века в 2003 в г. Красноярске в Институте леса им. В.Н. Сукачева СО РАН под руководством д-р биол. наук, профессора И.Н. Третьяковой и позже с 2011 г. в лаборатории БСХиЛК КрасГАУ г. под руководством канд. биол. наук Н.Е. Носковой. За годы исследований были индуцированы соматические зародыши у лиственницы сибирской (Белоруссова, Третьякова, 2008; Третьякова и др., 2012), лиственницы Гмелина и лиственницы Сукачева (Барсукова, 2011; Третьякова и др., 2012), кедра сибирского (Третьякова, Ижболдина, 2009; Третьякова и др., 2013), ели аянской (Третьякова и др., 2009)

и кедрового стланика (Носкова и др., 2012; Третьякова, Шуваев, 2015), сосны обыкновенной (Носкова, 2013), пихты сибирской (Бажина, 2012).

### **1.6. Программа многосортного лесоводства (MVF) как международный опыт использования соматического эмбриогенеза в лесном хозяйстве**

Соматический эмбриогенез, как способ размножения коммерчески важных хвойных видов, позволяет получать неограниченное количество генетически идентичных деревьев и служит ключевой технологией MVF через создание лесонасаждений, с использованием испытанных сортоклонов. В результате применения этой биотехнологии в программе MVF можно достичь гораздо большего генетического усовершенствования исходных генотипов, чем это возможно традиционными методами размножения древесных, при этом становится возможным достигнуть повышения продуктивности лесов с помощью собственных, а не введением чужеродных генов. MVF – быстрый и гибкий метод получения проверенных сортов деревьев, которые хорошо подходят к изменяющимся условиям окружающей среды и изменениям целей продукта, что позволяет управлять генетическим разнообразием деревьев в лесонасаждениях (Park, 2010; Park, Adams, 2014).

Международный опыт применения соматического эмбриогенеза в пропрограммах лесовосстановления и плантационного лесовыращивания насчитывает более 20 лет. За эти годы были достигнуты значительные успехи. В Бразилии высокопродуктивные плантации эвкалипта, созданные на основе соматического эмбриогенеза и занимающие всего 2% от территории всех культурных насаждений, дают 60% от общего объема всей заготавливаемой в стране древесины. В Чили и Новой Зеландии подобные плантации сосны лучистой, расположенные на 1/5 площади лесных угодий, обеспечивают производство древесины более чем на 90% от общего объема (Sedjo, 1999 цит. по Celestino et al., 2013). На сегодняшний день все существующие лесные

плантации в мире занимают только 5% от всей площади, покрытой лесами, но при этом заготовка круглого леса на этих плантациях уже составляет 35% от всей заготавливаемой древесины на мировом рынке (Celestino et al., 2013).

Программа MVF востребована, прежде всего, во всех богатых лесными запасами стран, производящих древесину на экспорт и многими другими. Это: Канада, США, Франция, Финляндия, Бразилия, Индия, Китай, Испания и др. Реализация ее в разных странах находится на разных уровнях: разработка, тестирование (BioForest и GenFor, Чили, Картер-Холт Харви, Рубикон и Rayonier, Новая Зеландия, JD Ирвинг, Канада), внедрение (SweTree Technologies, Швеция), коммерциализация. Так компании Cellfor (Канада) и ArborGen (США) имеют миллионные продажи элитных саженцев и получают высококачественную древесину на промышленных целевых плантациях (Celestino et al., 2013).

Коммерческий интерес при реализации программы приводит к объединению частных биотехнологических компаний и классических лесных корпораций с образованием крупных организаций, включающих различные структурные подразделения: лаборатории, лесные хозяйства, промышленные предприятия, институты управления бизнесом и др. Примером может служить компания ArborGen, подписавшая соглашение об объединении с International Paper, MeadWestvaco и Weyerhaeuser для производства и тестирования улучшенных сортов сосны ладанной (Celestino et al., 2013).

### **1.7. Особенности соматического эмбриогенеза у хвойных**

В качестве эксплантов для индукции соматического эмбриогенеза у хвойных используют зрелые и незрелые зародыши и их отдельные органы (семядоли и гипокотиль), мегагаметофиты, хвоя молодых растений, сегменты вегетативных побегов взрослых деревьев.

За годы исследований было установлено, что соматический эмбриогенез у хвойных, полученный из семян, характеризуется низкой частотой химер и

ограниченным уровнем соматклональной изменчивости (Solís-Ramos et al., 2012), что позволяет регенерировать большее количество растений по сравнению с органогенезом, и поэтому является более привлекательным для микроклонального размножения. Установлено, что способность к соматическому эмбриогенезу передается по материнской линии (Niskanen, 2013). Следовательно, используя семяпочки генотипов, способных к соматическому эмбриогенезу в качестве реципиентов, можно увеличивать биологическое разнообразие высокопродуктивных лесных плантаций. Кроме того, эмбриогенные массы, полученные путем соматического эмбриогенеза, можно подвергать генетической трансформации, а так же сохранять в криогенной среде в течение длительного времени без ущерба для их регенерационных способностей (Solís-Ramos et al., 2012).

### **1.7.1. Этапы соматического эмбриогенеза**

Соматический эмбриогенез у хвойных проходит в несколько этапов (Lelu-Walter et al., 2008; Patent, 2011; Farias-Soares et al., 2014):

– инициация – образование эмбриогенных культур из эксплантов на питательных средах в присутствии регуляторов роста растений. Стадия завершается формированием эмбриогенной ткани, демонстрирующей видимый рост и состоящей из отдельных клеток и клеточных агрегатов проэмбриональных структур (РЕМ I – РЕМ III), а также, ранних соматических зародышей;

– пролиферация – сохранение непрерывного роста и размножения эмбриогенных масс (увеличение свежей массы). Пролиферация сопровождается формированием непрерывно растущих эмбриогенных масс и становлением стабильных эмбриогенных линий. Эмбриогенные массы (ЭМ) могут состоять из проэмбриональных структур (РЕМ) и/или глобул соматических зародышей. На этом этапе сохранение эмбриогенных линий возможно путем

криоконсервации в жидком азоте (Kartha et al., 1988) или трансплантациями на свежие среды.

- прекультивирование – для усиления перехода РЕМ III к ранним глобулярным зародышам (требуется для культур не всех видов хвойных, например, для *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze; Farias-Soares et al., 2014);

- синхронизация – прекращение пролиферации и накопление глобул соматических зародышей;

- созревание – развитие незрелых соматических зародышей в процессе дифференциации с формированием семядолей, гипокотилия, точек роста побега и корня;

- пост-созревание – частичное высушивание семядольных соматических зародышей, предшествующее прорастанию, чтобы снизить содержание воды для завершения процесса созревания;

- прорастание соматических зародышей и преобразование в растения – начинается с роста растяжением зародышевого корешка и побега и завершается развитием корневой системы, удлинением эпикотилия и развития первичной хвои.

- ранний посткультуральный рост (рост *ex vitro*, *ex vitro*) – тесно связан с адаптацией выращенных в пробирке соматических соматклонов в условиях теплицы.

Синхронизация (предобработка) является одним из наиболее важных этапов в процессе соматического эмбриогенеза, в ходе которого из РЕМ III формируются и накапливаются глобулы (heads) с хорошо развитыми суспензорами, способные к дифференциации в семядольные зародыши (Pullman, Gupta, 1991; Lelu-Walter et al., 2008). Для достижения необходимого результата на этом этапе необходимо удалить из культивируемой ткани активные вещества, способствующие ее пролиферации, и обеспечить возможность дальнейшей тканевой дифференциации соматических зародышей. Для этого используют твердые и жидкие среды, чаще без добавления регуляторов роста или с добавлением АБК, а, иногда, АБК и ГК, а также,

абсорбенты: активированный уголь, силикагель и др. (Pullman, Gupta, 1991; Lelu-Walter et al., 2008; Patent, 2010).

### **1.7.2. Исследования соматического эмбриогенеза**

Исследования биотехнологии соматического эмбриогенеза хвойных ведутся как в прикладном (размножение коммерчески важных хвойных видов, Celestino et al., 2013), так и в фундаментальном направлении. Изучается влияние физических и химических факторов в регуляции соматического эмбриогенеза на разных этапах развития; ведется поиск маркеров соматического эмбриогенеза; изучается физиология, клеточная и молекулярная биология процесса, генетические аспекты (Niskanen 2013; Пак и др., 2016). Соматический эмбриогенез используют в качестве модельной системы для изучения закономерностей эмбриогенеза, развития программированной клеточной смерти и ее роли в ходе эмбриогенеза (Smertenko et al., 2003; Smertenko, Vozhkov, 2014).

Несмотря на большое и оправданное внимание исследователей к соматическому эмбриогенезу хвойных, достигнутые успехи в изучении этого процесса и реализации результатов, получивших уже в некоторых случаях коммерческое приложение (Celestino et al., 2013; Niskanen, 2013), остаются многие вопросы, требующие доработки, усовершенствования, поиска новых решений. Так до сих пор отклик эксплантов многих видов хвойных на индукционных средах на этапе инициации остается весьма небольшим (Pullman, Bucalo, 2014). Для решения этой проблемы ведется поиск маркеров соматического эмбриогенеза (Niskanen, 2013). Кроме того, проводятся исследования по оптимизации физико-химических условий в ходе предобработки эксплантируемого материала, непосредственно, в процессе самой инициации (Celestino et al., 2013; Pullman et al., 2015).

В ходе культивирования эмбриогенных масс хвойных на этапе пролиферации для сохранения их жизнеспособности требуются регулярные



пересадки на свежие среды через каждые 7 – 21 сут. (чаще, 7 - 14 сут.) В противном случае, в тканях происходит накопление фенольных соединений, прекращение роста и развития, деградация и некроз (Patent, 2003).

Фенольные соединения играют существенную роль в регуляции роста и развития растений, обладают высокой противорадикальной активностью, участвуют в регуляторной цепи цитокининов и в стабилизации плазматических мембран (Фуксман и др., 2005). В условиях стресса в тканях хвойных повышается уровень фенольных соединений, что интерпретируется как неспецифическая реакция на стресс (Фуксман и др., 1999). В культуре тканей инокуляция и трансплантация на новые среды является сильным стрессорным воздействием для эксплантов. В результате этих манипуляций в культивируемых тканях могут накапливаться токсичные концентрации продуктов окисления фенолов (Джафарова, 2007).

Использование жидких систем, частичное или полное замещение сахарозы мальтозой в составе среды, подбор оптимального соотношения форм неорганического азота, введение аскорбиновой кислоты в состав среды в качестве антиоксиданта, снижение концентрации регуляторов роста в среде (в первую очередь, цитокининов, БАП) позволяют снизить содержание фенольных соединений и замедлить процессы «старения» эмбрионных культур, и, следовательно, увеличить время экспозиции между трансплантациями (Patent, 2003; Cairney, Pullman, 2007; Patent, 2010; Pullman et al., 2015).

Современные исследования соматического эмбриогенеза все более ориентированы на проведение экспериментов, основанных на химическом и биохимическом анализе тканей, развивающихся в процессе, как соматического эмбриогенеза, так и эмбриогенеза *in vivo* (Pullman, Bucalo, 2014). Так, по результатам анализа минерального состава мегагаметофитов зиготических зародышей была разработана новая культуральная среда для получения соматического эмбриогенеза у *P. oocarpa* (Lara-Chavez et al., 2011). Из ткани мегагаметофита сосны вильчатой было выделено вещество, ингибирующее рост

ранних соматических зародышей. Выяснение роли этого вещества в регуляции роста и развития растений позволит значительно улучшить технологию соматического эмбриогенеза (Wu et al., 2012).

Исследованиями пошагового анализа изменений редокс-статуса зиготического зародыша и мегагаметофита были установлены две основные пары, контролирующие окислительно-восстановительный потенциал в ходе эмбриогенеза: глутатион/глутатион дисульфит и аскорбиновая кислота/дегидроаскорбат. Выявлено, что в раннем эмбриогенезе развитие зародыша протекает в условиях восстанавливающей среды, а в позднем – в условиях окислительной среды (Pullman, Bucalo, 2014). Полученные результаты были успешно использованы для усовершенствования протокола соматического эмбриогенеза у *Loblolly pine* (Pullman et al., 2015).

Вид сахара в культуральной среде может играть ключевую роль в инициации, пролиферации эмбрионной ткани и созревании соматических зародышей. Например, добавление в индукционную среду лактозы (1,5%), наряду с сахарозой (1%) и глюкозой (0,025%) привело к увеличению отклика в 3 раза (Patent, 2011).

В процессе роста эмбрионные ткани поглощают питательные вещества из культуральных сред и выделяют в них продукты метаболизма (аминокислоты, ростовые вещества, органические кислоты, полипептиды и др.). Один из таких метаболитов, инвертаза, расщепляет углевод на моносахара, которые поглощаются тканью и участвуют в обменных процессах и в формировании водного потенциала среды, что весьма важно в развитии соматического эмбриогенеза. Так сахароза в среде расщепляется на фруктозу и глюкозу, накопление которых вызывает резкое снижение водного потенциала. При полной или частичной замене сахарозы мальтозой, значение водного потенциала среды сохраняется более продолжительное время или повышается незначительно. Это может оказывать решающее значение при прохождении критических стадий развития соматического эмбриогенеза, например, при формировании верхушечной меристемы у зародыша (Pullman, Bucalo, 2014).

Таким образом, исследования соматического эмбриогенеза у хвойных на разных уровнях организации позволяют получать фундаментальные знания о закономерностях роста и развития растений и использовать эти знания на практике.

#### **1.7.2.1. Роль азота**

Азот играет важную роль в жизни растений. Это один из четырех органогенных элементов, входит в состав белков и нуклеиновых кислот пигментов, коферментов, фитогормонов и витаминов. В естественных условиях в растения поступает, главным образом, в виде нитратов (окисленная форма). В клетках растений восстанавливается до аммиака (рис. 1) и затем включается в метаболические процессы с образованием глутаминовой и аспарагиновой кислот, которые, в свою очередь, являются материалом для построения многих других аминокислот в процессах переаминирования и перестройки их углеродного скелета (Кузнецов, 2005). С того момента, как азот включается в цикл органических кислот, он может встраиваться в аминокислоты, амиды, протеины, нуклеиновые кислоты, хлорофиллы, алкалоиды, витамины, регуляторы роста растений и т.д. Не так давно, в 1995 г. Н. Singh с соавторами было выдвинуто предположение о роли нитрата, в качестве сигнальной молекулы роста растений с помощью амплифицированной экспрессии генов для ферментов, ответственных за поглощение и использование нитратов (Mashayekhi-Nezamabadi, 2000).

В культуральных средах важнейшим источником азотного питания является аммонийный азот. Его поступление в ткани и клетки и утилизация проходит значительно быстрее, так как при его использовании на построение органических веществ не требуется предварительного восстановления, как в случае с нитратами (George et al., 2008).

Однако в культуральных средах, как правило, присутствуют обе формы неорганического азота, причем, большинство сред содержат больше нитратного

азота, чем аммонийного. Известно, что в слабокислом субстрате лучше поглощаются нитраты, а в нейтральном – восстановленная, аммонийная форма. Обычно инокуляцию эксплантов проводят на культуральные среды с pH 5.4 - 5.8. В этих условиях из среды интенсивно утилизируются ионы аммония, среда постепенно закисляется. После того как pH падает до 4,2 - 4,6, поступление аммонийного азота ингибируется, но при этом стимулируется поглощение нитратного азота и pH среды постепенно повышается. Поэтому в культуре растений *in vitro*, используются, как правило, обе формы неорганического азота, что создает дополнительный баланс pH в культуральной среде (George et al., 2008).

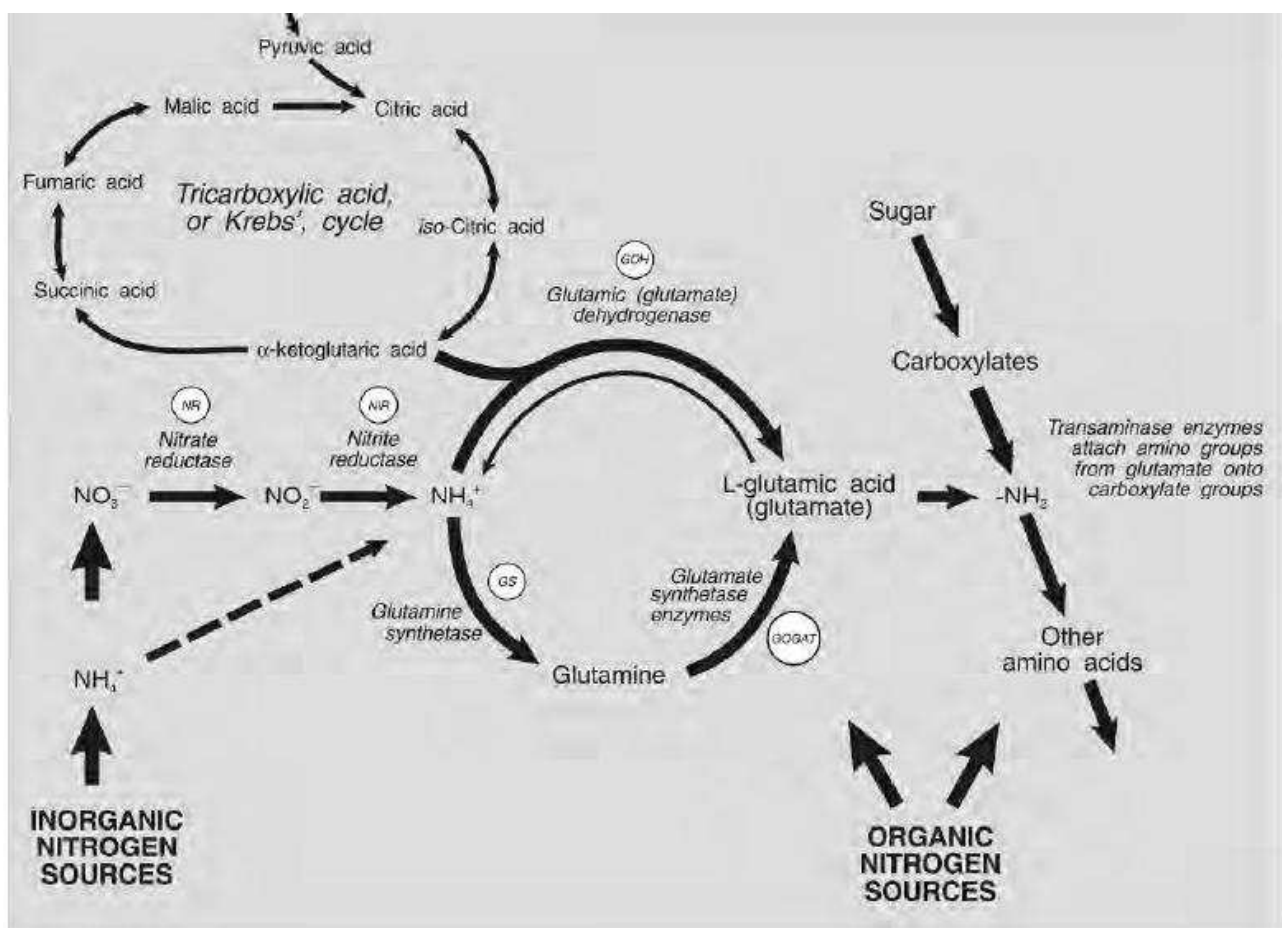


Рисунок 1 – Метаболизм ионов нитрата и аммония (George et al., 2008)

Экспериментальным путем установлено, что соотношение неорганических форм азота в культуральной среде играет ключевую роль в

процессах инициации, пролиферации, стабилизации и сохранения эмбрионных линий, вызревании зародышей (Божков 1994; Patent, 2003).

### 1.7.2.2. Регуляторы роста растений

Для получения соматического эмбриогенеза *in vitro* у хвойных используют регуляторы роста растений, присутствие которых необходимо для индукции и развития соответствующих морфогенетических программ на разных этапах процесса. К регуляторам роста растений относят органические вещества природного (в т.ч. фитогормоны) и синтетического происхождения, способные осуществлять взаимодействие клеток, тканей и органов и оказывать стимулирующие и ингибирующие действие на процессы роста и развития растительных организмов (Широков, Крюков, 2012).

Фитогормоны по функциональному действию объединяют в пять основных групп: ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизины и этилен. Гиббереллины, абсцизины и цитокинины являются производными мевалоновой кислоты, а ауксины и этилен синтезируются из аминокислот (из триптофана и из метионина и аланина, соответственно, Широков, Крюков, 2012)

Ауксины в культуре тканей вызывают рост клеток растяжением, в больших концентрациях – деление клеток, в сочетании с цитокининами – органогенез. К ним относятся гетероауксин, индолилуксусная кислота (ИУК), индолил-3-масляная кислота (ИМК), индолил-3-пропионовая кислота (ИПК), нафтилуксусная кислота (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4, 5-ТУ) и др (Лутова и др., 2010; Широков, Крюков, 2012).

Цитокинины: зеатин, кинетин (6-фурфуриламинопурин), N-(2-хлор-4-пиридил)-N'фенилмочевина (CPPU) и NN-дифенилмочевина; 6-БАП (6-бензиламинопурин), тидиазурон (TDZ) и др. в сочетании с ауксинами индуцируют митозы, пролиферацию клеток, почек и побегов (Лутова и др., 2010; Широков, Крюков, 2012).

Гиббереллины – тетрациклические карбоновые кислоты класса дитерпеноидов, стимулируют рост клеток растяжением, а также синтез ауксинов и цитокининов. Известно около 60 видов гиббереллинов. Наиболее популярным в культуре тканей является гиббереллин А3 или гибберелловая кислота (ГК) (Лутова и др., 2010; Широков, Крюкова, 2012).

Абсцизины, абсцизовая кислота (АБК) – оптически активный сесквитерпеноид, ингибитор роста растений, является антагонистом ауксинов, гиббереллинов и цитокининов. Аналогами являются лунуларовая кислота, выделенная из водорослей, а также ряд соединений, родственных АБК по структуре и проявляющих сходную биологическую активность: теаспирон, вомифолиол, блюменола, гелиангин и др. (Лутова и др., 2010; Безуглова, 2013)

Этилен – считается единственным газообразным регулятором роста растений; способен тормозить и изменять характер роста растений, блокирует транспорт ауксина. Синтетические аналоги этилена: пропилен, винилхлорид, СО, винилфторид, ацетилен, аллен, метилацетилен, 1-бутен (Лутова и др., 2010; Безуглова, 2013).

Кроме того, в последние годы открыты и получены фитогормоны, поддерживающие в норме иммунную систему растений, особенно в стрессовых ситуациях:

– Брассиностероиды (Брассинолиды), обладают биорегуляторной и ростостимулирующей активностью (биосинтез РНК, ДНК, белков и т. п., рост и деление клеток), относятся к группе стрессовых адаптогенов, обладают активизирующим влиянием на побегообразование.

– Жасмонаты – группа гормонов растений: жасмоновая кислота и ее эфиры (метилжасмонат). Синтезируются из линоленовой кислоты, и представляют собой циклопентаноны, являются аналогами простагландинов, гормонов млекопитающих. Система рецепции жасмоновой кислоты действует через убиквитин: соединение жасмоната с остатком изолейцина приводит к деградации JAZ-белка, меченного убиквитином и освобождению других факторов транскрипции (Farmer, 2007).

Углекислый газ. Исследования влияния CO<sub>2</sub> на процессы роста растений показали, что углекислый газ способен частично нейтрализовать воздействия экологического стресса и рассматривается некоторыми учеными, как гормон роста (цит. по Чмора, Мокроносов, 1994)

В последние годы было установлено, что гормоноподобным и регуляторным действием обладают олигосахариды, салициловая кислота, полиамины, фенольные кислоты, янтарная кислота некоторые витамины и др. (Mulgund et al., 2012; Бунцевич и др., 2015; Patent, 2006).

В растении фитогормоны находятся в тесном взаимодействии друг с другом: ИУК индуцирует синтез этилена и цитокининов, ГК увеличивает содержание ИУК, цитокинины усиливают синтез ИУК, но снижают содержание свободной АБК, этилен тормозит транспорт ИУК и увеличивает содержание АБК. ГК и этилен обычно ингибируют эмбриогенез. АБК и этилен ингибируют ростовые процессы, деление клеток, а в сочетании с цитокининами и хлорхолинхлоридом индуцируют органогенез. Гормональная система тесно связана с генетическим аппаратом клетки. Фитогормоны влияют на степень метилирования ДНК и таким образом регулируют экспрессию генов, а связываясь с белками – репрессорами на опероне, вызывают активацию структурных генов и синтез определенных ферментов. Манипулируя соотношением гормонов в питательных средах, можно, в некоторой степени, влиять на процессы дедифференциации, редифференциации и дифференциации клеток и тканей в культуре *in vitro* (Широков, Крюков, 2012).

Для получения соматического эмбриогенеза у хвойных чаще всего используют регуляторы роста из трех функциональных групп: 2,4D (ауксины), 6-БАП (цитокинины) и абсцизовую кислоту. Инициация эмбриогенных культур, а также сохранение и размножение индуцированных эмбриогенных масс возможно при одновременном участии ауксинов и цитокининов. При этом индукция эмбриогенных культур проходит в условиях высокой концентрации ауксина. При сохранении стабильно пролиферирующих масс концентрацию в среде цитокинина уменьшают, а в некоторых случаях, уменьшают и количество

ауксина (Patent, 2011). Следует заметить, что соотношение ауксинов и цитокининов в составе питательных сред имеет значение и его оптимум может варьировать как у разных видов, так и у разных генотипов одного вида. Однако последние исследования показали, что компетентность эксплантов к соматическому эмбриогенезу в бóльшей степени определяется их чувствительностью к регуляторам роста и гормональным фоном в эксплантируемых тканях (Хмара, 2015).

АБК в соматическом эмбриогенезе обычно используют при созревании соматических зародышей (Gutmann et al., 1996; Patent, 1999). Присутствие этого гормона в культуральных средах способствует увеличению толерантности к высушиванию соматических зародышей и переходу зародышей в состояние покоя, что предотвращает их преждевременное прорастание. Кроме того, во время акклиматизации регенерантов *ex vitro* в качестве антитранспиранта, АБК может способствовать уменьшению относительной потери воды листьями даже при наличии нефункциональных устьиц (Rai et al., 2011).

Имеются сведения о том, что присутствие АБК на средах для инициации, может способствовать увеличению индукционного отклика эксплантов хвойных и увеличению количества стабильно пролиферирующих эмбриогенных культур, а также, продукции соматических зародышей, и не оказывать отрицательного влияния на последующие этапы соматического эмбриогенеза (Patent, 1999).

С другой стороны, высокий уровень эндогенной абсцизовой кислоты в некоторых эмбриогенных культурах хвойных может препятствовать переходу РЕМ III в ранние соматические зародыши, что препятствует дифференциации нормально развитых семядольных зародышей на средах для созревания (Farias-Soares et al., 2014).

Использование ГК в соматическом эмбриогенезе изучено недостаточно. Считается, что этот фитогормон ингибирует эмбриогенез (см. выше). Присутствие гиббереллина в индукционных средах оказало также ингибирующее действие на инициацию соматического эмбриогенеза (Pullman et al., 2005). В то же время, некоторые исследования указывают на возможность



использования различных гиббереллинов в культуральных средах на разных стадиях соматического эмбриогенеза хвойных. Включение гиббереллинов в пролиферационную среду стимулировало образование более жизнеспособных проэмбриональных структур. Добавление гиббереллинов позволило достичь устойчивого развития многим генотипам, ранее считавшимся трудными для культивирования. Также было установлено, что комбинация абсцизовой кислоты и различных гиббереллинов благоприятно повлияло на развитие семядольных зародышей (Patent, 1994). Таким образом, необходимыми условиями для получения соматического эмбриогенеза являются компетентность эксплантов, а также соответствующий уровень экзогенных и эндогенных гормонов.

### **1.8. Соматический эмбриогенез у сосны обыкновенной**

Работы по получению соматического эмбриогенеза у сосны обыкновенной ведутся одновременно в разных странах мира с начала 80-х годов XX века. Впервые инициация соматического эмбриогенеза, эмбриогенные линии, зрелые соматические зародыши и растения-регенеранты у сосны обыкновенной были получены финскими учеными в 1996 г. (Keinonen-Mettälä et al., 1996), а первое сообщение об адаптированных в условиях теплицы растениях-регенерантах сосны было опубликовано в 1999 г. (Hägglman et al., 1999). Исследования по соматическому эмбриогенезу у сосны обыкновенной были направлены на изучение особенностей инициации: способности к соматическому эмбриогенезу зиготических зародышей на разных стадиях развития, отклика эксплантов на состав разных вариантов культуральных сред (Keinonen-Mettälä et al., 1996; Lelu et al., 1999; Hägglman et al., 1999). Была установлена низкая частота инициации соматического эмбриогенеза. Последующие работы были направлены на подбор лучших физико-химических условий для инициации и пролиферации эмбриогенных линий, созреванию соматических зародышей и получению растений-

регенерантов. Так, например, варьировались составы сред (макро- и микро-элементы), концентрации регуляторов роста, вид и концентрация желирующего агента (Park et al., 2006; Lelu et al., 1999; Lelu-Walter et al., 2008); изучалась реакция эксплантов на добавление абцизово́й кислоты в индукционные среды (Patent, 1999), исследовалось влияние соотношения аммиачного и нитратного азота в составе сред для пролиферации ЭСМ и созревания зародышей (Patent, 2003). Так же разрабатывались технологии получения соматического эмбриогенеза (инициация, размножение и сохранение эмбриогенных масс и созревание соматических зародышей) в жидких системах: в суспензионных средах (в том числе, в условиях биореактора) и на жидких средах с использованием впитывающих материалов (Patent, 2010).

Параллельно проводились исследования по изучению закономерностей наследования способности к соматическому эмбриогенезу. Было установлено, что наследование способности к инициации соматического эмбриогенеза передавалось по материнской линии и не зависело от отцовского генотипа. Использование в контролируемом опылении генотипов, способных к соматическому эмбриогенезу, в качестве реципиентов позволило значительно (около 50%) увеличить эффективность инициирования (Niskanen et al., 2004). Сходные результаты были получены и у других видов *Pinus* (Cairney, Pullman, 2007).

В последние годы ведутся интенсивные исследования по изысканию маркеров соматического эмбриогенеза (Cairney, Pullman, 2007).

Обобщение результатов многолетних исследований (1999 - 2007), проведенных группой французских и канадских ученых, позволило усовершенствовать технологию соматического эмбриогенеза для массового размножения сосны обыкновенной и получения большого количества растений-регенерантов (Lelu-Walter et al., 2008).

## 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Характеристика объекта исследования

В исследованиях использовали стабильно-пролиферирующие линии №№ 28, 41 и 911 (рис. 2), полученные в 2012-2014 гг. в ходе индукции соматического эмбриогенеза в культуре мегагаметофитов с незрелыми зародышами на стадии от 4х-клеточного проэмбрио до начала кливажа из шишек от свободного опыления. Линии №№ 28 и 41 происходят от селекционных генотипов сосны обыкновенной из коллекции клонов плюсовых деревьев, произрастающих на территории Ангарской лесосеменной плантации Тальцинского лесничества Ангарского лесхоза (клоны №№ 28 и 41), а линия № 911 – от генотипа дерева, произраставшего в естественном древостое окрестностей г. Северобайкальска (Носкова, 2016).



Рисунок 2 – Эмбриогенные линии: А, Б - №911; В - №28; Г, Д - №41

(фото автора)

### 2.1.1. Морфолого-анатомические характеристики эмбрионных масс

Эмбрионные массы исследуемых линий имели сходное морфолого-анатомическое строение и были представлены, главным образом, проэмбриональными структурами (РЕМ II – REM III), структурами, представляющими собой кластеры проэмбрионных масс с регенерирующими на поверхности головками (*heads*) ранних соматических зародышей, а также непосредственно, ранними соматическими зародышами, состоявшими из глобул и суспензоров разной длины (рис. 3).

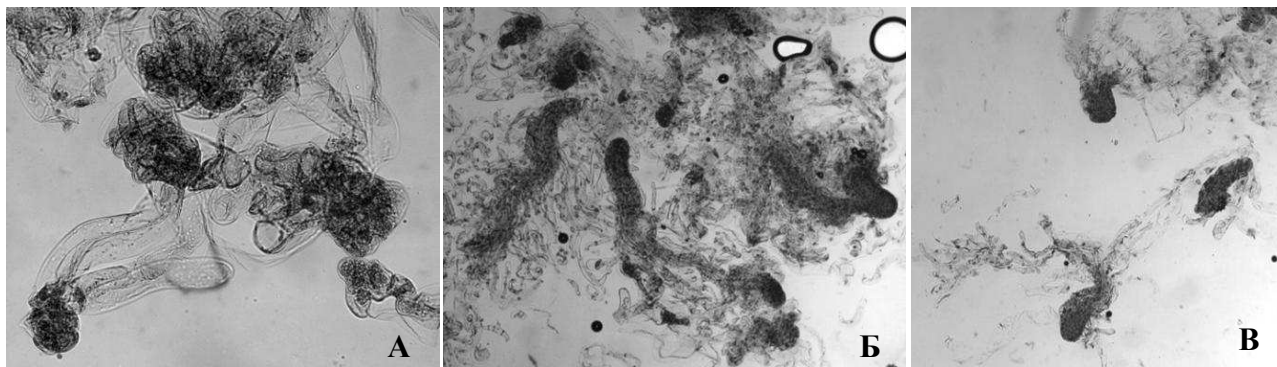
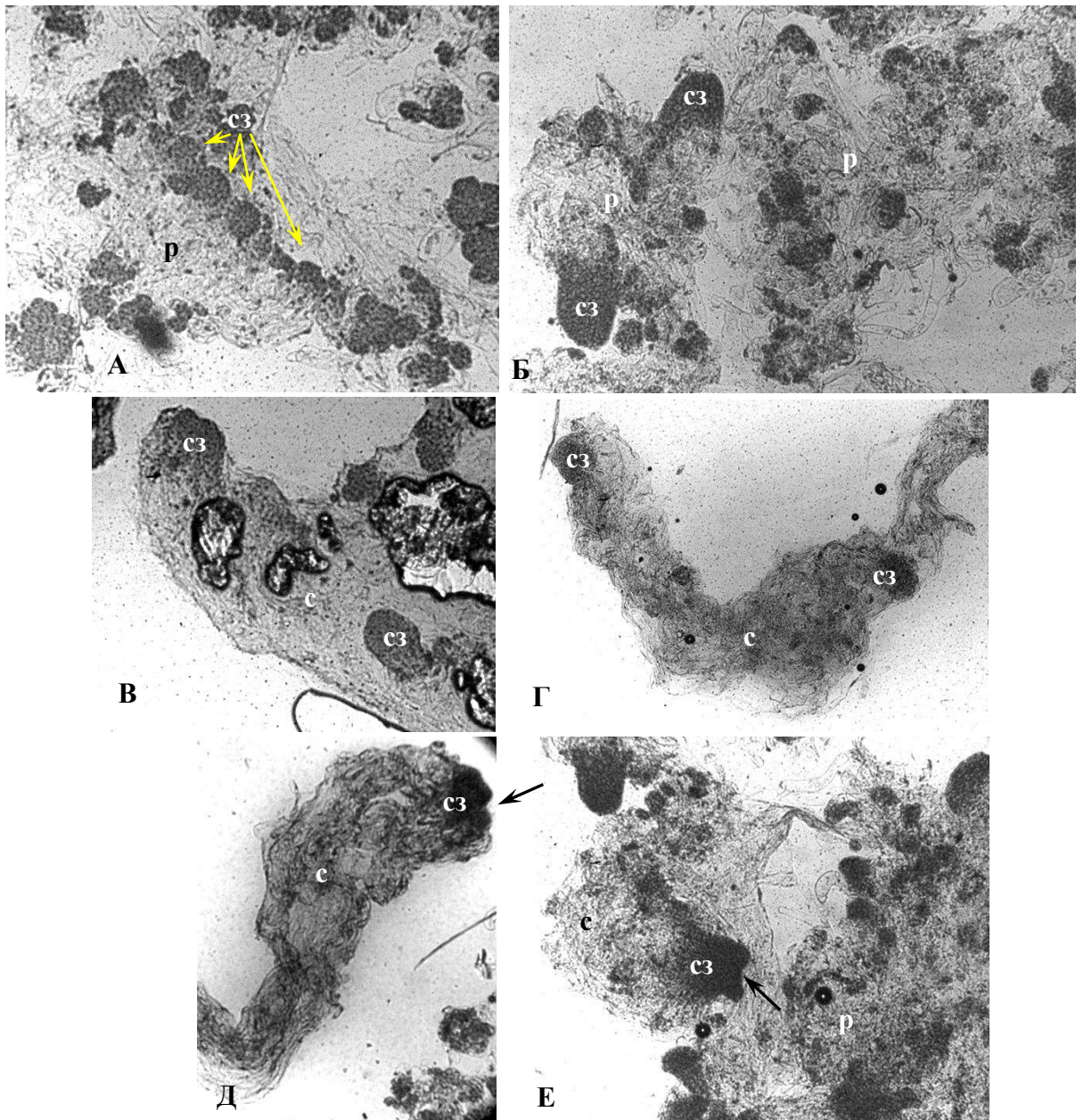


Рисунок 3 – Эмбриональные структуры эмбрионных масс: А - REM III, Б-Б – соматические зародыши (Ок.× 10; Об. ×4 PLAN; фото автора)

Линии незначительно различались между собой по соотношению эмбрионных структур, скорости регенерации массы и накоплению в тканях продуктов метаболизма. Размножение эмбрионных масс происходило за счет образования новых проэмбриональных структур и регенерации соматических зародышей на REM III, суспензорах и через кливаж эмбриональных глобул (рис. 4)



А, Б – регенерация соматического зародыша (сз) с РЕМ III (р);  
 В, Г – регенерация СЗ на суспензоре (с);  
 Д, Е - начало кливажа эмбриональной глобулы.

Рисунок 4 - Способы размножения ЭМ (Ок.× 10; Об. ×4 PLAN; фото автора)

## 2.2. Контроль над морфолого-анатомическим развитием эмбриональных структур

Контроль над морфолого-анатомическим развитием эмбриональных структур осуществляли на временных микропрепаратах, окрашенных сафранином (Паушева, 1980): кусочки эмбриональной массы помещали в

каплю красителя, излишки которого удаляли фильтровальной бумагой после окрашивания, затем материал заключали в капле глицерина между двумя предметными стеклами, осторожно раздавливали и просматривали под микроскопом ЛОМО МИКМЕД-6 (вар.74) при увеличении Ок.× 10; Об. ×4 PLAN и Ок.×10; Об. ×10 PLAN.

В ходе экспериментов учитывали наличие в составе культур PEM и глобулярных соматических зародышей. PEM различали по степени зрелости: PEM I – одиночные эмбриональные трубки с эмбриональными инициалами; PEM II – группа эмбриональных трубок с эмбриональными инициалами; PEM III – агрегаты, состоящие из множества эмбриональных трубок и эмбриональных клеток (рис. 5).

Морфолого-анатомические характеристики эмбрионных масс фиксировали с помощью цифровой фотокамеры Canon PowerShot A640 PC1200.

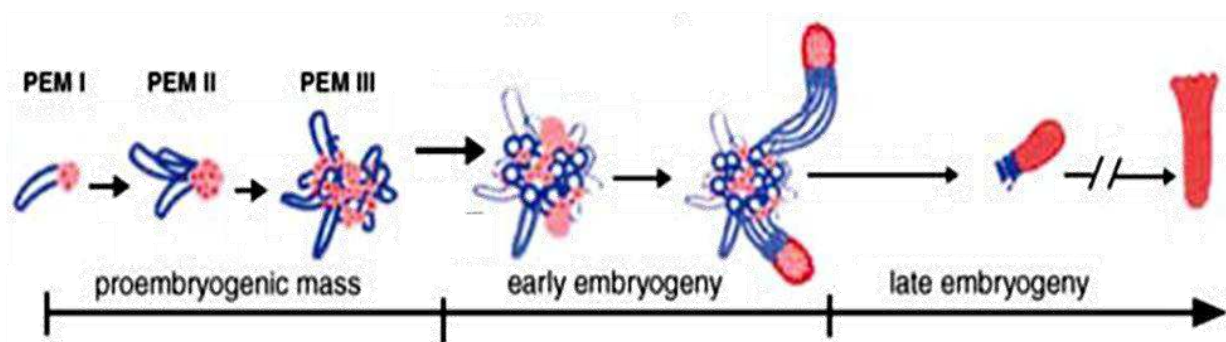


Рисунок 5 - Схема развития соматического зародыша ели (Smertenko A. et al., 2003).

### **2.3. Оптимизация культуральной среды по соотношению форм неорганического азота для пролиферации и сохранения эмбрионных масс**

Для выявления оптимальных соотношений форм неорганического азота в культуральной среде для пролиферации и сохранения эмбрионных масс использовали линии №№ 28, 41, 911.

В ходе эксперимента варьировалось соотношение восстановленной и окисленной форм азота, причем, общее количество неорганического азота оставалось неизменным. Эксперимент проводили по методу R. C. Serrano (Patent, 2003), использованному для получения соматических зародышей у сосны обыкновенной. Для проведения эксперимента использовали состав макроэлементов среды N6 (Chu C.-C. et al., 1975), где для удобства расчетов аммиачная селитра ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), содержащая одновременно ионы обеих форм азота, была выведена из состава среды. Источником восстановленной формы азота явилось соединение  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , а единственным источником окисленной формы -  $\text{KNO}_3$ . Микроэлементы готовили по составу среды LM (Litvay et al., 1985). В качестве контроля использовали среду, приготовленную с использованием макро- и микроэлементного состава стандартной среды LM. Для опыта и контроля состав органических компонентов сред – витаминов, инозита, L-глутамин брали по прописи среды VM; гидролизат казеина в составе сред использовали в количестве 1000 мг/л, сахарозы – 30000 мг/л, аскорбиновой кислоты – 700 мг/л, 2,4 D – 1,75 мг/л и 0,25 мг/л 6-БАП (подобрана опытным путем); pH доводили до 5,8 до добавления желирующего компонента, в качестве которого использовали гелрит. Аскорбиновую кислоту и L-глутамин добавляли в остывающие среды, используя одноразовые бактериальные фильтры.

При приготовлении сред использовали молярное соотношение ионов  $\text{NH}_4^+$ :  $\text{NO}_3^-$ : 1/9, 2/8, 4/6, 6/4, 8/2 (Patent, 2003). Для этого сначала определяли в составе макроэлементов среды общую молярную массу азота и молярную массу азота в составе солей с окисленной и восстановленной формой, затем, рассчитывали массу солей, необходимую для приготовления растворов с заданным соотношением (таб. 1).

Таблица 1 – Количество солей для приготовления сред с заданным молярным соотношением форм неорганического азота

Молярное соотношение $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$	Ион	Доля иона, %	Соединение	Количество азота в соединении, мг	Количество соли в среде, мг/л
8/2	$\text{NH}_4^+$	80	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	392	1850
	$\text{NO}_3^-$	20	$\text{KNO}_3$	98	708
6/4	$\text{NH}_4^+$	60	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	294.13	1386.61
	$\text{NO}_3^-$	40	$\text{KNO}_3$	196.1	1414.72
4/6	$\text{NH}_4^+$	40	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	196.1	924
	$\text{NO}_3^-$	60	$\text{KNO}_3$	294.13	2121.94
2/8	$\text{NH}_4^+$	20	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	98	462
	$\text{NO}_3^-$	80	$\text{KNO}_3$	393	2835
1/9	$\text{NH}_4^+$	10	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	49	231
	$\text{NO}_3^-$	90	$\text{KNO}_3$	441.19	3182.87

В эксперименте учитывали прирост массы и объема эксплантов. Опыт проводили в параллельных повторностях. Для определения прироста массы опыт проводили в 5-и повторностях; экспозиция на культуральных средах составила 14 сут. Прирост объема учитывали по 10 повторностям в течение 56 сут. Съемку данных проводили каждые 14 сут. Визуально отслеживали состояние эмбриогенных масс (цвет, консистенцию, характер развития ткани и др.).

Для определения количественных характеристик (динамика роста, прирост ткани) использовали гравиметрический (весовой) метод – метод количественного химического анализа, где взвешивание является не только начальной, но и конечной стадией определения. Гравиметрический анализ основан на законе сохранения массы веществ при химических превращениях (Гравиметрический анализ, 2011). В ходе исследования регистрировали вес чистой среды, вес среды с эмбрионально-суспензарной массой и вес среды после удаления эмбрионально-суспензарной массы. Взвешивание проводили на аналитических весах ANDHR–202i.

Для определения объема измеряли длину, ширину и высоту кластеров ЭМ, затем проводили расчет по формуле объема для полусферы (1) (Новоселова, 2003).



$$V = \frac{2}{3} * 3.14 * R^3 \quad (1)$$

где  $V$  – объем полусферы;

$R$  – радиус сферы.

#### 2.4. Предобработка (синхронизация) эмбриогенных масс

В эксперименте по предобработке (синхронизации) использовали эмбриогенную массу линии № 41.

Эмбриогенные массы помещали на среды с добавлением регуляторов роста – абсцизовой (АБК, 10 мг/л) и/или гиббереллиновой кислоты (ГК, 10 мг/л), и без регуляторов роста на твердых средах или в жидких системах – в виде суспензии или с использованием ватных дисков в качестве впитывающих материалов (таб. 2, Patent, 1999; Lelu-Walter et al., 2008; Carneros et al., 2009; Patent, 2011)

Таблица 2 – Варианты эксперимента по предобработке (Синхронизации)

Система	Регулятор роста		
	Без регуляторов роста, БГ	Абсцизовая кислота, А	Абсцизовая и гибберелловая кислота, АГ
Т - твердая среда	ТБГ	ТА	ТАГ
Ж - жидкая среда, суспензия,	ЖБГ	ЖА	ЖАГ
В - жидкая среда, ватные диски	ВБГ	ВА	ВАГ

Каждый вариант опыта был выполнен в пяти повторностях.

В эксперименте использовали среды, составленные на основе макро- и микроэлементов среды  $\frac{1}{2}$  LV (Litvay et al., 1985) и витаминов среды ВМ (Patent, 2010). В среды добавляли 30 г/л сахарозы, 200 мг/л инозита, 1 г/л гидролизата казеина; рН доводили до 5,8. Затем, в среды добавляли 250 мг/л

активированного угля и 1,6 г/л гелрита. L-глутамин в количестве 500 мг/л и регуляторы роста добавляли после автоклавирования в остывающие среды. Эксперимент проводили в темноте при температуре  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Варианты на твердой среде и в жидких системах на ватных дисках помещали в условия термостата, в суспензиях – культивировали на шейкере в условиях ростовой комнаты. Экспозиция на средах без регуляторов роста составила 1 неделю, на средах с добавлением АБК и ГК – 2 недели (Patent, 2011).

В ходе эксперимента отслеживали внешнее состояние эмбрионных масс, зрелость и аномалии эмбриональных структур, количество проэмбриональных структур и головок соматических зародышей, наличие и длину суспензоров.

Морфолого-анатомические характеристики эмбрионных масс определяли с помощью микроскопирования. Регистрацию изменений осуществляли в журнале наблюдений.

## **2.5. Созревание соматических зародышей**

В эксперименте по созреванию использовали эмбрионную массу линии № 41.

Созревание соматических зародышей проводили для всех 5 повторностей каждого варианта эксперимента по предобработке (синхронизации) (таб. 2).

По завершению предобработки (синхронизации) 200-300 мг массы от повторностей каждого варианта опыта суспендировали в 4-5 мл раствора, содержащем только макро- и микроэлементы среды  $\frac{1}{2}$  LV (Litvay et al., 1985), и фильтровали через плоскодонную воронку (воронка Бюхнера) с помощью вакуумного насоса Камовского на стерильной мембране из мельничного газа, удаляя раствор из эмбриональной массы. «Подсушенную» массу вместе с мембраной помещали на поверхность твердой среды для созревания соматических зародышей (Lelu-Walter et al., 2008; Patent, 2011).

Среду готовили на основе макро- и микроэлементов среды  $\frac{1}{2}$  LV (Litvay et al., 1985) и витаминов среды VM (Patent, 2010). В среду добавляли 20 мг/л АБК, 60 г/л сахарозы, 200 мг/л инозита, 500 мг/л L-глутамина (после автоклавирования), 1 г/л казеина, 1 г/л активированного угля, 10 г/л ПЕГ 6000 и 7 г/л гелрита; рН среды доводили до 5,8. Культуры выдерживали в темноте в условиях термостата при температуре  $22 \pm 2^\circ$ , С (Lelu-Walter et al., 2008; Patent, 2011). Экспозиция эмбриогенных масс на среде для созревания составила 3 – 6 мес.

В ходе эксперимента отслеживали внешнее состояние эмбриогенных масс, зрелость и аномалии эмбриональных структур, количество проэмбриональных структур и головок соматических зародышей, наличие и длину суспензоров, количество и качество (нормальное/аномальное развитие) семядольных соматических зародышей.

Морфолого-анатомические характеристики эмбрионально-суспензорных масс определяли с помощью микроскопирования.

Появление и морфологические изменения зрелых семядольных соматических зародышей фиксировали с помощью цифровой фотокамеры Nikon COOLPIXL820. Регистрацию изменений осуществляли в журнале наблюдений.

## **2.6. Проращивание и укоренение семядольных соматических зародышей**

При проращивании и укоренении использовали семядольные зародыши, которые были получены в результате эксперимента по созреванию (см. выше).

Для проращивания зрелые семядольные зародыши помещали на твердую среду AFS (без регуляторов роста, Yonga, 2004). Часть зародышей предварительно подвергали процедуре «подсушивания». При этом зародыши переносили на сухой ватный диск, помещенный на изолирующую подставку, во влажную камеру для подсушивания на 7 дней (рис. 6). Все манипуляции

проводились в условиях строгой стерильности (Lelu-Walter et al., 2008; Bonga, 2004).



Рисунок 6 – Перенос зрелых соматических зародышей на сухой ватный диск, помещенный на изолирующую подставку во влажную камеру для подсушивания (фото автора)

Пророщенные зародыши переносили в стерильные баночки с перлитом с диаметром частицы 2 мм (Carneros et al., 2009), увлажненным жидким раствором среды AFS для укоренения (Bonga, 2004). Зародыши культивировали в условиях 16-часового светового дня.

В ходе опыта отслеживали реакцию семядольных соматических зародышей на условия эксперимента.

Морфологические изменения семядольных соматических зародышей фиксировали с помощью цифровой фотокамеры Nikon COOLPIXL820. Регистрацию изменений осуществляли в журнале наблюдений.

## **2.7. Дезинфекция помещения и подготовка рабочего места**

Перед началом опытов проводили дезинфекцию помещения и оборудования, стерилизацию сред и инструментов. Дезинфекцию помещений проводили при помощи дезрастворов (1 – 3 % раствор хлорамина) (Инструкция..., 2004 – 2011) и бактерицидных ламп. Вся посуда и инструменты

перед использованием подвергались очистке и дезинфекции, промывке в проточной и дистиллированной воде, просушиванию, упаковке и стерилизации. Колбы с подготовленной средой и дистиллированной водой автоклавировали при давлении 0,5 атм.(115°C) в течение 30 минут и при 1 атм.(121°C) в течение 20 минут соответственно, инструменты и посуду автоклавировали отдельно при давлении 1 атм. (121°C) 30 минут (Савкина и др., 2014) или в сушильном шкафу при температуре 200°C 90-120 мин. Все манипуляции проводили в строго стерильных условиях. Розлив сред в стерильную посуду, инокуляция эксплантов и трансплантация культур проводились в микробиологическом боксе с использованием ламинарной системы при горящей спиртовке. Рабочую поверхность стола обрабатывали ватным тампоном, пропитанным в растворе 90 – 96 % спирта и 32% перекиси водорода в равных долях. Инструмент перед каждой манипуляцией в эксперименте опускали в спирт и обжигали в пламени спиртовки.

## **2.8. Статистическая обработка данных**

Статистический анализ проводили согласно принятым методам на базе ПК с использованием стандартного пакет анализа данных Microsoft Excel 2007. Описательную статистику проводили по параметрам выборки: среднее, дисперсия, ошибка, доверительный интервал. Достоверность различий средних для показателей прироста объема определяли, используя однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ. Используя двухфакторный дисперсионный анализ, изучали силу влияния факторов. Для сравнения средних величин прироста массы использовали t-критерий Стьюдента. Для изучения характера взаимосвязи между показателями объема и массы кластеров ЭМ использовали корреляционный анализ.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Оптимизация культуральной среды по соотношению форм неорганического азота для пролиферации и сохранения эмбриогенных масс

Одним из ключевых факторов для успешного получения соматического эмбриогенеза у хвойных является соотношение форм неорганического азота в культуральных средах в виде восстановленной ( $\text{NH}_4^+$ ) и окисленной ( $\text{NO}_3^-$ ) форме. (Божков, 1994; Patent, 2003). При приготовлении сред использовали молярное соотношение ионов  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ : 1/9, 2/8, 4/6, 6/4, 8/2 (таб. 1).

Исследования показали, что нарастание биомассы эмбриогенных тканей шло в соответствии с моделью логистической роста. Lag-фаза продолжалась в течение 2 – 3 сут., затем наблюдался стремительный рост; угол наклона логистической кривой зависел от отклика генотипа на условия эксперимента. В большинстве вариантов эксперимента рост биомассы замедлялся к 12 – 14 сут. во всех вариантах, кроме 6/4 и 8/2 у линий № 28 и № 41. При этом на кусочках биомасс наблюдались признаки «старения» вследствие накопления фенольных соединений (Божков, 1994; Patent, 2003): на поверхности масс появлялись участки бурого цвета, рост ткани прекращался. В таких случаях требовалась трансплантация эмбриогенных масс на свежие среды.

Линии № 28 и № 41 на среде с соотношением 6/4 продолжали пролиферировать до 20 – 22 сут. с меньшей скоростью, затем прекращали рост и слегка обводнялись. В этом состоянии массы находились без изменений (без признаков старения) до 50 – 56 сут; при переносе на стандартную среду (LM) с регуляторами роста 2,4 D и 6-БАП в соотношении 2 : 0,5 и 1,75 : 0,25 мг/л после непродолжительной Lag-фазы пролиферировали как обычно. На среде с соотношением 8/2 скорость роста масс линий № 28 и № 41 в ходе всего эксперимента была низкой по сравнению с другими вариантами. Массы были сильно обводненными, матово-белого цвета, ватно-ватистой консистенции (без

## ВЫВОДЫ

По результатам исследований сделаны следующие выводы:

1. в ходе оптимизации культуральной среды по соотношению форм неорганического азота для пролиферации и сохранения эмбриогенных масс сосны обыкновенной было выявлено, что для линий № 28 и № 41 оптимальное молярное соотношение ионов  $\text{NH}_4^+$  :  $\text{NO}_3^-$  составило 6/4. Линия № 911 показала близкий по значениям отклик на разные условия эксперимента, что, вероятно, обусловлено приобретенной высокой адаптивной способностью в условиях культуры *in vitro*;
2. наиболее эффективные условия предобработки (синхронизации) эмбриогенных масс были в варианте опыта на твердой среде без добавления регуляторов роста. Наилучшее созревание наблюдалось в хорошо «подсушенных» эмбриогенных массах после предобработки на твердой среде без добавления регуляторов роста;
3. сохранившаяся активная пролиферация эмбриогенной массы негативно повлияла на созревание соматических зародышей. Обводнение культур из-за недостаточного удаления влаги из эмбриогенных масс при трансплантации на среды для созревания препятствовало дифференциации и созреванию СЗ;
4. были получены семядольные зародыши и регенеранты.

В дальнейшем при проведении работ по освоению и оптимизации технологии соматического эмбриогенеза плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L. необходимо устранить проблемы, выявленные во время проведения настоящих исследований. Для этого необходимо:

1. Добиться устойчивого прекращения пролиферации соматических зародышей в ходе предобработки эмбриогенных масс и развития нормальных головок СЗ с хорошо развитыми длинными суспензорами;
2. Получить массовое созревание семядольных зародышей.

3. Добиться уменьшения количества аномальных зародышей;
4. Подобрать условия оптимальные для укоренения регенерантов (субстрат, влажность и др.).



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК – Абсцизовая кислота

БАП (6-БАП) – 6-бензиламинопурин

ГК – Гибберелловая кислота

Об. – Объектив

Ок. – Окуляр

ПЕГ – Полиэтиленгликоль

СЗ – Соматический зародыш

ЭМ – Эмбриогенная масса

ЭСМ – Эмбрионально-суспензорная масса

MVF – Multe-varietal forestry, программа многосортного лесоводства

PEM – Proembryonic structure, проэмбриональные структуры

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Альфа и Омега: краткий справочник / под ред. Ю. Каэватс, ред. рус. текста Т. Бурилова И. Коробов. – Таллин : Принтест, 1991. – 448 с.
2. Бажина, Е. В. Репродуктивный потенциал пихты сибирской в горах западного Саяна и сохранение ее генофонда в культуре *in vitro* [Электронный ресурс] / Е. В. Бажина // Хвойные бореальной зоны. – Т.30, - № 1-2. - 2012. – С. 10-15. – Режим доступа: <http://elibrary.ru/download/23606240.pdf>
3. Барсукова, А. В. Регуляция соматического эмбриогенеза у видов лиственницы в культуре *in vitro* [Электронный ресурс] : автореф. дис. ...канд.биол.наук : 03.01.05 / Алена Владимировна. Барсукова. - Красноярск, 2011. – 19 с. – Режим доступа: <http://dlib.rsl.ru/01004619196>
4. Батыгина, Т. Б. Хлебное зерно / Т. Б. Батыгина – Ленинград : Наука, 1987. - 103 с.
5. Безуглова, О.С. Абсцизины [Электронный ресурс] / О.С. Безуглова // сайт «Удобрения и стимуляторы роста». 2013 – Режим доступа: <http://eco-soil.ru/?p=75>
6. 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.
7. Божков П. В. Клональное микроразмножение ели европейской путем соматического эмбриогенеза / П. В. Божков, Л. А. Лебеденко, Г. А. Ширяева // Анатомия, физиология и экология лесных растений : Материалы XXVI сессии Комиссии им. Л.А.Иванова / Институт леса Карельского научного центра РАН. – Петрозаводск, 1992. - С. 19-21.
8. Божков П. В. Соматический эмбриогенез и полиэмбриогенез хвойных *in vitro* на примере ели обыкновенной (*Picea Abies* L. Karst) : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.12 / Петр Валерьевич Божков. - Санкт-Петербург, 1994. - 20 с.

9. Букштынов, А.Д. Леса / А.Д. Букштынов, Б.И. Грошев, Г.В. Крылов. – Москва : Мысль, 1981. - 316 с.
10. Бунцевич, Л.Л. Изучение препарата Л-1, янтарной кислоты и её солей в качестве стимуляторов роста эксплантов растений *in vitro* / Л.Л. Бунцевич, Е.Н. Беседина, М.А. Костюк // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК - продукты здорового питания. – 2015. - № 4. - С. 64-69
11. Буш, Н. А. Систематика высших растений / Н. А. Буш. – Москва : Учпедгиз, 1959. – 536 с.
12. Генетические основы селекции растений : в 4 т. / науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева // Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия. – Минск : Беларус. наука, 2012. – Т 3. – 489 с.
13. Гравиметрический анализ [Электронный ресурс] / Википедия – свободная энциклопедия. – 2011. – Режим доступа: [https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D1%80%D0%B0%D0%B2%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%82%D1%80%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9\\_%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D1%80%D0%B0%D0%B2%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%82%D1%80%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7)
14. Джафарова, В. Е. Особенности микроклонального развития сортов яблони с геном *vf* в связи с вопросами полиплоидии [Электронный ресурс] / В. Е. Джафарова // Селекция и сорторазведение садовых культур : сборник трудов ФГБНУ ВНИИСПК. – Орел.-2007. – Режим доступа: [http://www.vniispk.ru/news/sbornik\\_2007/article.php?id=7](http://www.vniispk.ru/news/sbornik_2007/article.php?id=7)
15. Долголиков, В. И. Положительные стороны и недостатки клоновой селекции ели / В. И. Долголиков, И. И. Попивший // Лесоведение. – 1992. - № 2. – С. 11–18.
16. Доронин, М. С. БИО-2020 – как технологическая основа для инновационного воспроизводства лесов : презентация доклада [Электронный ресурс] / М. С. Доронин // VII Международный форум «Лес и человек» в «Экспоцентре» : секция «Приоритетные направления

- развития лесного хозяйства на современном этапе». – Москва, 2014. –  
Режим доступа: [www.rosleshoz.gov.ru/media/event/8/Doronin.pdf](http://www.rosleshoz.gov.ru/media/event/8/Doronin.pdf)
17. Инструкция по применению дезинфицирующего средства хлорамин Б [Электронный ресурс] / ООО "ПРОФСТИЛЬ" 2004 – 2011. – Режим доступа: <http://www.profitstyle.ru/xloramin2.html>
  18. Кузнецов, В. В. Физиология растений / В. В. Кузнецов, Г. А. Дмитриева. – Москва : Высшая школа, 2005. – 736 с.
  19. Кузьмина, Г. П. Влияние рекреации на сосновые леса зеленой зоны г. Красноярск : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.03.03 / Галина Петровна Кузьмина. – Красноярск, 1982. – 25 с.
  20. Кузьмина, Н. А. Адаптивные особенности сосны обыкновенной разного происхождения в Приангарье / Н. А. Кузьмина // Гомеостаз и окружающая среда Материалы VIII Всероссийского (с международным участием) симпозиума. / отв. Редактор В. П. Нефедов, - Красноярск : КНЦ СО РАН, 1997. - Т. 2. - с. 40 – 43
  21. Ловков, А.М. Лесное хозяйство современные аспекты искусственного выращивания сосны обыкновенной в зоне смешанных лесов России / А.М. Ловков / Лесной вестник. -2007. - №1. – С. 4-5;
  22. Лутова, Л. А. Генетика развития растений : учебное пособие для студентов вузов / Л. А. Лутова и др., Т. А. Ежова, И. Е. Додуева, М. А. Осипова [и др.] ; под ред. С. Г. Инге-Вечтомов. Санкт-Петербург : Издательство Н-Л, 2010. – 432 с.
  23. 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
  24. Митрофанова, И. В. Методические аспекты в исследовании органогенеза и соматического эмбриогенеза *in vitro* представителей семейств Ranunculaceae, Smoraceae, Rosaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Actinidiaceae [Электронный ресурс] / И. В. Митрофанова, О. В. Митрофанова, Н. В. Корзина [и др.] // Сборник научных трудов ГНБС / Никитский

- ботанический сад - Национальный научный центр. – Ялта, 2014. – Т. 138. – С. 102-136. – Режим доступа: <http://scbook.nbgncs.ru/download/138/3-138-2014.pdf>
25. Новоселова, Н. В. Закономерности эмбриогенеза и формирование семян сосны сибирской (*Pinus Sibirica* DuTour) *in vivo* и в культуре *in vitro* : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.05 / Наталья Валерьевна Новоселова. - Красноярск, 2003. - 22 с.
26. Носкова, М. А. Индукция соматического эмбриогенеза у *Pinus sylvestris* L. и сохранение полученных ранее эмбриональных линий [электронный ресурс] : выпускная квалифицир. работа бакалавра : 06.03.01 / Мария Александровна Носкова. – Красноярск : СФУ, 2016. – 69 с.
27. Носкова, М. А. Перспективы микрклонального размножения сосны обыкновенной путем соматического эмбриогенеза в Сибири / М. А. Носкова // Экология Южной Сибири и сопредельных территорий. Выпуск 17. В 2 т. /отв. ред. В. В. Анюшин. – Абакан : Издательство ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет» им.Н.Ф. Катанова, 2013. - Т. 2. - с.19.
28. Носкова, Н. Е. Инициация соматического эмбриогенеза у *Pinus pumila* и *P. sibirica* на разных стадиях развития половых зародышей / Н. Е. Носкова, А. С. Сиренко, И. Н. Третьякова // Международная научно-практическая конференция "Природные и интеллектуальные ресурсы Сибири" (СИБРЕСУРС–18–2012). - 15–17 октября 2012 г.
29. Носкова, Н. Е. Репродукция сосны обыкновенной в условиях глобального изменения климата и стратегические пути сохранения вида / Н. Е. Носкова, И. Н. Третьякова // Хвойные бореальной зоны. – 2011. - Т. XXVIII, № 1-2. - С. 41-46
30. О состоянии и использовании лесов Российской Федерации за 2012 г. [Электронный ресурс] / Ежегодный доклад, 2013. – Режим доступа: [http://www.rosleshoz.gov.ru/docs/other/79/Ezhegodnyj\\_doklad\\_o\\_sostoyanii\\_i\\_ispolzovanii\\_lesov\\_Rossijskoj\\_Federacii\\_za\\_2012\\_g.pdf](http://www.rosleshoz.gov.ru/docs/other/79/Ezhegodnyj_doklad_o_sostoyanii_i_ispolzovanii_lesov_Rossijskoj_Federacii_za_2012_g.pdf)

31. О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2016 году : государственный доклад [Электронный ресурс] / Москва : Минприроды России; НИА-Природа. - 2017. – 760 с. – Режим доступа: <http://www.mnr.gov.ru/upload/medialibrary/eff/138-239.pdf>
32. Орлова, Л. В. Род сосна (*Pinus* L.) в России / Л. В. Орлова // Материалы VII Молодежной конф. ботаников в С-Петербурге. – Санкт-Петербург, 2000. - с. 31.
33. Пак, М. Э. Эмбриогенный потенциал длительно пролиферирующих клеточных линий *Larix sibirica* Ledeb. *in vitro* [Электронный ресурс] / М. Э. Пак, А. С. Иваницкая, Л. М. Двойнина, И. Н. Третьякова // Сибирский лесной журнал. - 2016. - № 1. - С. 27–38. – Режим доступа: <http://сибирскийлеснойжурнал.рф/upload/iblock/2b7/2b77fb7f5a583ce9787f225cb9b07db9.pdf>
34. Пат. SU 1761057 МПК, А1 СССР А 01 Н 4/00, С 12 N 5/04 Способ микроклонального размножения ели обыкновенной *in vitro* / Г. А. Ширяева, Л. А. Лебедеенко, П. В.Божков; заявитель и патенто-обладатель Ленинградский научно-исследовательский институт лесного хозяйства. - № 4846701/13 ; заявл. 09.07.90; опубл. 15.09.92, Бюл. № 34. – 4 с.
35. Паушева, З. П. Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева. – Москва : Колос, 1980. - 340 с.
36. Правдин, Л. Ф. Сосна обыкновенная. Изменчивость, внутривидовая систематика и селекция / Л. Ф. Правдин. – Москва : Наука, 1964 – 195 с.
37. Рогозин, М. В. Селекция сосны обыкновенной для плантационного выращивания : монография / М. В. Рогозин. – Пермь : Перм. гос. нац. исслед. ун-т., 2013. – 200 с.: ил.
38. Родин, А. Р. Лесные культуры : учебник / А. Р. Родин, Е. А. Калашникова, С. А. Родин, Г. В. Силаев ; под общ. ред. проф. А. Р. Родина. – Н. Новгород : Вектор ТиС, 2009. – 466 с.

39. Савкина, Т. Н. Автоклавирование в лечебно-профилактических учреждениях учебное методическое пособие // Т. Н. Савкина, М. Р. Морозова, И. А Яковлева. – Красноярск :ООО Полиграф, 2014. – 142 с.
40. Сведения о наличии объектов ЕГСК в лесном фонде красноярского края [Электронный ресурс] : по состоянию на 01.11.2012 / Лесосеменная станция Центра защиты леса Красноярского края.– электрон. носитель
41. Третьякова, И. Н. Индукция соматического эмбриогенеза у кедра сибирского / И. Н. Третьякова, М. С. Ижболдина // Лесоведение. - 2009. - Т. 5. - С. 41-47.
42. Третьякова, И. Н. Образование каллуса и индукция соматических зародышей в культуре *in vitro* у *Pinus sibirica* Du Tour [Электронный ресурс] / И. Н. Третьякова, Е. В. Ворошилова, Д. Н. Шуваев, А. С. Лукина // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: биология. – Красноярск, - 2013. – Т. 6, №1. – С. 44-60. – Режим доступа: <http://elibrary.ru/download/36980721.pdf>
43. Третьякова, И. Н. Перспективы микроклонального размножения хвойных в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез [Электронный ресурс] / И.Н. Третьякова, Е. В. Ворошилова, Д. Н. Шуваев, М. Э. Пак // Хвойные бореальной зоны / Учреждение Российской академии наук Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН. – 2012. – Т. 30, № 1. – С. 180-186. – Режим доступа: <http://elibrary.ru/download/24085519.pdf>
44. Третьякова, И. Н. Перспективы применения методов биотехнологии для размножения генетически ценных форм лесных древесных видов / И. Н. Третьякова, А. С. Белоруссова, Н. Е. Носкова, С. С. Савельев, А. В. Лукина, А. В. Барсукова, М. В. Ижболдина, Ю. А. Череповский // Хвойные бореальной зоны. – 2007. – Т. 2, № 23. – С. 309-317.
45. Третьякова, И. Н. Пыльца сосны обыкновенной в условиях экологического стресса / И. Н. Третьякова, Н. Е. Носкова // Экология. - 2004. - № 1. - С. 26-33

46. Третьякова, И. Н. Ростстимулирующая активность штаммов рода *Streptomyces* и *Trichoderma* и перспективы их использования для микроклонального размножения хвойных / И. Н. Третьякова, В. С. Садыкова, Н. Е. Носкова, П. Н. Бондарь, И. И. Гайдашева, Т. И. Громовых, А. С. Иваницкая, М. В. Ижболдина, А. В. Барсукова // Биотехнология. - 2009. - № 1. – С. 39-44.
47. Третьякова, И. Н. Соматический эмбриогенез *Pinus pumila* и продуктивность эмбриогенных линий при длительном культивировании in vitro [Электронный ресурс] / И. Н. Третьякова, Д. Н. Шуваев // Онтогенез. - 2015. - Т. 46, № 5. - С. 327-337. – Режим доступа: [https://www.researchgate.net/publication/283182256\\_Somaticeskij\\_embriogenez\\_Pinus\\_pumila\\_i\\_produktivnost\\_embriogennyh\\_linij\\_pri\\_dlitelnom\\_kultivirovanii\\_in\\_vitro](https://www.researchgate.net/publication/283182256_Somaticeskij_embriogenez_Pinus_pumila_i_produkktivnost_embriogennyh_linij_pri_dlitelnom_kultivirovanii_in_vitro)
48. Фуксман, И. Л. Содержание  $\alpha$ -пиена в хвое сосны как оптимальный индикатор состояния древостоев в условиях техногенного загрязнения // Экология. - 1999. - № 4. - С. 251-256.
49. Фуксман, И. Л. Фенольные соединения хвойных деревьев в условиях стресса / И. Л. Фуксман, Л. Л. Новицкая, В. А. Исидоров, В. И. Рошин // Лесоведение. – 2005. – № 3. – С. 4–10.
50. Хатмуллин, Р. З. Особенности естественного возобновления сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в естественных и антропогенно-нарушенных ландшафтах Южного Урала (район сосново-березовых лесов) : автореф. дис. ...канд.биол.наук : 03.01.05 / Рустем Золфатович Хатмуллин. – Оренбург, 2011
51. Хмара, К. А. Содержание фитогормонов в каллусной ткани при индукции соматического эмбриогенеза у зародышей ели обыкновенной (*Picea abies* [L.] KARST.) / К. А. Хмара // Труды Карельского научного центра РАН. – 2015. - № 12. - С. 142–148



52. Царев, А. П. Селекция и репродукция лесных древесных пород : учебник / А. П. Царев, С. П. Погиба, В. В. Тренин ; под ред. А. П. Царева. – Москва : Логос, 2003. – 520 с: ил.
53. Чавчавадзе, Е. С. Семейство сосновые (*Pinaceae*) / Е.С. Чавчавадзе, А.А. Яценко-Хмелевский // Жизнь растений. В 6 т. / Мхи. Плауны. Хвощи. Папоротники. Голосеменные растения. / под ред. А. Л. Тахтаджяна, главный редактор чл.-кор. АН СССР, проф. А. А. Федоров. – Москва : Просвещение, 1978. - Т. 4. – с. 350-374.
54. Чиков, П. С. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР / П. С. Чиков. – Москва : Картография, 1983. – 340 с.
55. Чмора, С.Н. Глобальное повышение CO<sub>2</sub> в атмосфере и адаптивная стратегия растений / С.Н. Чмора, А.Т. Мокроносов // Физиология растений. 1994. – т. 41, №5. – С. 768-778
56. Шабунин, Д. А. Исследования по микроклональному размножению лесных пород в Санкт-Петербургском научно-исследовательском институте лесного хозяйства [Электронный ресурс] / Д. А. Шабунин // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2014. – № 2. – С. 32-36. – Режим доступа: <http://elibrary.ru/download/22212350.pdf>
57. Шейкина, О. В. Генетическая изменчивость и дифференциация суходольной и болотной ценопопуляций сосны обыкновенной в республике Марий Эл [Электронный ресурс] / О. В. Шейкина, Ю. П. Демаков, Ю. Ф. Гладков, О. В. Унженина // Политематический сетевой электронный Научный журнал КубГАУ. - 2013. – №94(10). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/54.pdf>
58. Широков, А.И. Основы биотехнологии растений : Электронное учебно-методическое пособие / Широков А.И., Крюков Л.А. – Нижний Новгород : Нижегородский госуниверситет, 2012. – 49 с.
59. Ширяева, Г. А. Регенерация ели европейской *in vitro* и причины variability морфогенетического потенциала / Г. А. Ширяева, Л. А.

- Лебеданко, П. В. Божков // Анатомия, физиология и экология лесных растений : Материалы XXVI сессии Комиссии им. Л.А.Иванова / Институт леса Карельского научного центра РАН. – Петрозаводск, 1992. - С.203-206
60. Щербаков, Е. Сосновый генотип. Прибайкальские леса восстанавливают улучшенными семенами [Электронный ресурс] / Е. Щербаков. – Электрон. журн. – Российские лесные вести, 2012. – Режим доступа: <http://www.lesvesti.ru/news/expert/3752/>
61. Abrahamsson M. Degeneration pattern in somatic embryos of *Pinus sylvestris* L. / M. Abrahamsson, S. Valladares, I. Merino, E. Larsson, S. von Arnold // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant, 2017. – Vol. 53, № 2. – PP. 86–96.
62. Bonga, J.M. The effect of various culture media on the formation of embryo-like structures in cultures derived from explants taken from mature *Larix decidua* / J.M. Bonga // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2004. – Vol. 77, №1. – PP. 43–48. . – Режим доступа: <https://link.springer.com/article/10.1023%2FB%3AATICU.0000016488.79965.b7>
63. Cairney, J. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis / J. Cairney, G.S. Pullman // New Phytologist. – 2007. – № 176. – PP. 511-536
64. Carneros, E. Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis / E. Carneros, C. Celestino, K. Klimaszewska, Y.-S. Park, M. Toribio, J.M. Bonga // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC): Journal of Plant Biotechnology. – 2009. – Vol. 98, №2. – PP. 165–178
65. Celestino, C. Cloning stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis / C. Celestino, E. Carneros, M. Ruiz-Galea, N. Alonso-Blázquez, J. Alegre, M. // Toribio Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens. – 2013. – № 105. – PP. 89-96
66. Chu C.-C. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments on the nitrogen sources / C.-C. Chu, C.-C. Wang, C.-S. Sun, C. Hsu, K.-C. Yin, C.-Y. Chu, F. Bi // Sci. Sinica. – 1975. – Vol. 18. – PP. 659-668

67. Farias-Soares, F. L. The transition of proembryogenic masses to somatic embryos in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze is related to the endogenous contents of IAA, ABA and polyamines [Электронный ресурс] / F. L. Farias-Soares [et al] // Acta Physiologiae Plantarum, 2014. – Vol. 36, № 7. – PP. 1853–1865. – Режим доступа: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11738-014-1560-6>
68. Farmer, E.E. Plant biology: jasmonate perception machines / E.E. Farmer // Nature. – 2007. – № 448. – PP 659–660
69. George, E. F. The Components of Plant Tissue Culture Media I : Macro- and Micro-Nutrients / E. F. George, M. A. Hall, G-J. de Klerk // Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. – 2008. – Vol. 1. – PP. 65-114
70. Gutmann, M. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch / M. Gutmann, P. von Aderkas, P. Label, M.-A. Lelu // Journal of Experimental Botany, – 1996. – Vol. 47, № 305. – PP. 1905-1917
71. Haggman, H. Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction / H. Haggman, A. Jokela, J. Krajnakova, A. Kauppi, K. Niemi, T. Aronen // Journal of Experimental Botany. – 1999. – №50. – PP. 1769-1778.
72. Kartha, K. K. Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*) / K. K. Kartha, L. C. Fowke, N. L. Leung, K. L. Caswell, I. Hakman // Journal of Plant Physiology. – 1988. – № 132. – PP. 529–539
73. Keinonen-Mettälä, K. Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris* / K. Keinonen-Mettälä, P. Jalonen, P. Eurola, S. Arnold, K. Weissenberg, J Scand // For Res. – 1996. – № 11. – PP. 242-250
74. Klimaszewska, K. Conifer somatic embryogenesis: I. Development / K. Klimaszewska, D. R. Cyr // Dendrobiology. – 2002. – V. 48. – PP. 31-39.
75. Klimaszewska, K. Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum / K. Klimaszewska, D. R. Smith // Physiol Plant. – 1997. – №100. – PP. 949–957.

76. Lara-Chavez, A. Initiation of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Oocarpa pine* (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schlechtendal) [Электронный ресурс] / A. Lara-Chavez, B. S. Flinn, U. Egertsdotter // Tree physiology. – 2011. – Vol. 31, № 5. – PP. 539-554. – Режим доступа: [http://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content\\_public/Journal/treephys/31/12/10.1093/treephys/tpr126/2/tpr126.pdf?Expires=1483109998&Signature=JHw1RwSKq71FTNDRKkq66OOof68yqR69ypkwYDp3zOIN3Gs~7mPi~BxN0Ifi8y9PavVFxKbuxvcJUPyASdU9Z2rIH8~fFZ7hgfo2tk76JudEeM31OYYEDHPZQEhgfOtzJcXpAq8lOwrde~9RaqC3GvMoh5yY1ZnDan7rs2Hn79ECsEJqcZQmoxS68FiobAubhYCHi7CnyFGBrQDTii7USREDL8Orei3BfpCyyMroQQZpCZiXFQRF3nhi821OyM2TONuOKq8asObGBjmBfF2-UU5jsAATCHVNLZSW1q5BUWQCA5G4QFjxPUWPyxsrKhuDL7rJVvgWNgMCq5kUchch9w\\_&Key-Pair-Id=APKAIUCZBIA4LVPAVW3Q](http://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal/treephys/31/12/10.1093/treephys/tpr126/2/tpr126.pdf?Expires=1483109998&Signature=JHw1RwSKq71FTNDRKkq66OOof68yqR69ypkwYDp3zOIN3Gs~7mPi~BxN0Ifi8y9PavVFxKbuxvcJUPyASdU9Z2rIH8~fFZ7hgfo2tk76JudEeM31OYYEDHPZQEhgfOtzJcXpAq8lOwrde~9RaqC3GvMoh5yY1ZnDan7rs2Hn79ECsEJqcZQmoxS68FiobAubhYCHi7CnyFGBrQDTii7USREDL8Orei3BfpCyyMroQQZpCZiXFQRF3nhi821OyM2TONuOKq8asObGBjmBfF2-UU5jsAATCHVNLZSW1q5BUWQCA5G4QFjxPUWPyxsrKhuDL7rJVvgWNgMCq5kUchch9w_&Key-Pair-Id=APKAIUCZBIA4LVPAVW3Q)
77. Lelu, M.-A. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators / M.-A. Lelu, C. Bastien, A. Drugeault, M.-L. Gouez & K. Klimaszewska // Physiologia Plantarum. – 1999. – №105. – PP. 719–728.
78. Lelu-Walter, M.-A. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis / M.-A. Lelu-Walter, M. Bernier-Cardou, K. Klimaszewska // Plant Cell Tissue and Organ Cultures. – 2008. – Vol. 92. – PP. 31-45
79. Lelu-Walter, M. A. Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction [Электронный ресурс] / M. A. Lelu-Walter [et al.] // Tree genetics & Genomes. – 2013. – Vol. 9, №. 4. – PP. 883-899 – Режим доступа: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11295-013-0620-1>
80. Litvay, J. D. 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.) / J. D. Litvay, D. C. Verma, M. A. Johnson // Plant Cell Rep. – 1985. – №4. – PP. 325-328.

81. Mashayekhi-Nezamabadi, K. The protein synthesis spectrum during the induction phase of somatic embryogenesis in carrot (*Daucus Carota* L.) cultures and the role of nitrogen forms for embryo development [Электронный ресурс] : diss. for a Ph.D / Kaveh Mashayekhi-Nezamabadi. – Giessen : Justus Liebig University, – 2000. – PP. 199 - – Режим доступа: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2001/547/pdf/d010151.pdf>
82. Mulgund, G.S. Role of salicylic acid on conifer somatic embryogenesis / G.S. Mulgund, N.T. Meti, R.B. Malabadi, K. Nataraja, S. V. Kumar // Research in Biotechnology, – 2012. – Vol. 3, №2. – PP 57-61
83. Niskanen, A.-M. Clonal variation in Scots pine (*Pinus sylvestris*) and in transgenic Silver birch (*Betula pendula*) [Электронный ресурс] : dissertations forestales 157 / A.-M. Niskanen. - Helsinki. – 2013. – 62 p. – Режим доступа: <http://www.metla.fi/dissertationes/df157.pdf>
84. Niskanen, Am Lu J. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*) / Am Lu J. Niskanen, S. Seitz, K. Keinonen, K. Von Weissenberg, A. Pappinen // Tree Physiology. – 2004. – № 24. – PP. 1259–1265.
85. Park, Y.-S. Industrial Implementation of Multi-Varietal Forestry for Spruces in New Brunswick, Canada [Электронный ресурс] / Y.-S. Park, G. Adams // Vegetative Propagation & Deployment of Varieties – The Scope for Europe: Treebreedex Meeting. – 2014. – Режим доступа: [http://treebreedex.eu/IMG/pdf/VegProp\\_0409\\_pres\\_Park\\_YS.pdf](http://treebreedex.eu/IMG/pdf/VegProp_0409_pres_Park_YS.pdf)
86. Park, Y.-S. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster* and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France / Y.-S. Park, M.-A. Lelu-Walter, L. Harvengt, J. F. Trontin, I. MacEacheron, K. Klimaszewska, J. M. Bonga // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. – 2006. – Vol. 5, № 86. – PP. 87–101.

87. Park, Y.-S. Multi-Varietal Forestry: a new paradigm in tree breeding and deployment through partnerships [Электронный ресурс] / Y.-S. Park // Treebreedex Meeting October 12-14, 2010 - Limoges, France. - 2010. Режим доступа: [http://treebreedex.eu/IMG/pdf/TBDX\\_LimogesOct2010\\_Park.pdf](http://treebreedex.eu/IMG/pdf/TBDX_LimogesOct2010_Park.pdf)
88. Patent US 005294549 A, grant Method for reproducing conifers by somatic embryogenesis using mixed growth hormones for embryo culture [Электронный ресурс] / G. S. Pullman, P. K. Gupta. - № US 07/814976 ; 12.23.1991 ; 03.15.1994. –17 p.– Режим доступа: <http://www.freepatentsonline.com/5294549.pdf>
89. Patent US 005856191 A, grant, Method for regeneration of coniferous plants by somatic embryogenesis in culture media containing abscisic acid / L. W. Handley III. – 8.04.1997 ; 5.01.1999. –18 p.
90. Patent US 20030113916 A1, PCT / MX 2001 / 000003. Method for producing somatic embryos of scot pine (*P. sylvestris*) / C. R. Serrano. - № US 10/220483 ; 28.08.2002 ; 19.06.2003 –16 p.
91. Patent US 20060051868 A1, grant, Methods for increasing conifer somatic embryo initiation, capture, and multiplication / G. S. Pullman, G. F. Peter. - № 11/265,474 ; 01.11.2005 ; 09.03.2006. –16 p.
92. Patent US 7,906,334 B2 Method for reproducing conifers by somatic embryogenesis using lactose as a carbon source [Электронный ресурс] / P. Denchev [et al.] ; Cellfor Inc. - № 10/764,978 ; 23.01.2004 ; 15.03.2011, № 45 – 16 p. – Режим доступа: <https://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US7906334.pdf>
93. Patent US 7732205 B2, grant. Development and stratification of pine somatic embryos using a liquid system / P. K. Gupta, D. G. Holmstrom, B. Larson, J. Zucati. - № US 10/875,656 ; 24.07.2004 ; 8.07.2010. – 11 p.
94. Patent US 7888099 B2, grant. Methods for producing a synchronized population of conifer somatic embryos [Электронный ресурс] / P. K. Gupta, D. Holmstrom, B. Larson. – № US 10/636,081 ; 06.08.2003 ; 15.02.2011. – 9 p. –

Режим доступа: <https://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US7888099.pdf>

95. Pullman, G. S. Conifer somatic embryogenesis: improvements by supplementation of medium with oxidation-reduction agents / G. S. Pullman [et al.] // *Tree Physiology*. – 2015. – №35. – PP. 209–224.
96. Pullman, G. S. Gibberellin inhibitors improve embryogenic tissue initiation in conifers / G. S. Pullman, J. Mein, S. Johnson, Y. Zhang // *Plant Cell Rep.* – 2005. – Vol. 23, № 9. – PP. 596–605
97. Pullman, G. S. Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression / G. S. Pullman, S. Johnson, G. Peter, J. Cairney, N. Xu // *Plant Cell Rep.* – 2003. – №21. – PP. 747–758
98. Pullman, G. S. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using absorbent materials in the development stage media / G. S. Pullman, P. K. Gupta // U.S. Patent №. 5,034,326. – 1991
99. Pullman, G. S. Pine somatic embryogenesis: analyses of seed tissue and medium to improve protocol development / G. S. Pullman, K. Bucalo // *New forests*. – 2014. – Vol. 45, № 3. – PP. 353-377
100. Rai, M. K. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress / M. K. Rai, N. S. Shekhawat, Harish, A. K. Gupta, M. Phulwaria, K. Ram, U. Jaiswal // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2011. – Vol.106, №2. – PP. 179–190
101. Smertenko, A. P Reorganisation of the cytoskeleton during developmental programmed cell death in *Picea abies* embryos / A. P. Smertenko, P. V. Bozhkov, L. H. Filonova, S. von Arnold, P. J. Hussey // *The Plant Journal*. – №33. – 2003. – PP. 813-824.
102. Smertenko, A. P. Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning [Электронный ресурс] / A. P. Smertenko, P. V. Bozhkov // *Journal of Experimental Botany*. – Vol. 65, № 5. – 2014. – PP. 1343-

1460. – Режим доступа:

<http://jxb.oxfordjournals.org/content/early/2014/03/11/jxb.eru005.short>

103. Solís-Ramos, L. Y. Somatic Embryogenesis in Recalcitrant Plants [Электронный ресурс] / L. Y. Solís-Ramos [et al.] // Embryogenesis : Edited by Dr. Ken-Ichi Sato InTech. – 2012. – PP. 597-618. – Режим доступа: [https://www.researchgate.net/publication/224830491\\_Somatic\\_Embryogenesis\\_in\\_Recalcitrant\\_Plants](https://www.researchgate.net/publication/224830491_Somatic_Embryogenesis_in_Recalcitrant_Plants)
104. Wu, D. Myo-inositol hexakisphosphate, isolated from female gametophyte tissue of loblolly pine, inhibits growth of early-stage somatic embryos [Электронный ресурс] / D. Wu [et al.] // Journal: New Phytologist. – 2012. – Vol. 193, № 2. – PP. 313-326. – Режим доступа: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2011.03928.x/pdf>





## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Носкова М. А., Нокова Н. Е., Аксиненко М. А. Особенности развития соматических зародышей у сибирских сосен на стадии синхронизации и созревания / Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии : Материалы XVII Междунар. научно-практич. конф. / Алтайский гос. ун-т. – Барнаул, 2018. (в печати)
2. Носкова М.А., Аксиненко М.А. Влияние предобработки на созревание соматических зародышей у сибирских сосен / Экология России и сопредельных территорий : Материалы XXII Междунар. экол. студенческой конф. / Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2017. – С. 159. Режим доступа: <https://drive.google.com/file/d/1acjZe-I47eF1job-D131KkNXXuVD31vh/view>
3. Носкова Н.Е., Носкова М.А., Аксиненко М.А. Оптимизация технологии соматического эмбриогенеза сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) // Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты: Годичное собрание ОФР, науч. конф. и школа для мол. уч., 18-24 сент. 2017 г., Судак: сб. мат. докл./ Отв.ред. Вл.В. Кузнецов – М: Изд-во АНО «Центр содействия научной, образовательной и просветительской деятельности «Соцветие», 2017. – С. 252. – Режим доступа: [http://ofr.su/assets/files/annual/crimea2017/OFR2017\\_sbornik\\_thesis.pdf](http://ofr.su/assets/files/annual/crimea2017/OFR2017_sbornik_thesis.pdf)
4. Носкова, М. А. Оптимизация соматического эмбриогенеза сосны обыкновенной на стадии пролиферации и сохранения эмбриогенных масс // Экология Южной Сибири и сопредельных территорий : сб. ст. XX международной научной школы - конференции студентов и молодых ученых : Выпуск 20. В 2 т. Т. I. / отв. ред. В. В. Анюшин. – Абакан : Издательство ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет» им.Н.Ф. Катанова, 2016. – С. 31-32.
5. Носкова М. А., Влияния форм неорганического азота на пролиферацию и сохранение эмбриогенных масс сосны обыкновенной в культуре *in vitro* //

Экология России и сопредельных территорий : материалы XXI Междунар. экол. студенческой конф. / Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2016. – С. 231

6. Носкова Н. Е., Носкова М. А. Предпосылки использования биотехнологии соматического эмбриогенеза у хвойных в России // Экология, окружающая среда и здоровье человека: XXI век: сб. статей по материалам Междунар. науч.-практич. конф. / Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2016. –С. 319-324

## ПРИЛОЖЕНИЯ



Рисунок А.1 - Распределение преобладающих пород по территории Российской Федерации (О состоянии..., 2017)

Таблица А. 1 - Морфолого-анатомическая характеристика эмбрионных масс на среде для созревания

Вариант предобработки	Эффективность «просушивания» массы	Морфолого-анатомическая характеристика
ТБГ	Сухая масса	РЕМ единично, головки СЗ разных размеров, суспензоры, в основном, короткие, рыхлые, единично встречаются длинные суспензоры, идет кливаж головок СЗ.
ТБГ	Влажная масса	В основном РЕМ III, головки формируются на РЕМах или коротких суспензорах
ЖБГ	Сухая масса	Встречаются РЕМ III, суспензоры и головки плотные, идет кливаж, суспензоры короткие, встречаются и длинные, отходят от РЕМ III, сильно ветвятся с головками СЗ. СЗ на разных стадиях развития. Отрастание массивов от РЕМ III и их дальнейшая дифференциация. Регенерация зародышей клетками суспензора. Кусочки массы неоднородны по морфолого-анатомической характеристике
ВБГ	Влажная масса	РЕМ III, головки единичные, сидят на РЕМах, рыхлые, не развиваются. Суспензоров нет масса однородная
ВАГ	Сухая масса	Крупные РЕМ, клеточные стенки утолщены, короткие эмбриональные трубки сильно вакуолизированы, имеются тяжи длинных клеток, встречаются вакуолизированные клетки с утолщенными стенками
ЖАГ	Влажная масса	В основном РЕМ, встречаются единично головки на РЕМах, встречаются вакуолизированные клетки с утолщенными стенками
ТАГ	Сухая масса	Образуются вторичные ЭСМ, Гипертрофированные суспензоры с утолщенными клеточными стенками, клетки вакуолизированы, единично встречаются нормальные СЗ с плотными головками и суспензорами. Встречаются сросшиеся головки, как сиамские близнецы. Кливаж редко
ТА	Сухая масса	В основном РЕМ III, у которых мелкие клетки вакуолизированы, головки СЗ рыхлые, редко встречаются короткие рыхлые суспензоры, суспензороподобные образования, тянущиеся к неоформленным головкам.
ЖА	Влажная масса	В основном РЕМ III, головки единично на РЕМах, суспензоров нет, головки рыхлые не развиваются, масса однородная,
ТА	Влажная масса	В основном РЕМ III, головки единично, плотные, сидят на РЕМах, есть имитация головок
ВА	Влажная масса	Единично рыхлые на РЕМах, тяжи клеток, напоминающие фрагменты суспензоров



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

подпись инициалы, фамилия

« 15 » июня 2018 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Оптимизация технологии соматического эмбриогенеза плюсовых деревьев  
*Pinus sylvestris* L.

06.04.01. Биология

06.04.01.02. Физиология растений

Научный руководитель	<u>Толст</u> 17.06.2018	проф., д-р. биол. наук.	<u>Т. И. Голованова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Научный руководитель	<u>И. Н. Третьякова</u> 17.06.2018	проф., д-р. биол. наук.	<u>И. Н. Третьякова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	<u>М. А. Носкова</u> 15.06.2018		<u>М. А. Носкова</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	<u>Казаченко</u> 17.06.2018	ст. науч. сотр., канд. биол. наук	<u>А. С. Казаченко</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2018