

На правах рукописи



Филиппова Ирина Панфиловна

АДВЕНТИВНОЕ ПОЧКООБРАЗОВАНИЕ И КАЛЛУСОГЕНЕЗ У
СИБИРСКИХ ВИДОВ ХВОЙНЫХ
В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

03.01.05 - физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2010

Работа выполнена в федеральном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет»

Научный руководитель доктор биологических наук,
профессор
Третьякова Ираида Николаевна

Официальные оппоненты доктор биологических наук,
профессор
Тихомиров Александр Аполлинарьевич

доктор биологических наук
Новикова Татьяна Ивановна

Ведущая организация Сибирский институт физиологии и
биохимии растений СО РАН
(г. Иркутск)

Защита состоится « 27 » января 2011 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.099.15 при Сибирском федеральном университете по адресу: 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Сибирского федерального университета.

Автореферат разослан «_____» декабря 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук, доцент



Гаевский Н. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Методы культуры тканей растений *in vitro* находят все большее применение в фундаментальных и прикладных исследованиях в области физиологии, генетики, эмбриологии и целом в биологии развития растений. Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально новых методов вегетативного размножения, таких как микрочеренкование, адвентивное почкообразование и соматический эмбриогенез (Биотехнология растений, 1989). Использование этих методов, разработанных на покрытосеменных растениях, представляет значительный интерес для микрклонального размножения хвойных видов.

Культура тканей хвойных *in vitro* может играть важную роль в генетико-селекционных программах лесовосстановления древесных видов, так как репродуктивный потенциал этих видов снижается (Третьякова, Бажина, 1996). Однако, в исследованиях, которые проводятся с культурами *in vitro* органов, тканей и клеток растений одной из наиболее актуальных проблем является индукция морфогенеза. Особенно остро эта проблема стоит перед исследователями, работающими с древесными в том числе и хвойными растениями, поскольку известно, что морфогенетические процессы в условиях *in vitro* индуцируются у них с большим трудом, характеризуются нестабильностью и трудной воспроизводимостью (Савельев и др., 2008). В то же время открытие у хвойных соматического эмбриогенеза (Nakman et al., 1985; Chalupa, 1985) и адвентивного почкообразования (Хмара, Катаева, 1993; Arnold, 1982; Lapp et al., 1995; Gonzales et al., 1998; Renau-Morata et al., 2005) в культуре *in vitro* свидетельствует о множественности реализации морфогенетических программ у данного класса растений в контролируемых условиях и способности хвойных видов к массовому размножению через методы культуры тканей.

Цель и задачи исследования. Цель исследования – изучение закономерностей адвентивного почкообразования и каллусогенеза у ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.), лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в культуре *in vitro*.

В соответствии с поставленной целью в задачи исследований входило:

- выбор эксплантов и подбор оптимальных условий культуры *in vitro* для каллусогенеза;
- установление оптимальных концентраций цитокининов в питательной среде для адвентивного почкообразования;
- проведение гистологического контроля на разных сроках культуры *in vitro* эксплантов в условиях направленного органогенеза;
- оценка эффективности индуцирующего действия «импульсной» обработки эксплантов высокими концентрациями цитокинина (6-БАП) на образования адвентивных почек.

Научная новизна. Выявлены общие закономерности и специфические особенности культивирования эксплантов сибирских видов хвойных *in vitro*.

Впервые проведен гистологический анализ образования адвентивных почек у зародышей ели сибирской, сосны обыкновенной и лиственницы сибирской. Впервые к эксплантам сибирских видов хвойных (зрелым зиготическим зародышам и семядольным хвоинкам проростков) была применена методика пульсирующей обработки с высокими концентрациями цитокинина, в результате чего происходило активное адвентивное почкообразование в условиях культуры *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные данные о закономерностях адвентивного почкообразования и каллусогенеза у ели сибирской, лиственницы сибирской и сосны обыкновенной расширяют информацию о роли фитогормонов в регуляции процессов онтогенеза растительного организма. Результаты исследований могут быть использованы в генетико-селекционных программах лесовосстановления лесных древесных видов, а также могут быть включены в учебную программу подготовки специалистов по специальности Биология.

Положения, выносимые на защиту:

1. Цитокинины стимулируют образование адвентивных почек у хвойных в культуре *in vitro*.
2. Формирование адвентивных почек идет по типу развития апикальных меристем.

Личный вклад соискателя. Диссертантом непосредственно проведен информационный поиск и сделан анализ данных научной литературы, подготовлен обзор. Автором спланированы и проведены лабораторные эксперименты, изготовлены временные и постоянные препараты, собраны почки и семена с изучаемых объектов (семена из Богучанского лесхоза любезно предоставлены к.б.н. Кузьминой Н. А.).

Апробация работы. Основные материалы, содержащиеся в диссертационной работе, были представлены и докладывались на следующих конференциях: II Российской конференции «Флора и растительность Сибири и Дальнего Востока» (Красноярск, 1996), международной научно-практической конференции «Генетика и селекция на службе лесу» (Воронеж, 1996), конференции молодых ученых КНЦ СО РАН (Красноярск, 1997), VII международной конференции «Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда» (Москва, 1997), международной конференции по анатомии и морфологии растений (С-Петербург, 1997), международной конференции «The supporting roots structure and function» (France, Bordeaux, 1998), II (X) съезде Русского ботанического общества «Проблемы ботаники на рубеже XX-XXI веков» (С-Петербург, 1998), IX международном симпозиуме «Реконструкция гомеостаза» (Красноярск, 1998), IUFRO Interdivisional Symposium «Larix-98: World Resources for Breeding Resistance and Utilization» (Красноярск, 1998), международной конференции «Леса и лесообразовательный процесс на Дальнем Востоке» (Владивосток, 1999), X международного симпозиума «Концепция гомеостаза: теоретические, экспериментальные и прикладные аспекты»

(Красноярск, 2001), международной конференции «Биологические ресурсы и устойчивое развитие» (Пушино, 2001), международном симпозиуме «Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология» (Москва, 2001), II международной конференции по анатомии и морфологии растений (С-Петербург, 2002).

Публикации. По материалам диссертации была опубликована 21 работа, три из которых в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых перечнем ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 145 страницах и состоит из введения, пяти глав, выводов, списка использованной литературы (246 источников, в том числе 149 иностранных) и включает 17 таблиц и 44 рисунка.

Благодарности. Автор признателен д.б.н. П.П.Силкину за оказанное содействие в выполнении ряда микрофотографий. Особую благодарность автор выражает научному руководителю – д.б.н. Третьяковой И.Н.

Диссертационная работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ (96-04-48257, 99-04-48578-а, 02-04-48168-а),

Содержание работы

Введение

Во введении обозначены актуальность темы, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования.

Глава 1. Обзор литературы

В главе представлен анализ литературы по теме исследования. Рассматриваются компоненты питательных сред для культивирования *in vitro* (Смолов, Опанасенко, 2009; Измайлов, 1986; Бутенко, 1964; Иванова и др., 1997; Николаева и др., 2001; Winder, Nishio, 1995; Shelp et al., 1995; Romeu-Moreno, Mas, 2000; Takatsuju, 1999; и др.). Обсуждается роль ауксинов и цитокининов в регуляции морфогенеза растений (Полевой, 1982; Кефели, 1974; Муромцев и др., 1987; Запрометов и др., 1994; Гусаковская и др., 2000; Ломин, Романов, 2008; Журавлев, Омелько, 2008; Legocka et al., 1990; Gan, Amasino, 1995; Saenz, Jones, 2003; Stirk, Novak, 2003 и др.). Особое внимание уделено вопросам использования методов культуры *in vitro* (калусных культур и адвентивному почкообразованию) применительно к хвойным растениям (Момот, 1977; Руте, Мауриня, 1989; Хмара, Катаева, 1993; Кунах, 1999; Галеева и др. 2001; Румянцева и др., 2005; Arnold, 1982; Toribio, Pardos, 1986; Flinn et al., 1988; Budimir, Vujicic, 1992; Harry, Thorpe, 1994; Lambardi et al., 1995; Lapp et al., 1995; Calixto, Pais, 1997; Gonzales et al., 1998 и др.).

Глава 2. Объекты и методы исследований

Объектами исследований являлись представители семейства *Pinaceae*: лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb.), сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) и ель сибирская (*Picea obovata* Ledeb.), произрастающие в естественных древостоях и в искусственных насаждениях. С этих видов растений в качестве растительного материала были взяты почки и семена.

Сбор терминальных и латеральных почек проводили с деревьев *Larix sibirica* и *Picea obovata* в возрасте 25-30 лет вступивших в фазу семеношения, произрастающих в Дендрарии и на Погорельском ОЭП Института леса СО РАН. Семена *Picea obovata* были получены из Емельяновского лесхоза, *Pinus sylvestris* – из Дендрария Института леса, *Larix sibirica* – с Богучанского лесхоза и Дендрария Института леса.

Зиготические зародыши из семян, проростки и почки деревьев вводились в культуру *in vitro* для получения каллусогенеза и органогенеза (Бутенко 1964, 1999; Калинин и др., 1980, Биотехнология растений, 1989; Biotechnology in Agriculture and Forestry, 1985).

Для выращивания культур *in vitro* использовали следующие питательные среды: MS, B5 (Биотехнология растений, 1989), LP (Arnold von, Eriksson, 1976) и T-SS (Taesdale, et al., 1986).

Полученные культуры регулярно пересаживали, на свежую среду через 28-30 суток. Культуры выращивали при 16 ч фотопериоде (освещение люминесцентными лампами 5 кЛк), при температуре воздуха $25\pm 1^\circ\text{C}$ днем и $22\pm 1^\circ\text{C}$ ночью и 70 % относительной влажности воздуха.

Частоту индукции каллусообразования (%) определяли как соотношение количества эксплантов, продуцирующих каллус, к общему количеству эксплантов. Интенсивность прироста сырой биомассы в течение пассажа рассчитывали по формуле $K = (M - M_0) / M_0$, где M – биомасса в конце пассажа, M_0 – биомасса в начале пассажа (Perez-Frances et al., 1995; Nin et al., 1996).

Для определения состояния фотосинтетического аппарата культур хвойных *in vitro* использовали метод термоиндуцированных изменений нулевого уровня флуоресценции хлорофилла (ТИНУФ) (Гаевский и др., 1991; Нестеренко и др., 2001).

Пульсирующую обработку растворами цитокинина (6-БАП) проводили по методике описанной в работе S. Arnold и T. Eriksson (1985). Для приготовления постоянных и временных препаратов использовали стандартные методы (Паушева, 1988). Эксперименты были проведены в трехкратной повторности, что дало 150 и более эксплантов для каждого эксперимента. Полученные данные обрабатывались с помощью общепринятых статистических приемов (Плохинский, 1970; Лакин, 1990). Достоверность оценивали с помощью критерия Стьюдента ($P \leq 0,05$). Математическая обработка материала и построение графиков проведены с помощью пакета прикладных программ «STATISTICA» и «MS Excel for Windows».

Глава 3. Каллусные культуры ели сибирской, лиственницы сибирской и сосны обыкновенной

На первом этапе изучения каллусогенеза хвойных проведено введение в культуру *in vitro* терминальных и латеральных почек, взятых от 25-30 летних деревьев *Picea obovata* и *Larix sibirica*. Для определения оптимальной питательной среды для культивирования исследуемых видов хвойных было

протестировано несколько сред MS, LP, B5 и T-SS, различающихся по уровню содержания и соотношения макро- и микроэлементов при полном составе, а также сред MS и LP в разведении 1:1. Все среды содержали одинаковое количество витаминов, инозита, сахарозы, гидролизата казеина и регуляторов роста растений (2,4-Д 1 мг/л и 6-БАП 1 мг/л).

Результаты экспериментов показали, что состав среды оказал существенное влияние на инициацию каллусов из почек деревьев исследуемых хвойных. Минеральный состав сред B5 и T-SS не способствовал каллусообразованию. На средах MS и LP полного минерального состава у эксплантов наблюдалось образование каллуса с разной интенсивностью от 8% (брахибласты *Larix sibirica*) до 40% (у *Picea obovata*). Снижение концентрации макроэлементов этих двух сред, разведением 1:1 увеличило процент каллусообразования у почек в 1,5-2 раза. Максимальная индукция каллуса наблюдалась у терминальных и латеральных почек ели сибирской (каллусообразование достигнуто в среднем у 53- 65% эксплантов). Все полученные каллусы имели зеленый цвет и плотную консистенцию. Однако в ходе нескольких последующих пересадок происходила гибель каллусов.

На следующем этапе экспериментов была проведена оценка каллусообразующей способности ювенильных эксплантов у ели сибирской, лиственницы сибирской и сосны обыкновенной. Проростки семян и зиготические зародыши этих видов, на всех типах сред (MS, ½ MS, LP, ½ LP, ¼ LP), с различным содержанием регуляторов роста растений ауксинов 2,4-Д, НУК, ИМК (0,5-2 мг/л) или с добавлением цитокининов 6-БАП, кинетина (0,5-5 мг/л) были способны к каллусогенезу.

Для проростков и зиготических зародышей этих трех видов хвойных максимальная частота образования первичного каллуса зарегистрирована на среде ½ MS с разным соотношением ауксинов (2,4-Д, НУК, ИМК) и цитокининов (6-БАП, кинетин) – 2:0, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5.

Гистологический анализ каллусообразования у эксплантов зрелых зиготических зародышей лиственницы сибирской, ели сибирской и сосны обыкновенной на 3-21 сутки культивирования показал, что первыми появились антиклинарные клеточные деления в первичной коре гипокотилия (3-5е сутки). На 10 сутки клетки этой ткани увеличились в три раза и были расположены рыхло. На 21 сутки, в образовании каллуса были вовлечены и другие ткани зародышей, а именно клетки прокамбия гипокотилия, эндодермы и центрального цилиндра.

Сравнение сырой биомассы первичных каллусов в зависимости от среды и концентрации регуляторов роста растений проведено на исследуемых видах хвойных, где в качестве эксплантов использовали двухнедельные проростки. Полученные результаты показали, что увеличение концентрации 2,4-Д (с 1 мг/л до 2 мг/л) в среде привело к увеличению биомассы первичных каллусов у всех исследуемых видов хвойных. Снижение концентрации макросолей MS в два раза, а также добавление 1

мг/л 6-БАП вместе с ауксином благоприятно сказалось на интенсивности каллусообразования. Однако, дальнейшее повышение концентрации 6-БАП, при постоянном количестве ауксина в питательной среде не привело к заметному отличию показателей биомассы от предыдущего варианта.

Наряду с 2,4-Д в работе был использован НУК. Сравнение воздействия двух ауксинов на некоторые характеристики каллусных тканей двух видов хвойных показало, что на среде $\frac{1}{2}$ MS с 2,4-Д для ели и лиственницы прирост сырой биомассы за время второго пассажа был выше в полтора раза, чем на среде $\frac{1}{2}$ MS с НУК. Замена 2,4-Д на НУК увеличило количество и размеры трахеид, но снизило величину митотического индекса (табл. 1).

Таблица 1 - Характеристика каллусных тканей ели сибирской и лиственницы сибирской в зависимости от используемого ауксина (2,4-Д 1 мг/л или НУК 1 мг/л)

Вид	Ауксин	Дифференцированные трахеальные элементы			Интенсивность прироста биомассы	Митотический индекс, ‰
		количество, шт/на поле	длина, мкм	ширина, мкм		
<i>Picea obovata</i>	2,4-Д	4,5±2,4	35,1±1,0	25,7±1,5	11,7	2,2
	НУК	10,2±1,9	42,3±1,0	41,3±1,2	6,6	0,2
<i>Larix sibirica</i>	2,4-Д	5,7±1,7	36,6±1,0	24,3±0,8	10,5	2,4
	НУК	12,3±2,1	40,6±0,8	38,9±1,9	7,1	0,4

В дальнейшей работе с каллусными культурами эти два ауксина (2,4-Д и НУК) использовали совместно, в результате чего были получены каллусные линии, которые росли 18 и более пассажей. Изучение интенсивности прироста сырой биомассы семи каллусных линий на среде одного состава показало, что более высокие темпы прироста биомассы каллусов у трех исследуемых видов хвойных наблюдались за время четвертого пассажа (каллусы 1-1, 2-1, 3-1) либо пятого пассажа (каллусы 2-2, 3-2, 3-3). Затем скорости роста замедлялись и оставались постоянными в ходе следующих пассажей, при этом присущая им окраска сохранялась.

По-видимому, наблюдаемое замедление роста каллусов исследуемых видов следует отнести к специфическим особенностям в культуре *in vitro* клеток голосеменных и, в частности, хвойных.

Использование метода ТИНУФ показало, что клетки каллусных культур исследуемых видов хвойных имели агранальный тип организации хлоропластов, с низким уровнем развития ФС II. В отличие от каллусов у проростков и органогенных культур преобладала гранальная организация, характерная для хлоропластов растений в условиях *in vivo*, с высокой степенью развития ФС II.

Еще одним фактором, определявшим успешный рост и существование изолированных органов и тканей растений *in vitro*, являлось количество углеводов в среде. Оценка влияния количества углеводов в среде на прирост биомассы каллусных культур исследуемых видов хвойных, (исходные

кallусы росли на среде $\frac{1}{2}$ MS с 2,4-Д 0,5 мг/л, НУК 0,5 мг/л, 6-БАП 1 мг/л и 3 % сахарозой) проведена на двух средах, отличающихся концентрацией углевода 1% и 3%. Прирост биомассы на среде с 1% сахарозой был ниже в 1,5 и более раз, чем на 3% сахарозе.

Все кallусы изучаемых видов хвойных, полученные на средах с добавлениями ауксинов, оказались не способными образовать какие либо органоподобные структуры, то есть не имели регенерационного потенциала.

Глава 4. Адвентивное почкообразование у ели сибирской, лиственницы сибирской и сосны обыкновенной и гистологический контроль эксплантов видов хвойных на средах с цитокининами.

Адвентивное почкообразование. Изучение способности к направленному органогенезу проводилось на терминальных и латеральных почках ауксибластов деревьев лиственницы сибирской и ели сибирской в возрасте 25-30 лет на среде $\frac{1}{2}$ MS с цитокининами. В качестве контроля служили экспланты посаженные на ту же среду, но без регуляторов роста ($\frac{1}{2}$ MS-0).

Результаты экспериментов показали, что на способность к реализации органогенеза *de novo* у почек взрослых деревьев лиственницы сибирской и ели сибирской влияли сроки взятия почек и тип цитокинина. Максимальное количество образовавшихся адвентивных почек на эксплант зарегистрировано для почек, взятых с деревьев в мае, и составило в среднем 2,4 почки *de novo* для лиственницы и 2,7 - для ели. Наиболее эффективным оказался 6-БАП (2 мг/л), в то время как другой фитогормон – кинетин, не способствовал появлению органогенеза у данных эксплантов.

Эксперименты по получению адвентивного почкообразования были сделаны и с использованием в качестве эксплантов зиготических зародышей ели сибирской, лиственницы сибирской и сосны обыкновенной.

Результаты показали, что повышение уровня 6-БАП в среде с 1 мг/л в два раза увеличило индукцию адвентивных почек у трех исследуемых видов хвойных, а концентрация 3 мг/л, по видимому, была уже избыточной, поскольку количество адвентивных почек существенно не отличалось от предыдущей концентрации фитогормона. Однако способность к органогенезу была различна между исследуемыми видами. Наибольшей органогенной активностью отличались экспланты ели сибирской, продуцировавшие в среднем до 15 почек на эксплант, при концентрации 2 мг/л 6-БАП.

На количество образовавшихся адвентивных почек воздействовало не только количество 6-БАП в среде, но и продолжительность индукционного периода на среде с этим фитогормоном. Экспозиция на гормональной среде с добавлением 2 мг/л 6-БАП в течение недели не влияла (сосна и лиственница), или влияла очень слабо (ель) на индукцию морфогенеза у зиготических зародышей. Увеличение индукционного периода до 14 и 21 суток способствовало повышению образования почек *de novo* у всех трех видов и

достигло максимально зарегистрированных величин, когда продолжительность экспозиции на среде с цитокинином составила 28 суток.

Изучение влияния кинетина на органогенез у трех видов хвойных показало, что этот фитогормон был менее эффективным по сравнению с 6-БАП, при всех исследуемых концентрациях. Так, для зиготических зародышей ели сибирской максимальное количество адвентивных почек составило в среднем всего 5,2 при 2 мг/л кинетина, для сосны и лиственницы - 1,8 и 2,7 соответственно. Удлинение адвентивных почек в побеги достигнуто на среде $\frac{1}{2}$ MS-0 (рис. 1).

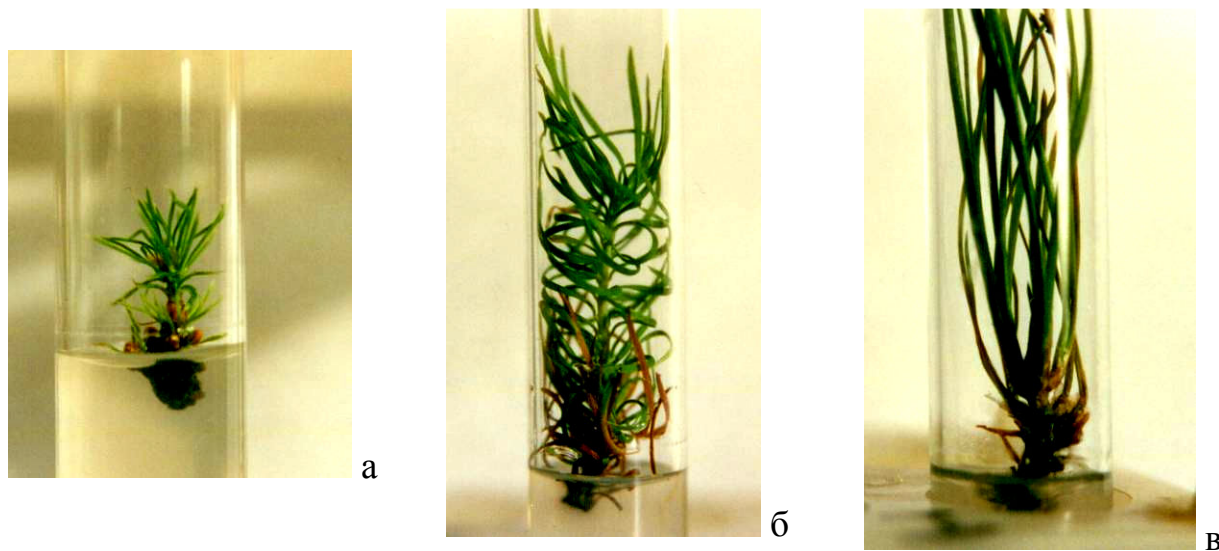


Рис. 1. Развитие побегов на среде $\frac{1}{2}$ MS-0 из адвентивных почек, полученных на зародышах хвойных под действием цитокинина ($\frac{1}{2}$ MS + 2 мг/л 6-БАП): а – ель сибирская (80 суток), б – лиственница сибирская (180 суток), в – сосна обыкновенная (180 суток).

Гистологический анализ эксплантов ели сибирской (зрелых зиготических зародышей) растущих на среде с 6-БАП (0-35 сутки). Для выяснения характера гистологических изменений у эксплантов под влиянием цитокинина были взяты зиготические зародыши ели сибирской, помещенные на среду $\frac{1}{2}$ MS с 2 мг/л 6-БАП, контроль – зародыши на среде $\frac{1}{2}$ MS-0. В контроле у зародышей на 3-21 сутки культивирования наблюдались единичные антиклинарные клеточные деления в корневой меристеме, прокамбии и апикальной меристеме побега, а также увеличение размеров центрального цилиндра и первичной коры, за счет растяжения клеток, так как количество клеточных слоев оставалось постоянным (рис. 2).

Морфологическая трансформация эксплантов ели наблюдалась на среде $\frac{1}{2}$ MS+6-БАП, в отличие от контроля. Отмечено увеличение гипокотыля в диаметре. Анализ эксплантов ели сибирской, росших на среде $\frac{1}{2}$ MS+6-БАП, на разных сроках культивирования проведенный с использованием постоянных препаратов, показал существенные гистологические изменения.

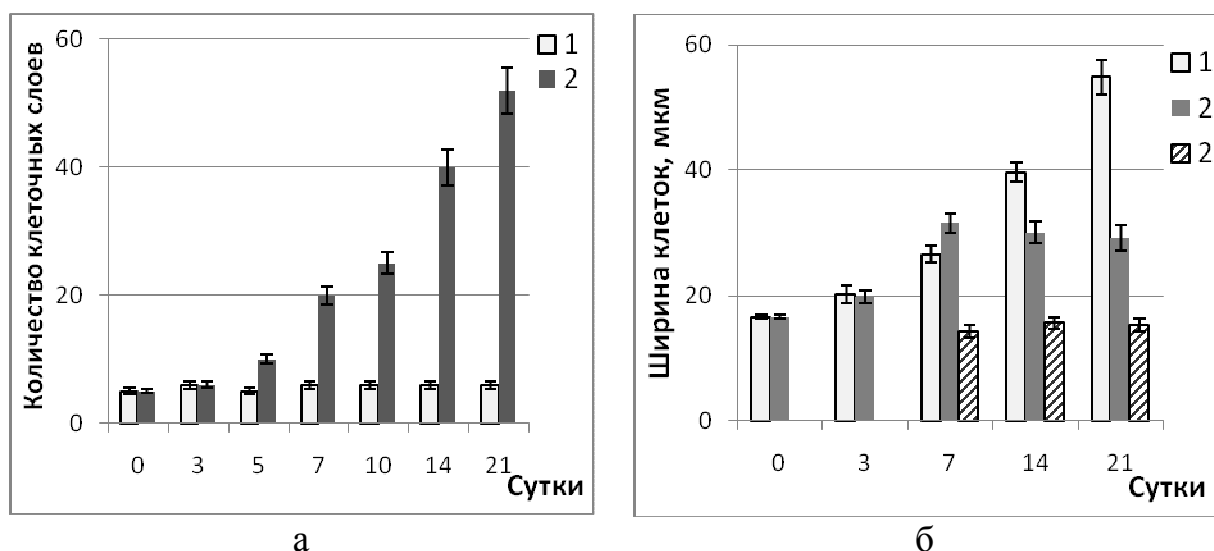


Рис. 2. Гистологические изменения в первичной коре гипокотилей зародышей ели сибирской в культуре *in vitro* под воздействием 2 мг/л 6-БАП: а - количество клеточных слоев в коре, б - ширина клеток коры: 1- среда 1/2 MS-0, 2- среда 1/2 MS+ 6-БАП (2 мг/л).

Отмечены периклинальные клеточные деления в слоях первичной коры гипокотыля на 3 сутки культивирования. Митотический индекс этой ткани составил 8 %. Однако, структурно увеличение количества слоев в коре еще не было выражено.

На 5 сутки культивирования в результате продолжающихся активных периклинальных делений происходила пролиферация новых слоев в первичной коре. Митотический индекс увеличился до 25 %. В этот период ядра клеток этой ткани нередко содержали по 2-6 и более ядрышек на срез ядра, что свидетельствует об интенсивных процессах белкового синтеза.

Количество слоев клеток в первичной коре возросло (до 20) на 7 сутки культивирования (Рис. 2 а). Эти клетки продолжали делиться и формировали группы мелких клеток ($14,3 \pm 0,6$ мкм), с плотной цитоплазмой. На 14 сутки культивирования количество слоев в первичной коре увеличилось до 40. На 21 сутки под эпидермальным слоем гипокотыля происходили интенсивные клеточные деления (митотический индекс - 46,3 %), в результате чего формировались локализованные органогенные участки – меристемоиды, предшественники меристем.

Изучение закономерностей формирования адвентивных почек у эксплантов ели сибирской под воздействием 6-БАП показало, что меристемоиды вначале своего развития еще не выступали над поверхностью экспланта (рис. 3 а). В результате продолжающихся клеточных делений они начинали выдаваться над поверхностью эксплантов (рис. 3 б). Клетки этих участков приближались по размерам к клеткам апикальной меристемы побега (14–18,5 мкм), и характеризовались крупным ядром, расположенным в центре и ограниченной вакуолизацией.

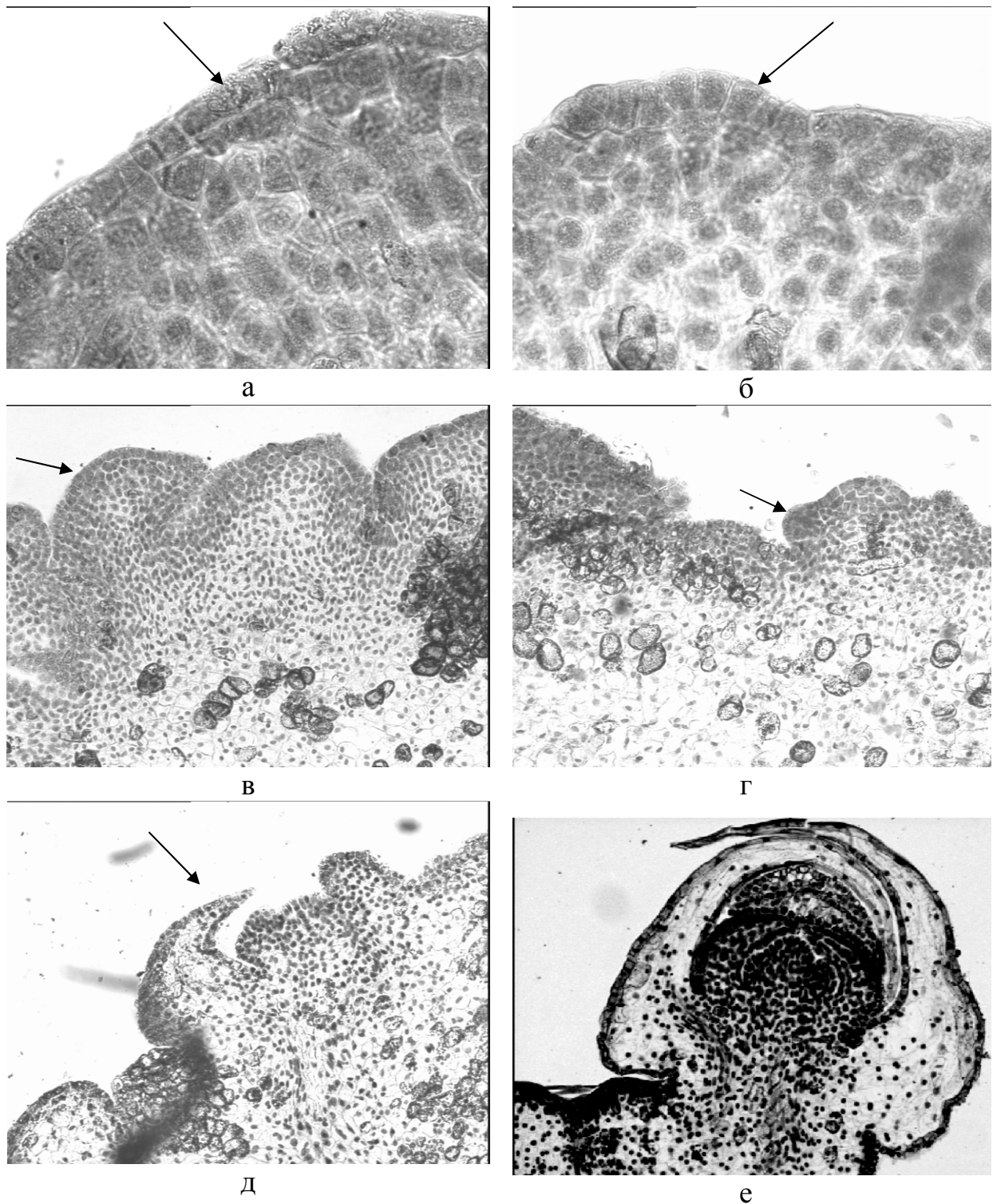


Рис 3. Этапы развития адвентивных почек у эксплантов ели сибирской под воздействием 6-БАП: а – появление меристемоида (x40), б, – меристемоид начинает выступать в виде бугорка (x40), в – формирование меристемы адвентивного побега (x20), г – появление первых примордиев хвоинок (x20), д – развитие хвоинок (x20), е – рост почки (x20).

На 28 сутки культивирования характер гистологических изменений сохранялся. Прослеживался постепенный переход от меристемоидов к апексам адвентивных почек. Меристемоиды росли в высоту и проходили

через стадию латерального расширения, они становились разделенными на отдельные области и появилась хорошо выраженная, характерная для хвойных зональность апикального купола. Таким образом, произошла дифференциация меристемы адвентивной почки (рис. 3 в). В этот срок в боковых частях некоторых апексов отмечено появление первых примордиев хвоинок (рис. 3 г). Формирование листового примордия началось с выбора группы клеток в периферийной зоне меристемы, сопровождаемого иницированием локального роста.

На 35 сутки наблюдалось развитие примордиев в хвоинки и образование следующих примордиев (рис. 3 д, е). В этот период в адвентивных почках ели сибирской уже отмечен прокамбий, меристематическая ткань, состоящая из удлинённых, цитоплазматически плотных клеток с характерным расположением (см. рис. 3 д, е).

Молекулярные сигналы, вызывающие формирование прокамбия не известны. Анализ маркерных генов в некоторых видах растений показал, что судьба клетки в растении определена, прежде всего, местоположением, и в меньшей степени происхождением клетки (Carland et al., 1999).

Самые базальные клетки прокамбия почек ели *de novo* начинали дифференцироваться в элементы ксилемы. Это раннее дифференцирование трахеальных элементов могло быть важным для успешного функционирования меристемы почки. Например, дифференцирование трахеальных центров являлось необходимым для формирования *in vitro* цветочных почек *de novo* на эксплантах *Nicotiana tabacum* (Wilms, Sassen, 1987).

Дифференцирование трахеид в эксплантах исследуемых видов хвойных на ранних сроках культуры *in vitro*. На 5 сутки культивирования на среде с 6-БАП у эксплантов ели сибирской отмечены группы коротких трахеид под апикальной меристемой побега в месте отхождения прокамбия семядолей и тяжи длинных трахеид в центральном цилиндре гипокотила. В последнем случае каждый тяж состоит из двух рядов трахеид. Все трахеальные элементы имели сетчатые либо спиральные утолщения клеточных стенок.

Дифференцировка трахеид из прокамбия семядолей произошла на 7 сутки. В центральном цилиндре количество прозенхимных трахеид в тяжах увеличилось до 4 – 5. На 14 сутки в гипокотиле отмечены трахеиды с окаймленными порами. Таким образом, начиная с 5 суток культуры *in vitro* начала формироваться первичная проводящая система эксплантов.

Такие же закономерности в развитии ксилемы зафиксированы и у зародышей ели на среде $\frac{1}{2}$ MS-0. Сходная зависимость прослежена и у зиготических зародышей лиственницы сибирской и сосны обыкновенной на среде с 6-БАП и в отсутствии фитогормона. Однако, у последнего вида процесс дифференцировки трахеид шел более интенсивно в семядолях, чем в гипокотиле. На 5 сутки *in vitro* у эксплантов сосны обнаружены элементы протоксилемы в семядолях и в месте отхождения прокамбия семядолей. На 7

сутки в гипокотиле дифференцировались трахеиды со спиральными утолщениями, а также трахеиды с окаймленными порами.

Гистологический анализ эксплантов ели сибирской культивируемых 60 суток в культуре *in vitro*. На поперечных срезах эксплантов ели сибирской (60 суток) среди паренхимных клеток обнаружены слои камбия в количестве 5-6. Просмотр серии срезов показал, что этот камбий никак не связан с первичной ксилемой. Расстояние, на котором расположен камбий от поверхности эксплантов в среднем составляет $210,3 \pm 10,9$ мкм. Протяженность камбия у эксплантов различна - от 426 мкм до 1560 мкм. Внутренние слои камбия дифференцировались в трахеиды с окаймленными порами, образуя, по-видимому, вторичную ксилему. Эти поры расположены в 2-3 ряда на тангентальных стенках, на радиальных стенках трахеид поры отсутствовали. Образования флоэмных элементов не отмечено.

Стимулом к появлению камбия, по-видимому, являлись развивающиеся адвентивные почки. Если адвентивные почки были расположены близко, то образовывался непрерывный тяж, поскольку камбий соединялся с прокамбием почки.

Таким образом, в условиях культуры тканей *in vitro* у ели сибирской наблюдалась дифференциация специализированной меристематической ткани - камбия. Такой характер анатомических изменений обнаружен только у ели.

У ряда эксплантов ели сохранился зародышевый корешок. На поперечном срезе он имел хорошо выраженную первичную кору и центральный цилиндр. Первичная кора состояла из экзодермы, с утолщенными клеточными стенками, мезодермы и эндодермы. В тоже время центральный цилиндр не был дифференцирован, проводящие элементы в нем не были развиты. Следовательно, зародышевый корешок у эксплантов ели сибирской в культуре *in vitro*, на среде с 6-БАП не получил своего дальнейшего развития, через растяжение и дифференцировку. Изменения затронули только первичную кору.

Гистологический анализ адвентивного почкообразования у эксплантов лиственницы сибирской и сосны обыкновенной. Образование адвентивных почек у сосны обыкновенной и лиственницы сибирской происходило на семядолях зиготических зародышей, у сосны на кончике семядолей, а у лиственницы в основании семядолей. Гистологический анализ проведенный на ранних сроках культивирования *in vitro* показал, что у лиственницы и сосны, уже на 5 сутки культуры на среде с 6-БАП митозы интенсивно шли только в семядолях.

Митотический индекс ткани будущего мезофилла семядолей составил 5 %. Выявлено, что в первичной коре гипокотиле у эксплантов сосны и лиственницы митозы практически отсутствовали. Клеточные деления у сосны наблюдались только в субэпидермальных слоях кончиков семядолей (рис. 4 а). На 10-14 сутки кончики семядолей сосны обыкновенной увеличивались, за счет интенсивного образования новых клеток (рис. 4 б, в).

Развитие меристемоидов отмечено на 21 сутки культивирования в присутствии цитокинина (рис. 4 г).

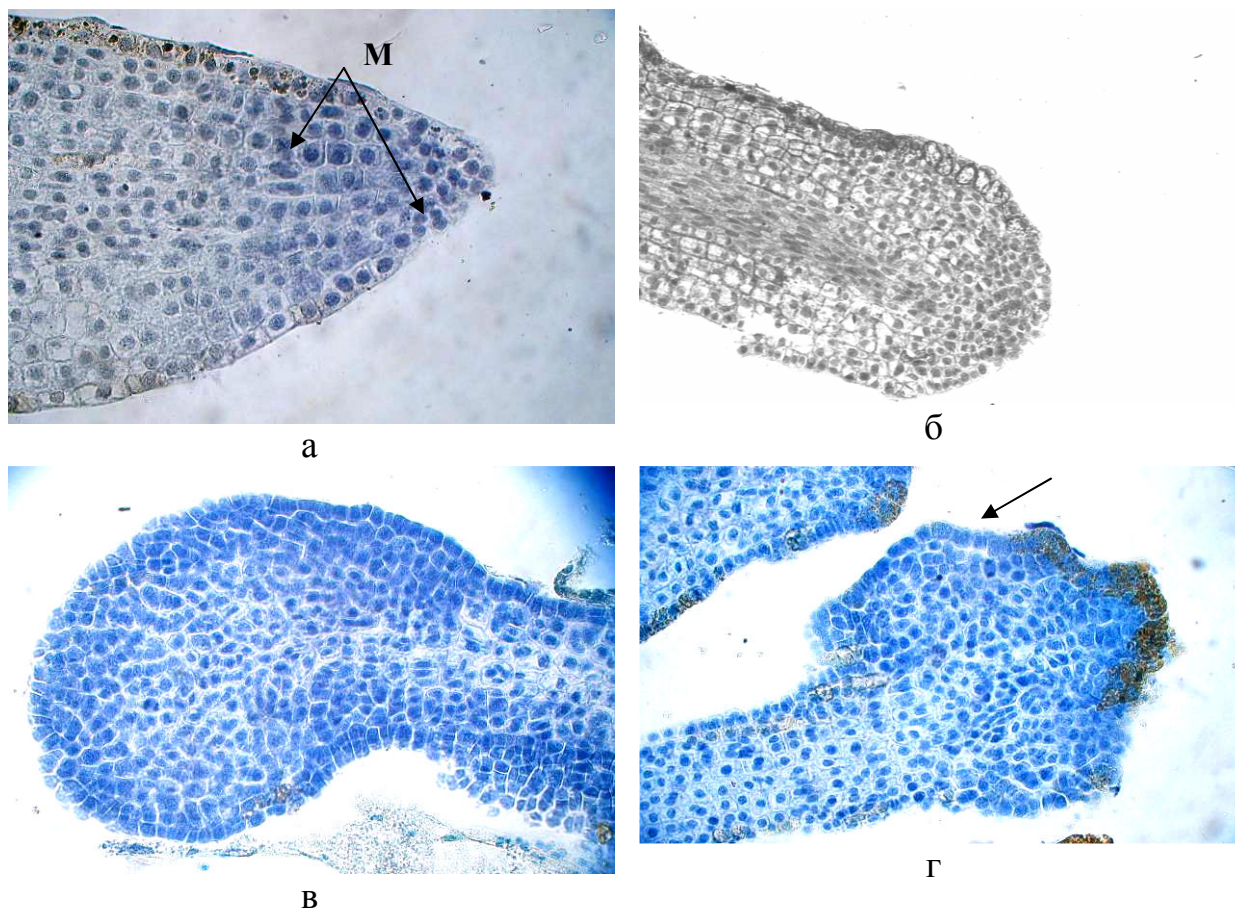


Рис. 4. Анатомические изменения семядолей сосны обыкновенной в процессе культивирования на среде с 6-БАП: а – митозы (М) в кончике семядоли на 5 сутки (x20), б - разрастание кончика хвоинки сосны на 10 сутки (x10), в –кончик хвоинки сосны на 14 сутки (x10), г –образование меристемоидов на кончике хвоинки сосны на 21 сутки (x10).

Проведено изучение строения хвоинок и стебля адвентивных растений и сравнение их с данными литературы и собственными наблюдениями. Показана общность структуры изученных органов хвойных растений в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Глава 5. Адвентивное почкообразование у эксплантов видов хвойных с использованием импульсной обработки цитокинином

Морфогенетический ответ у культивируемых *in vitro* тканей хвойных зависит от ряда факторов: вида, содержания питательных веществ, регуляторов роста и концентрация агара в среде (David et al., 1982; Bornman, 1983; Debergh, 1983). Эти факторы оказывают влияние на индукцию и развитие адвентивных почек у эксплантов. Одним из перспективных направлений в индукции адвентивных почек у хвойных является импульсная обработка (ИО) эксплантов цитокининами (Bornman, Vogelmann, 1984).

Проведена серия экспериментов для оценки возможности применения ИО в растворе 6-БАП (28 мг/л и 56 мг/л) разной продолжительности для получения адвентивных почек *in vitro* у сосны обыкновенной, лиственницы сибирской и ели сибирской с использованием двух типов эксплантов.

Экспланты – зрелые зиготические зародыши хвойных. Зрелые зиготические зародыши сосны обыкновенной были подвергнуты ИО в растворе 6-БАП с концентрацией 28 мг/л в течение 2, 4 и 6 ч. Затем помещены на среду ½ MS-0 вертикально или горизонтально по отношению к поверхности среды.

Исследование показало, что ориентация эксплантов относительно поверхности среды оказала влияние на размеры гипокотилия и семядольных хвоинок (табл. 2), которые одновременно зависели и от продолжительности ИО (при 28 мг/л 6-БАП). Отмечено, что уже на 7-е сутки культуры *in vitro* у горизонтально ориентированных эксплантов верхняя часть гипокотилия поднялась над поверхностью среды, в результате чего площадь контакта со средой уменьшилась. У вертикально ориентированных эксплантов площадь соприкосновения со средой в течении первой субкультуры (28 суток) не изменялась, а удлинение гипокотилия блокировалось. Во всех вариантах опыта на 28 сутки культуры размеры гипокотилия и длина семядольных хвоинок у горизонтальных эксплантов оказались больше ($P \leq 0,05$) чем у вертикальных и уменьшались с увеличением времени экспозиции.

Таблица 2 - Параметры развития зиготических зародышей сосны обыкновенной и количество адвентивных почек в зависимости от ориентации на среде ½ MS-0 (28 суток) после импульсной обработки раствором 28 мг/л 6-БАП разной длительности

Время ПО, ч	Положение эксплантов на среде	Длина гипокотилия, мм	Ширина гипокотилия, мм	Длина семядольных хвоинок, мм	Количество адвентивных почек на эксплант, шт
2	В	2,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,9 ± 0,5
2	Г	6,3 ± 0,3	2,4 ± 0,1	3,6 ± 0,1	1,9 ± 0,6
4	В	3,1 ± 0,2	2,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1 ^с	2,9 ± 0,5
4	Г	5,6 ± 0,2	2,6 ± 0,1	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,5
6	В	2,7 ± 0,3	1,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1 ^с	3,8 ± 0,4
6	Г	4,5 ± 0,2	2,5 ± 0,1	2,7 ± 0,1	4,3 ± 0,4

Примечание. В – вертикально ориентированные и Г – горизонтально ориентированные экспланты.

Обнаружено, что только длительность индукционного периода в растворе 6-БАП (28 мг/л) влияла на количество сформировавшихся почек *de novo* на одном зиготическом зародыше. При одной и той же продолжительности ИО и горизонтальные и вертикальные экспланты производили одинаковое число адвентивных почек (см. табл. 2). Увеличение времени ИО с 2 до 4 и 6 ч приводило к росту числа почек *de novo* у сосны

обыкновенной. Однако этот показатель все еще оставался достаточно низким, в среднем 3-4 почки на эксплант.

Для повышения количества адвентивных почек в следующих экспериментах была увеличена концентрация раствора 6-БАП для ИО в два раза (56 мг/л). Воздействие данной концентрации на зиготические зародыши сосны обыкновенной разной длительности (2-6 часов) привело к появлению витрифицированных эксплантов, тогда как при ранее используемой концентрации 6-БАП (28 мг/л) такие экспланты отсутствовали.

Результаты экспериментов показали, что при концентрации агара 6 г/л экспозиция при ИО зиготических зародышей сосны обыкновенной с 6-БАП сильно влияла на интенсивность витрификации (рис. 5). Так при выдерживании в растворе 6-БАП в течение 2 ч количество витрифицированных эксплантов составило 32-30%, тогда как при 6 часовой обработке этот показатель увеличился до 62-82%, в зависимости от положения экспланта на среде. Повышение содержания агара с 6 г/л до 8 г/л позволило резко снизить витрификацию до 10% у вертикальных эксплантов и до 25% у горизонтальных (2 ч и 4 ч).

Таким образом, в ходе дальнейших исследований для преодоления витрификации у исследуемых видов хвойных была использована среда $\frac{1}{2}$ MS-0 с добавлением 8 г/л агара. При этом зиготические зародыши помещались вертикально.

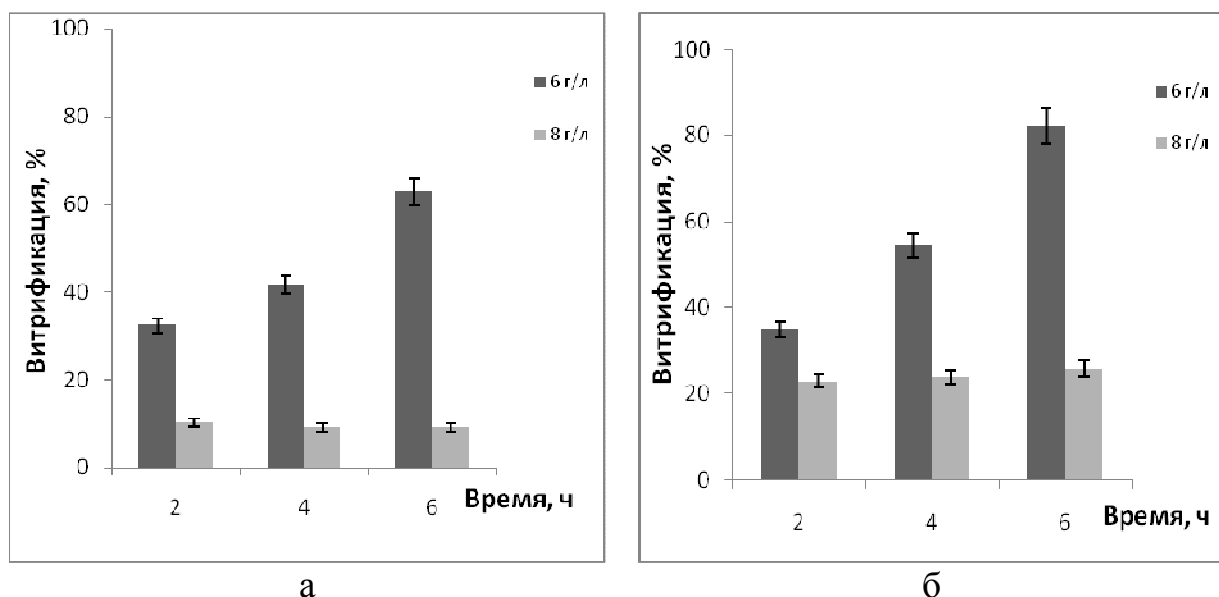


Рис. 5. Влияние длительности импульсной обработки в растворе 56 мг/л БАП, концентрации агара (6 г/л и 8 г/л) и ориентации эксплантов на интенсивность витрификации у эксплантов сосны обыкновенной на 21 сутки в культуре *in vitro*: а – вертикально ориентированные, б – горизонтально ориентированные экспланты.

Результаты опытов со зрелыми зиготическими зародышами сосны обыкновенной показали, что продолжительность ИО в растворе 56 мг/л 6-БАП влияла на реакцию эксплантов в ответ на органогенный стимул. Если

при 3 ч продолжительности ИО количество почек на эксплант в среднем составило 4,8 то при 4, 5 и 6 ч – 10,4, 17 и 20 соответственно (рис. 6 а).

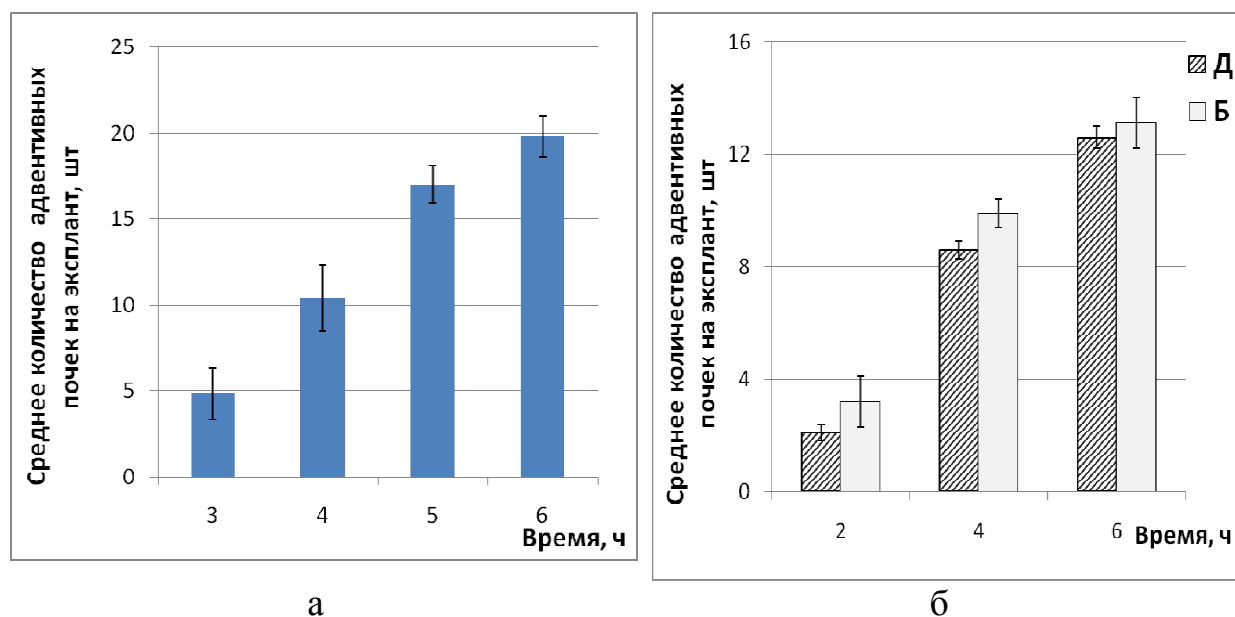


Рис. 6. Среднее количество адвентивных почек на эксплант (зиготические зародыши) у сосны обыкновенной (а) и лиственницы сибирской (б) в зависимости от продолжительности импульсной обработки в растворе 56 мг/л 6-БАП: Д – семена лиственницы собранные в Дендрарии Института леса, Б – семена из Богучанского лесхоза.

Закономерности образования и развития адвентивных почек на зародышах сосны обыкновенной были одинаковыми при ИО двумя разными концентрациями 6-БАП (28 и 56 мг/л). К 10 суткам после ИО на кончиках семядолей отмечено образование адвентивных структур – катафиллов (от двух до пяти). На 10 сутки между ними формировался апекс адвентивной почки. В дальнейшем катафиллы не увеличивались, а на апексах развивались хвоинки адвентивных почек. Развитие почек *de novo* в побеги получено в ходе последовательных пересадок на ту же среду ($\frac{1}{2}$ MS-0). При этом, в первую очередь происходило образование и рост хвоинок, при этом каждые последующие хвоинки были длиннее предыдущих. Таким образом, происходило развитие побегов-ауксибластов. На этот период (45 суток) зарегистрировано спонтанное укоренение у 10 % эксплантов.

Образовавшиеся адвентивные побеги регулярно пересаживали (через 28-30 суток) на свежую среду. Скорость роста отделенных адвентивных побегов зависела от количества образованных хвоинок. Наличие 10 хвоинок и более способствовало более интенсивному росту побегов. Возможно, что это связано не только с количеством производимых фотоассимилятов, но и с размерами апикальной меристемы побега. Так показано, что у проростков хвойных размер апикальной меристемы с возрастом увеличивался и достигал максимального размера на 140 день после прорастания (Gregory, Romberger, 1972).

В ходе проведенных экспериментов выяснено, что реакция зиготических зародышей лиственницы сибирской на воздействие ИО с 6-БАП отличалась от зародышей сосны. Зоны органогенеза у лиственницы были приурочены к базальным частям семядольных хвоинок зародышей. Уже на 14 сутки на них и между семядолями появились адвентивные хвоинки, а позднее между последними и апексы почек *de novo*. Максимальное количество адвентивных почек на эксплант получено при продолжительности ИО при 56 мг/л 6-БАП – 6 ч, и составило в среднем около 13 шт. (рис. 6 б).

Влияние продолжительности ИО в растворе 6-БАП на образование адвентивных почек на зародышах ели сибирской представлено на рисунке 7 а. Максимальное количество почек *de novo*, в отличие от эксплантов сосны и лиственницы, зарегистрировано при 4 ч периоде индукции (в среднем более 25 почек на эксплант). Адвентивные почки на эксплантах ели под действием раствора фитогормона образовывались по всей поверхности гипокотыля, приводя к его разрастанию (рис. 7 б). Однако, чаще всего, первыми появлялись адвентивные почки в верхней части гипокотыля, затем органогенез продолжался в базипетальном направлении. На 28 сутки, формирующиеся почки *de novo* находились на разных стадиях развития. У образовавшихся первыми адвентивных почек происходило распускание хвоинок и начиналось удлинение побега. В отличие от сосны обыкновенной и лиственницы сибирской для эксплантов ели сибирской не обнаружено формирование каких либо промежуточных структур (катафиллов или адвентивных хвоинок) предшествующих дифференцировке адвентивных почек.

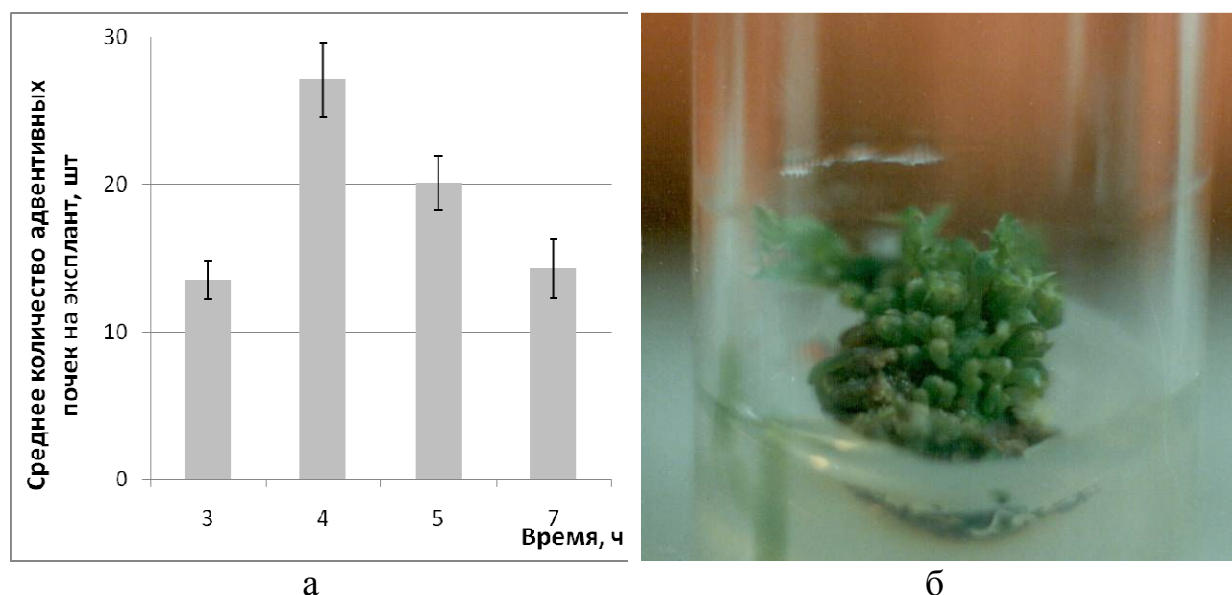


Рис. 7. Среднее количество адвентивных почек на эксплант, образовавшихся на зиготических зародышах ели сибирской на 28 сутки после импульсной обработки (56 мг/л 6-БАП), в зависимости от ее продолжительности (а); внешний вид экспланта с почками *de novo* на 28 сутки *in vitro* (б).

Экспланты - семядоли проростков семян хвойных. Семядоли, взятые от проростков ели сибирской, сосны обыкновенной и лиственницы сибирской, показали органогенную способность при воздействии ИО в растворе 6-БАП (56 мг/л). При этом семядольные экспланты ели сибирской значительно различались по их отклику на ИО цитокинином в зависимости от возраста проростков. В то время как, семядоли от полностью проросших семян (14 суток) не показали ни какого органогенного отклика, семядоли от частично проросших семян были отзывчивыми на органогенный стимул.

Результаты экспериментов показали, что образование адвентивных почек на семядольных хвоинках у трех исследуемых видов происходило более интенсивно в апикальной части семядолей, чем срединной части эксплантов. Базальная часть не обладала регенерационным потенциалом.

Максимальное число сформированных почек *de novo* на эксплант отмечено для ели сибирской при 3 ч ИО (рис. 8), как для апикальной части семядолей (для одной хвоинки - в среднем 8 адвентивных почки), так и для их срединной части (в среднем - 3). Наибольшее количество образовавшихся почек *de novo* из апикальной части семядолей сосны обыкновенной и лиственницы сибирской зарегистрировано при 5 ч ИО и составило в среднем 9,5 и 8,7 штук на эксплант соответственно (см. рис. 8). В ходе последующих пересадок продолжался рост адвентивных побегов.

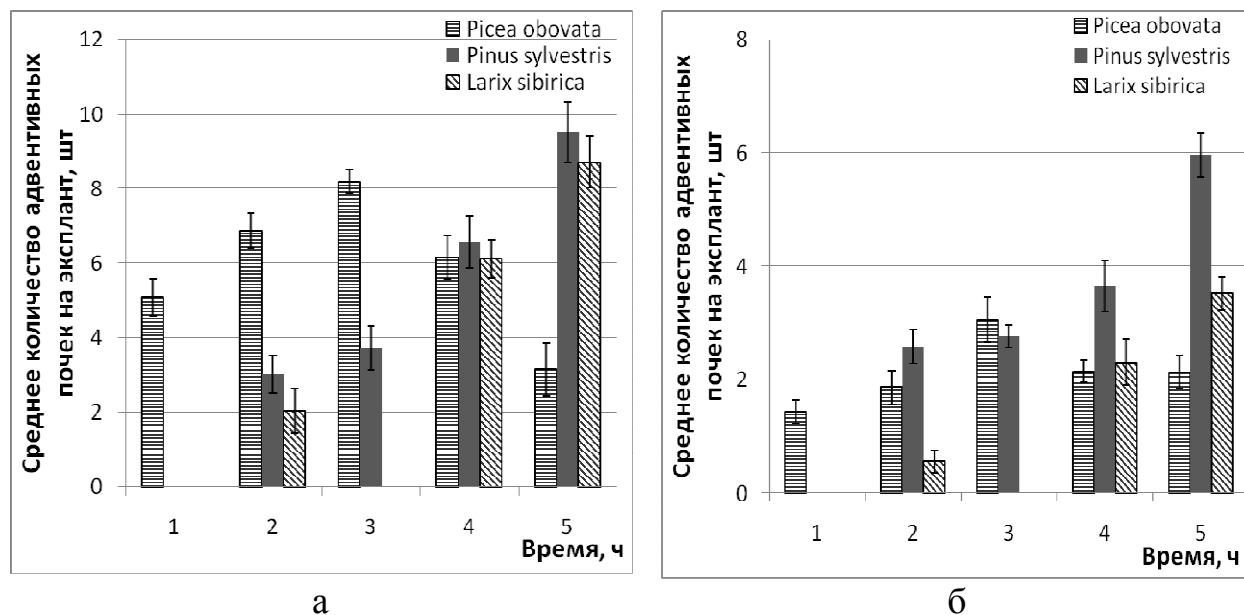


Рис. 8. Количество адвентивных почек на эксплант (семядольную хвоинку) у ели сибирской, сосны обыкновенной и лиственницы сибирской в зависимости от продолжительности импульсной обработки в растворе 56 мг/л 6-БАП: а - апикальная часть семядоли, б - срединная часть семядоли.

Таким образом, при использовании ИО 6-БАП у зрелых зиготических зародышей интенсивность органогенеза достигала у сосны – 20, ели – 27 и лиственницы – 13 адвентивных почек на эксплант. Для семядольных хвоинок

этот показатель составил соответственно - 15, 11 и 12 адвентивных почек на эксплант.

Выводы

1. Для каллусогенеза у ели сибирской, сосны обыкновенной и лиственницы сибирской можно рекомендовать в качестве эксплантов проростки и зрелые зиготические зародыши. Максимальный прирост биомассы каллусов отмечен на среде $\frac{1}{2}$ MS с добавлением 2,4-Д (2 мг/л) и 6-БАП (1 мг/л). Для получения долгоживущих каллусных линий необходимо совместное присутствие в среде ауксинов (2,4-Д и НУК) и цитокинина (6-БАП). В ходе длительного культивирования каллусных линий хвойных прирост биомассы уменьшался. Клетки каллусных культур имели агранальный тип организации хлоропластов, с низким уровнем развития ФС II.

2. Адвентивные почки получены у ели сибирской, сосны обыкновенной и лиственницы сибирской на среде $\frac{1}{2}$ MS с цитокининами. Почки взрослых деревьев имели слабый органогенный потенциал. Максимальное количество образовавшихся адвентивных почек зарегистрировано для почек, взятых с деревьев в мае, и составляет в среднем 2,4 для лиственницы и 2,7 для ели. Наибольшее число почек *de novo* образовалось на зрелых зиготических зародышах после индукции на среде с 6-БАП в течение четырех недель. У ели сибирской сформировалось в среднем 15 адвентивных почек на эксплант, у лиственницы сибирской и сосны обыкновенной – 4.

3. Локализация клеток, реагирующих на цитокинин, у зрелых зиготических зародышей хвойных является видоспецифичным. У ели сибирской органогенные клетки находились во внешнем слое первичной коры гипокотила, у сосны обыкновенной – в основной ткани кончика семядолей, у лиственницы сибирской – в основной ткани основания семядолей.

4. Применение импульсной обработки эксплантов раствором 6-БАП (56 мг/л) увеличило количество адвентивных почек *de novo*. При использовании в качестве эксплантов зрелых зиготических зародышей интенсивность органогенеза у зрелых зиготических зародышей достигала у сосны обыкновенной – в среднем 20, ели сибирской – 27 и лиственницы сибирской – 13 адвентивных почек на эксплант, у семядольных хвоинок этот показатель составил соответственно - 15, 11 и 12 адвентивных почки на эксплант.

5. Закономерности формирования и развития адвентивных почек в культуре *in vitro* на зиготических зародышах ели сибирской и сосны обыкновенной, укладываются в схему развития апикальных меристем.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. *Филиппова И.П. Витрификация у эксплантов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в культуре *in vitro* // Вестник КрасГАУ. 2009. № 8. С. 85-88.
2. *Филиппова И.П. Каллусные культуры сибирских видов хвойных // Вестник КрасГАУ. 2010. № 9. С. 54-59.
3. *Филиппова И.П. Адвентивное почкообразование у сибирских видов хвойных на средах с цитокининами // Вестник КрасГАУ. 2010. № 12. С. 69-74.
4. Филиппова И.П. Применение методов культуры тканей *in vitro* в размножении хвойных Сибири // Флора и растительность Сибири и Дальнего Востока. Тез. докл. II Российской конф. Красноярск, 1996. С. 359-360.
5. Филиппова И.П. Использование методов культуры ткани в размножении ели сибирской и лиственницы сибирской // Генетика и селекция - на службе лесу. Тез. докл. международной науч.-практ. конф. (28-29 июня 1996 г.). Воронеж, 1996. С. 24-25.
6. Philippova I.P. The employment of culture tissue methods *in vitro* reproduction of *Picea obovata* and *Larix sibirica* // Genetics and breeding in forest service. Abst. of Intern. Scient. Practic. Confer. Voronezh, 1996. P.114-115.
7. Филиппова И.П. Методы культуры тканей в размножении сосны обыкновенной // Генетика и селекция на службе лесу. Матер. международной. науч.-практ. конф. Воронеж, 1997. С. 76-77.
8. Филиппова И.П. Использование методов культуры тканей в размножении хвойных Сибири // Тез. докл. конфр. молодых ученых КНЦ СО РАН. Красноярск, 1997. С.108-109.
9. Tretyakova I.N., Philippova I.P. The peculiarity of morfogenesis of *Picea obovata* zygotic embryos in cultures *in vitro* // Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда. Тез. докл. VII международной конф. (25-28 ноября 1997 г.). Москва. 1997. С. 173-174.
10. Филиппова И.П., Третьякова И.Н. Гистологический анализ процессов раннего онтогенеза адвентивных почек в культуре *in vitro* у *Picea obovata* // Труды международной конф. по анатомии и морфологии растений (2-6 июня 1997 г.). С- Петербург, 1997. С 209-210.
11. Филиппова И.П. Роль цитокининов в морфогенезе зиготических зародышей у *Picea obovata* (*Pinaceae*) в культуру *in vitro* // Проблемы ботаники на рубеже XX-XXI веков. Тез. докл. II (X) съезда Русского ботанического общества (26-29 мая 1998 г.). С- Петербург, 1998. С. 85.
12. Philippova I.P., Tretyakova I.N. The peculiarity of conifer embryo roots in culture *in vitro* // The supporting roots structure and function 20-24 July 1998. France, Bordeaux, 1998. P 89.
13. Филиппова И.П., Третьякова И.Н. Цитологический контроль адвентивного почкообразования у зародышей семян ели сибирской в культуре *in vitro* // Реконструкция гомеостаза. Матер. IX международного симпозиума Красноярск, 16-20 марта 1998 г. Красноярск, 1998. С. 200-204.

14. Philippova I.P., Murzina A.N. Reproduction of *Larix sibirica in vitro* // Larix-98: World Resources for Breeding Resistance and Utilization. IUFRO Interdivisional Symposium. Красноярск, 1-5.09.1998. Красноярск, 1998. С.76-77.

15. Филиппова И.П., Мурзина А.Н., Третьякова И.Н. Особенности размножения хвойных в культуре *in vitro* // Леса и лесообразовательный процесс на Дальнем Востоке. Матер. международной конф. Владивосток, 23-25 августа 1999 г. Владивосток, 1999. С. 218-219.

16. Филиппова И.П. Особенности появления и развития проводящих тканей у эксплантов ели сибирской при адвентивном почкообразовании в культуре *in vitro* // Гомеостаз лесных экосистем. Матер. X международного симпозиума "Концепция гомеостаза: теоретические, экспериментальные и прикладные аспекты". Красноярск, 13-19 декабря 2001. Новосибирск: Наука. 2002. С.158-161.

17. Третьякова И.Н., Филиппова И.П., Новоселова Н.В. Особенности биотехнологии сибирских видов хвойных // Матер. международной науч. конф. "Биологические ресурсы и устойчивое развитие", Пушкино, 29 октября-2 ноября 2001 г. Москва: НИА-Природа. 2001. С.222-223.

18. Третьякова И.Н., Новоселова Н.В., Филиппова И.П., Мурзина А.Н. Биотехнология сибирских видов хвойных. // Матер. международного симпозиума «Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология». Москва 18-21 ноября 2001 г. Москва. 2001. С. 421-422.

19. Филиппова И.П., Гаевский Н.А. Влияние гормонов на фотосинтетический аппарат хвойных в культуре *in vitro* // VI международной конф. «Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях». Москва. 2001. С. 171.

20. Tretyakova I., Novoselova N., Philippova I., Murzina A. Biotechnology of Siberian Coniferous Species // International symposium «Molecular mechanisms of genetic processes and biotechnology». Moscow 18-21 november 2001. Moscow. 2001. P. 374-375.

21. Филиппова И.П. Образование вторичного камбия у *Picea obovata* в культуре *in vitro* / Труды II международной конф. по анатомии и морфологии растений. С-Петербург, 14-18 октября 2002 г. С-Петербург, 2002. С. 247.

* - Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Подписано в печать _____
Формат 60x84/16. Уч.-изд. л. 1,3
Тираж 100 экз. Заказ № 2524

Отпечатано полиграфическим центром БИК СФУ
660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 82а