

На правах рукописи



БАРСУКОВА
Алена Владимировна

**РЕГУЛЯЦИЯ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА У ВИДОВ
ЛИСТВЕННИЦЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, г. Красноярск

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Третьякова Ираида Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Гольд Виктор Моисеевич,

доктор биологических наук, профессор
Медведев Сергей Семенович

Ведущая организация: Институт биологии УНЦ РАН (г. Уфа)

Защита диссертации состоится «28» января 2011 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.099.15 при Сибирском федеральном университете по адресу: 660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79, ауд. Р8-06.

Тел./факс: 8(391)244-87-90, e-mail: nikgna@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Сибирского федерального университета

Автореферат разослан «____» декабря 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.б.н., доцент



Н. А. Гаевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Достижения в области культуры клеток и тканей растений привели к созданию принципиально нового метода – клонального микроразмножения в культуре *in vitro*, т.е. получения *in vitro* генетически идентичных исходному экземпляру растений (Носов, 1999). Наиболее перспективным направлением в данной области является соматический эмбриогенез. В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать при определенных условиях имеющуюся у нее генетическую информацию и давать начало целому организму (тотипотентность) (Бутенко, 1964).

Соматический эмбриогенез является модельной системой для исследования факторов, влияющих на морфогенез и развитие зародыша. С помощью соматического эмбриогенеза можно изучать морфогенетические программы (детерминация и дифференциация), а также проводить физиологические и молекулярные исследования (изучение функции генов). Кроме того, соматический эмбриогенез позволяет сохранять генетические ресурсы в течение длительного периода времени, благодаря высокой продуктивности эмбриональной массы и способности ее подвергаться длительной криоконсервации, а также проводить исследования, направленные на массовое тиражирование генетически улучшенных растений (Park, 2002; Klimaszewska et al., 2002; Lelu-Walter et al., 2009).

Исследования соматического эмбриогенеза у сибирских видов хвойных, в том числе лиственницы, начали проводить в первом десятилетии XXI века в лаборатории лесной генетики и селекции Учреждения Российской академии наук Института леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения РАН. Исследователями были получены эмбриогенные каллусы и соматические зародыши на ранних стадиях эмбрионального развития у лиственницы сибирской (Третьякова и др., 2007; Белоруссова и др., 2008). Однако зрелые соматические зародыши и массовая регенерация растений до сих пор не были получены.

Между тем, виды рода *Larix*, являющиеся основными лесообразователями сибирских лесов, характеризуются неравномерностью урожаев в многолетнем цикле и низким качеством семян (Дылис, 1947; Милютин, 1973; Ирошников, 2004; Коропачинский и др., 2006). Кроме того, деревья лиственницы сильно поражаются насекомыми, оказывающими негативное влияние на урожай семян лиственничных лесов, а также отмечается негативное влияние патогенной микрофлоры (наибольшую опасность представляют грибы род *Fusarium*) на развитие проростков и сеянцев, приводящее к инфекционной гибели практически половины всходов при выращивании лиственниц (Громовых и др., 2007). Поэтому проведение исследований, направленных на оптимизацию физико-химических условий культивирования изолированных клеток и тканей в культуре *in vitro* для получения соматического эмбриогенеза является необходимым у различных видов лиственницы.

Цели и задачи исследования. Цель работы - разработка и усовершенствование биотехнологии соматического эмбриогенеза у видов лиственницы: лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.), лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Dylis) и лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), в культуре *in vitro*.

Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи:

- оптимизировать условия для индукции эмбриогенного каллуса и пролиферации эмбриональной массы, а также созревания и прорастания соматических зародышей путем манипуляции с условиями культуры *in vitro* для лиственницы Сукачева и

лиственницы Гмелина, с использованием в качестве контроля лиственницы сибирской;

- индуцировать соматический эмбриогенез из гибридных семян лиственницы, полученных в результате контролируемого опыления;

- стимулировать рост зародышей и проростков лиственницы путем их обработки метаболитами биоконтрольных штаммов грибов рода *Trichoderma* и *Streptomyces*;

- провести цито-эмбриологический контроль соматического эмбриогенеза на всех стадиях биотехнологического процесса.

Научная новизна исследования заключается в том, что впервые для таких видов лиственницы, как лиственница Гмелина и лиственница Сукачева, были разработаны биотехнологические приемы клонального микроразмножения в культуре *in vitro*, в частности, соматический эмбриогенез. Подобраны условия образования эмбриогенного каллуса, индукции эмбриогенеза и развития соматических зародышей. Разработан новый состав питательной среды, позволяющий получать эмбриогенный каллус и соматические зародыши, а главное, проростки лиственницы Сукачева и ее гибридов. Для созревания соматических зародышей впервые для лиственницы Сукачева были подобраны оптимальные концентрации компонентов питательной среды (АБК, активированного угля, концентрации сахарозы и желирующего агента). Кроме того, в результате контролируемого опыления впервые получено пять высокопродуктивных клеточных линий, способных продуцировать соматические зародыши и растения-регенеранты. Выявлено стимулирующее действие метаболитов биоконтрольных штаммов грибов рода *Trichoderma* на развитие побега проростков лиственницы Сукачева в культуре *in vitro*.

Теоретическая и практическая ценность полученных результатов.

Разработанные биотехнологии соматического эмбриогенеза могут стать основой генетико-селекционных работ, направленных на плантационное выращивание лиственниц. В результате реализации работ по соматическому эмбриогенезу видов лиственницы возможно получение массового количества сеянцев лиственницы Сукачева и ее гибридов, устойчивых к поражению насекомыми.

Положения, выносимые на защиту:

1. Оптимизация биотехнологического процесса у видов лиственницы приводит к образованию соматических зародышей и растений - регенерантов.
2. Регенерационный потенциал лиственницы Сукачева в культуре *in vitro* связан с генотипом дерева.

Личный вклад соискателя. Представленные в диссертации экспериментальные данные получены непосредственно автором.

Апробация работы. Основные положения и результаты работы были представлены и обсуждены на конференциях **международного уровня**: X Международной научной школе-конференции студентов и молодых ученых «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий» (Абакан, 2006), II международной школе молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология» (Уфа, 2007), IX международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Звенигород, 2008), 12-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пущино, 2008), III международной школе молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология» (Саратов, 2009), международной научной конференции «Актуальные проблемы прикладной генетики, селекции и биотехнологии растений» (Ялта, Украина, 2009), 2-м международном совещании по сохранению лесных генетических ресурсов Сибири

(Новосибирск, 2009); Международной конференции «Advances in Somatic Embryogenesis of Trees And Its Application for the Future Forests and Plantations» (Сувон, Корея, 2010), XXIII IUFRO мировом конгрессе «Forests for the Future: Sustaining Society and the Environment» (Сеул, Корея, 2010), Международной конференции «Генетика, геномика и биотехнология растений» (Новосибирск, 2010); Всероссийской конференции с участием иностранных ученых «Эколого-географические аспекты лесообразовательного процесса» (Красноярск, 2009); **всероссийского масштаба:** III Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира» (Волгоград, 2010), и **регионального уровня:** I Региональной научной студенческой конференции по биологии (Красноярск, 2007), Конференции молодых ученых «Исследования компонентов лесных экосистем Сибири» (Красноярск, 2007, 2009), второй общегородской ассамблее «Красноярск - технологии будущего» (Красноярск, 2009).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 23 работы, в том числе 4 статьи в реферируемых журналах из перечня ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, списка литературы и трех приложений. Работа изложена на 136 страницах, содержит 14 таблиц и 40 рисунков. Библиографический список включает 201 наименование, 168 из которых - иностранные источники.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н., профессору Третьяковой Ираиде Николаевне, а также к.б.н. Иваницкой А.С., к.б.н. Носковой Н. Е. за всестороннюю помощь во время работы над диссертацией и ценные советы. Автор благодарит Dr. Marie-Anne Lelu-Walter (INRA) за ценные советы при проведении экспериментов по соматическому эмбриогенезу хвойных растений. Благодарю к.б.н. А.П. Барченкова за предоставление семенного материала лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина, а также к.б.н. Садыкову В.С. и асп. Бондарь П.Н. за предоставление метаболитов грибов рода *Trichoderma* и *Streptomyces*.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

В главе проводится обзор литературных данных по исследованию соматического эмбриогенеза у хвойных видов. Приводятся материалы о современном состоянии данного направления в мире, его преимуществах перед другими методами размножения растений и практической значимости соматического эмбриогенеза. Особенно детально рассматриваются методические вопросы получения эмбриогенного каллуса, его пролиферации и созревания соматических зародышей, наряду с морфологическими изменениями, происходящими во время всего процесса формирования соматических растений. Также обсуждается роль генетических маркеров в соматическом эмбриогенезе хвойных. Приводятся достижения в области соматического эмбриогенеза для видов лиственницы произрастающих в Европе.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в лаборатории лесной генетики и селекции Учреждения Российской академии наук Института леса им.В.Н. Сукачева Сибирского отделения РАН в 2007-2010 гг.

В качестве исходного материала использовали экспедиционные сборы семян с деревьев лиственницы сибирской, лиственницы Гмелина и лиственницы Сукачева, произрастающих в зеленых насаждениях г. Красноярска (р-он Академгородка) и Красноярского края (Ужурский лесхоз, Э/х «Погорельский бор»), а также из Каларского района Читинской области (лиственница Гмелина). Материалом исследования служили зиготические (половые) зародыши данных видов, находящиеся на разных этапах эмбрионального развития.

Контролируемые скрещивания исследуемых деревьев проводили в начале мая 2009 - 2010 гг. в следующих вариантах: *L. sukaczewii* X *L. sibirica*, *L. sibirica* X *L. Sukaczewii*, *L. sukaczewii* X *L. gmelinii*, *L. sukaczewii* X *L. sukaczewii*. Для оценки качества пыльцы определяли размеры пыльцевых зерен и проводили гистохимический анализ на содержание крахмала (раствор Люголя), а также проращивали в культуре *in vitro* на различных питательных средах.

Работы по получению соматического эмбриогенеза проводили в стерильных условиях ламинар-бокса. Все инструменты, питательные среды, посуду и чашки Петри стерилизовали в автоклаве под давлением 0,5-1 А° при температуре 120°С в течение 20-30 мин. Стерилизацию растительных эксплантов проводили 5% спиртовым раствором йода в течение трех минут. После трехкратной промывки в стерильной дистиллированной воде, мегагаметофиты обрабатывали перекисью водорода в течение 5-10 мин. Зародыши извлекали из мегагаметофитов в стерильных условиях, помещали на увлажненную фильтровальную бумагу в чашках Петри и затем переносили на питательную среду.

Для индукции формирования эмбрионного каллуса (ЭК) использовали базовые среды ½ MS (Murashige et al., 1962), MSG (Vecwar et al., 1987) и МА (собственная разработка авторов), с добавлением мезоинозита (0,1 - 1г/л), аскорбиновой кислоты (0,4 г/л), казеина (0,1 - 1 г/л), глутамина (0 - 0,5 г/л), сахарозы (30 г/л) и агара (7 г/л) или Gelrite (4 г/л). В качестве регуляторов роста использовали 2,4-Д (2 мг/л) и БАП (1 мг/л). рН среды был приведен к 5.8 до автоклавирования.

Для пролиферации применяли среды того же базового состава, но с пониженным в 1,5 и 2 раза содержанием сахарозы и БАП, соответственно. Также использовали метод суспензионных культур.

Для перехода к созреванию ЭК помещали в жидкую или твердую безгормональную питательную среду на 3-7 дней.

Созревание соматических зародышей проводили на твердых питательных средах MSG и МА, с добавлением мезоинозита (0,1-1г/л), L-глутамин (0,5 - 1,45 г/л), казеина (1 г/л), сахарозы (30 -60 г/л), АБК (5,3 -34 мг/л), ИМК (0 – 0,2 мг/л), 2,4-Д (0 – 0,2 мг/л) и ПЭГ (0 - 10%). В качестве желирующего агента использовали Gelrite (4-8 г/л). Культивирование осуществляли на свету при 16-ти часовом фотопериоде, при 25°С±1°С. Растительные регуляторы роста (АБК и ИМК) и глутамин стерилизовали фильтрованием и добавляли в охлажденную питательную среду после автоклавирования.

Прорастание соматических зародышей проводили на питательных средах с полным и редуцированным содержанием макро-, микроэлементов, железа и витаминов. В некоторых экспериментах проводили добавление активированного угля. Культивирование осуществляли на свету до появления эпикотилия.

Для стимуляции роста соматических проростков использовали метаболиты трех штаммов *Trichoderma* и одного штамма *Streptomyces* гербарной коллекции из музея культур Центра биотехнологии и микологии Сибирского государственного

технологического университета, выделенные из целинных и окультуренных почв лесных питомников Средней Сибири в период с 1997 по 2002 гг. Метаболиты добавляли в базовые среды $\frac{1}{2}$ MS и MA путем фильтр-стерилизации, в концентрации 1%. Культивирование эксплантов проводили на свету.

Для цитологических исследований использовали метод давленных препаратов (Паушева, 1987). Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам (Лакин, 1973; Рокицкий, 1973, Шмидт, 1984) при помощи программ Microsoft Excel и Statistica 6.0 (1999).

ГЛАВА 3. СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ ВИДОВ ЛИСТВЕННИЦ

Процесс соматического эмбриогенеза включает индукцию эмбрионного каллуса, пролиферацию эмбрионных культур, созревание соматических зародышей, их прорастание и регенерацию растений.

Индукция соматического эмбриогенеза

Как было отмечено многими исследователями (Lelu et al., 1994; Klimaszewska et al., 2002), на индукцию соматического эмбриогенеза и формирование эмбрионного каллуса особое влияние оказывает стадия развития экспланта. Большинство авторов отмечает наилучший отклик экспланта при инокуляции глобулярного зародыша (Lelu-Walter et al., 2008; Lelu et al., 1991; Klimaszewska et al., 1989). Однако для лиственницы сибирской наилучший отклик (98%) был показан для стадии позднего эмбриогенеза (Белоруссова, Третьякова, 2008). Введение в культуру лиственницы Гмелина и лиственницы Сукачева показало ту же тенденцию (рис.1). Практически все введенные в культуру экспланты на стадии развития семядолей (стадия III) индуцировались к формированию эмбрионного каллуса (96-98%).

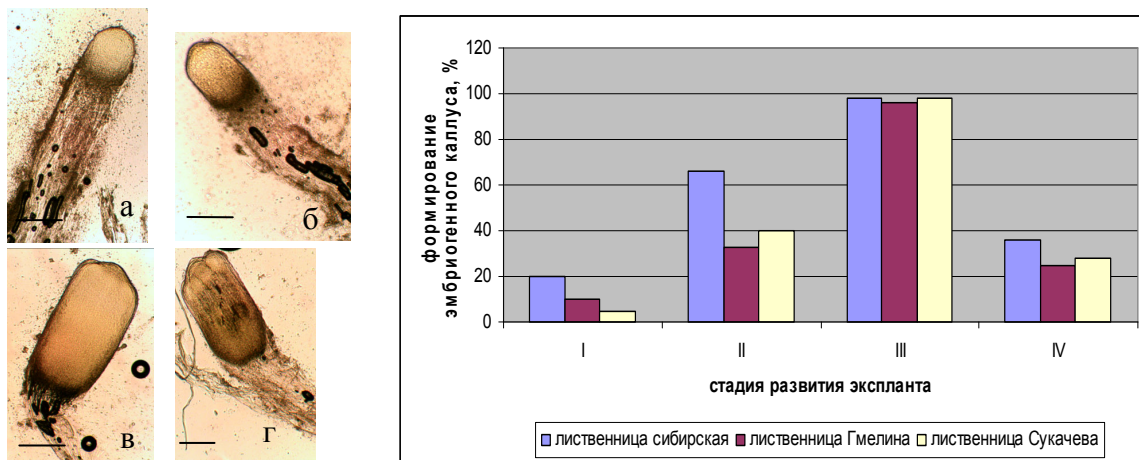


Рис. 1. Формирование ЭК из зиготических зародышей видов лиственницы на различных стадиях развития: стадия I - глобулярный зародыш (а), стадия II – поздний эмбриогенез, на стадии инициации семядолей (б); стадия III– поздний эмбриогенез, на стадии семядольного кольца (в); стадия IV– зрелый зародыш (г) (масштаб: 200 мкм)

Известно, что огромную роль на индукцию соматического эмбриогенеза оказывает состав питательной среды (Klimaszewska et al., 2002; Stasolla et al., 2003). Проведенные исследования показали, что уменьшение концентрации макро-солей ($\frac{1}{2}$ MS) или исключение некоторых элементов из питательной среды (MSG) значительно стимулировало образование ЭК и дальнейшую его пролиферацию у всех исследуемых видов лиственницы.

Так, частота формирования эмбрионного каллуса у лиственницы Гмелина на среде MSG была значительно выше – 73 (дерево Lg₂) - 93% (дерево Lg₅) (в зависимости от растения донора), тогда как на среде 1/2 MS частота формирования каллуса составила всего 50% (рис. 2Б). Аналогичные результаты были получены и для лиственницы сибирской – 70 – 98 % эксплантов индуцировали ЭК на среде MSG, тогда как на MS и 1/2 MS – 50 и 58%, соответственно. Формирование эмбрионного каллуса у лиственницы Сукачева происходило на всех используемых питательных средах с высоким процентом отклика эксплантов – 98%. Однако дальнейшее развитие ЭК и формирование эмбриональной массы происходило только у лиственницы Сукачева на среде MA в 18 % случаев (рис. 2А). На остальных питательных средах наблюдалось формирование эмбрионного каллуса, не способного к пролиферации эмбриональной массы (ЭМ).

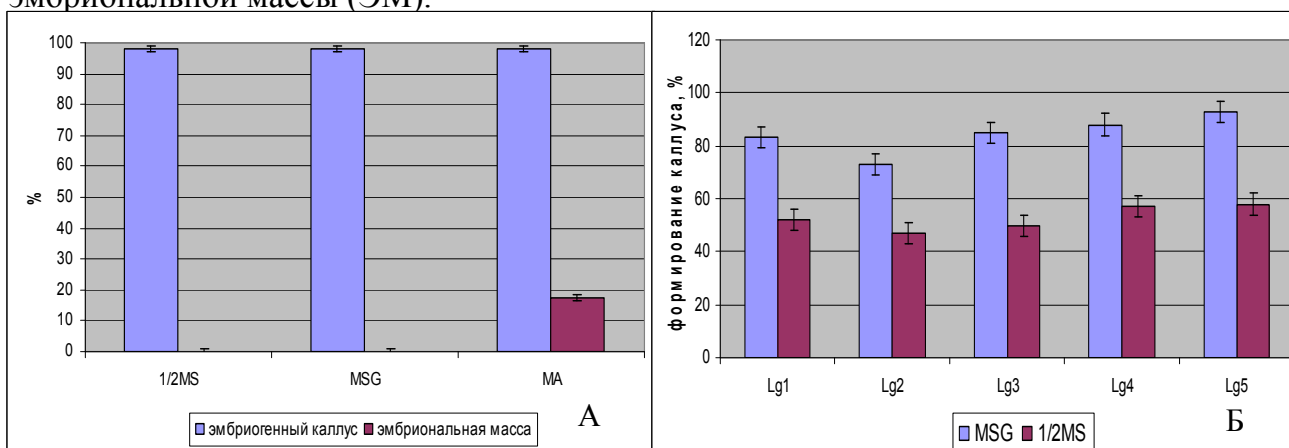


Рис. 2. Формирование эмбрионного каллуса у лиственницы Сукачева (А) и лиственницы Гмелина (Б) в зависимости от состава питательной среды

Интенсивность прироста ЭК также зависела от состава питательной среды. Достоверно больше прирост был на среде MSG в сравнении с другими питательными средами у всех исследуемых видов (рис. 3).

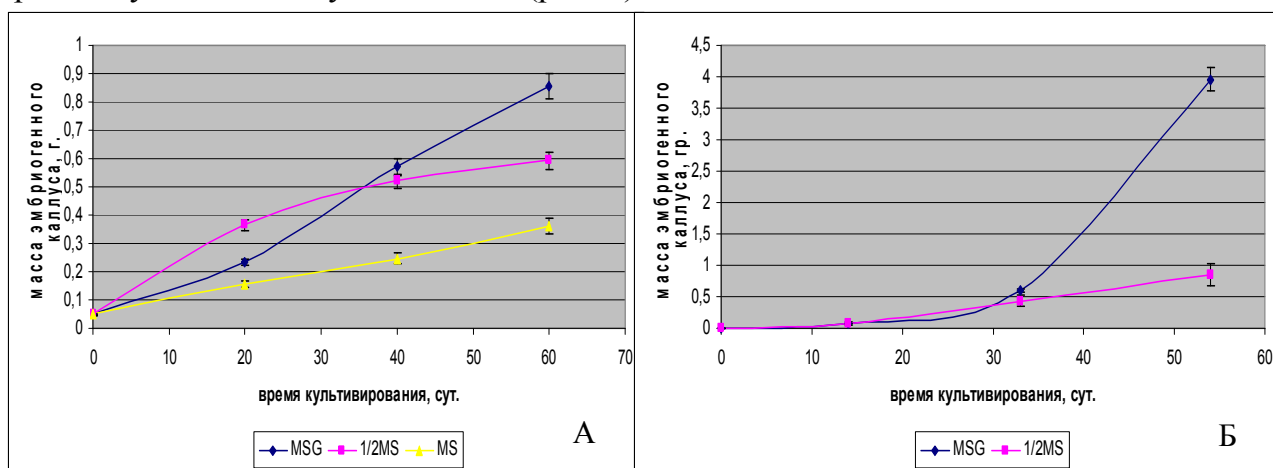


Рис. 3. Пролиферация эмбрионного каллуса лиственницы сибирской (А) и лиственницы Гмелина (Б) на различных питательных средах

Наиболее важной задачей исследователей соматического эмбриогенеза является поиск эмбрионных деревьев, то есть деревьев, способных продуцировать эмбрионный каллус, формировать далее эмбриональную массу и переходить к созреванию соматических зародышей. Исследования показали, что формирование

эмбрионного каллуса происходило у всех видов лиственницы, введенных в культуру *in vitro* - 3 вида, 39 деревьев. Из них 14 деревьев были не способны к формированию ЭК. У остальных введенных в культуру деревьев формирование ЭК происходило в широком диапазоне от 5 до 98 %. При этом пролиферации эмбриональной массы у лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина не происходило. Однако у лиственницы Сукачева было обнаружено дерево, экспланты которого не только обладали высоким уровнем индукции эмбрионного каллуса (98%), но и были способны в дальнейшем переходить к пролиферации эмбриональной массы – генотип С_{нп1}.

Морфологические наблюдения за формированием эмбрионного каллуса показали, что его индукция происходила на 8-14-е сутки культивирования на всех используемых в экспериментах питательных средах. Образование ЭК происходило равномерно по всей поверхности экспланта (у лиственницы Гмелина) или в области корешка и гипокотыля (у лиственницы Сукачева). Аналогично лиственнице сибирской, каллус, полученный из зиготических зародышей лиственницы Гмелина и лиственницы Сукачева, имел белый цвет, рыхлую либо твердую текстуру (рис. 4А).

Образование эмбриональной массы происходило значительно позднее – на 25-35 сутки культивирования. ЭМ появлялась «из под» или «на поверхности» ЭК. Хорошей пролиферационной активностью обладала только ЭМ, которая образовалась «из под» каллуса (рис.4Б). Во втором случае - ЭМ постепенно деградировала.

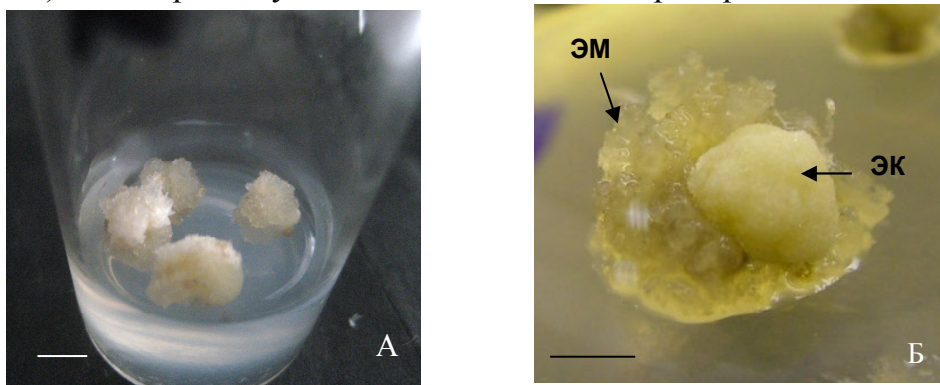


Рис. 4. Формирование эмбрионного каллуса (ЭК) и эмбриональной массы (ЭМ) у лиственницы Гмелина (А) и лиственницы Сукачева (Б) (масштаб: 5 мм).

Таким образом, в результате проведения работ по индукции формирования ЭК и пролиферации ЭМ у лиственницы Сукачева были получены четыре клеточные линии, способные к дальнейшему развитию:

- клеточная линия 1 (08-03-00-01) – получена в 2008 году на среде МА в результате свободного опыления лиственницы Сукачева (С_{нп1})
- клеточные линии 2 (09-03-00-02), 3 (09-03-00-03) и 4 (09-03-00-04) - получены в 2009 году на среде МА в результате свободного опыления лиственницы Сукачева (С_{нп1})

Пролиферация эмбрионного каллуса и эмбриональной массы

Полученные в результате индукции клеточные линии отличались по пролиферационной активности, а также по содержанию незрелых соматических зародышей внутри эмбриональной массы. Так, удвоение эмбриональной массы в зависимости от генотипа происходило на 11 – 14 сутки культивирования в цикле пролиферации (рис. 6А). Рост ЭМ шел по экспоненте и за четыре недели культивирования на среде для пролиферации суммарный вес ЭМ от одного экспланта

Кл1 достиг – 12,2 г, у Кл3 – 16,5 г. Интенсивность прироста эмбрионного каллуса у других видов лиственницы (лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина) была значительно ниже. Так, через шесть недель культивирования масса ЭК у эксплантов лиственницы Гмелина дерево Lg₅ составила $0,467 \pm 0,005$ г, в то время как у других деревьев Lg₄, Lg₃ и Lg₂ достоверно меньше (от $0,165 \pm 0,005$ до $0,256 \pm 0,005$ г). Таким образом, через шесть недель культивирования вес ЭМ лиственницы Сукачева превышал массу ЭК лиственницы Гмелина уже в 77 раз. Спада пролиферационной активности, характерного для ЭК лиственницы сибирской, у эмбриональной массы лиственницы Сукачева за 18 месяцев культивирования не наблюдалось.

Число соматических зародышей в пролиферирующей эмбриональной массе варьировало (рис. 6Б) от 210 шт в 100 мг ЭМ (Кл3) до 390 шт в 100 мг ЭМ (Кл1). Содержание соматических зародышей в эмбрионных каллусах у лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина было значительно ниже: в 5 ($75 \pm 5,6$ у лиственницы сибирской, что совпадает с предыдущими исследованиями данного вида (Белоруссова, Третьякова, 2008)) и 185 раз (всего $1 \pm 1,6$ на 100 мг ЭК у лиственницы Гмелина). Необходимо также отметить, что количество соматических зародышей у Кл1, индуцированной в 2008 году, через 14 месяцев культивирования снизилось более чем в 2 раза.

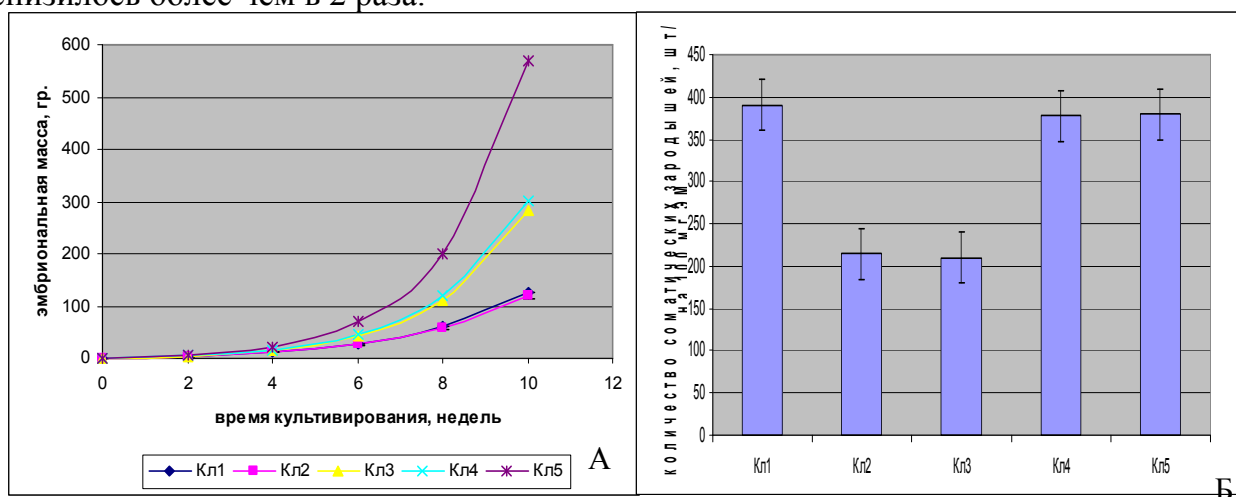


Рис. 6. Пролиферация эмбриональной массы клеточных линий лиственницы (А) и содержание соматических зародышей в пролиферирующей ЭМ (Б).

Цитоэмбриологический контроль соматического эмбриогенеза

Цитоэмбриологический контроль соматического эмбриогенеза показал, что формирование каллуса у всех исследуемых видов лиственницы идет одинаково и начинается с удлинения клеток экспланта и их неравного деления, аналогично описанному для лиственницы сибирской (Белоруссова, Третьякова, 2008; Третьякова и др., 2007). Именно неравное деление клеток является ключевым моментом, запускающим весь процесс соматического эмбриогенеза. В результате, происходит образование эмбриональных трубок с прилегающей на другом конце эмбриональной инициальной. Подобно зиготическому эмбриогенезу далее эти клетки претерпевают последовательные деления в обеих плоскостях, в результате чего происходит формирование 8 клеточной и затем 16 клеточной структуры зародыша. Такой зародыш состоит из эмбриональных (меристематических клеток округлой формы) и суспензорных (сильно вытянутых) клеток (рис. 5). Таким образом, через 30-40 дней в ЭК обнаруживались соматические зародыши на ранних стадиях эмбрионального развития (глобулярные зародыши).

В структуре ЭК некоторые ученые выделяют несколько этапов развития (РЕМІ, РЕМІІ и РЕМІІІ), от достижения, которых зависит важный этап соматического эмбриогенеза – созревание соматических зародышей (Filonova et al., 2000; Lelu-Walter et al., 2008). Применительно к сибирским видам лиственниц было отмечено, что эмбриогенный каллус лиственницы Гмелина и лиственницы сибирской соответствовал начальным стадиям развития - РЕМІ и РЕМІІ, перехода к стадии РЕМІІІ не происходило, в то время как для лиственницы Сукачева данный этап развития эмбриональной массы был успешно получен.

Созревание соматических зародышей

Введение ЭК лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина на питательные среды для созревания соматических зародышей не привело к формированию зрелых зародышей. Использование среды с небольшой концентрацией АБК (5,3 мг/л), приводило к потере эмбриогенной способности и переходу ЭК к автотрофному типу питания - культуры приобретали зеленую окраску. На питательных средах с более высокими концентрациями АБК (15 -24 мг/л), созревания соматических зародышей так же не происходило. Эмбриогенный каллус через две недели культивирования приобретал коричневую окраску, соматические зародыши внутри ЭК распались на отдельные клетки.

Таким образом, формирования зрелых соматических зародышей у лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина на используемых средах, рекомендуемых зарубежными авторами для созревания соматических зародышей лиственницы европейской и ее гибридов (Lelu-Walter et al., 2006, 2008), не происходило. Вероятно, это связано с неспособностью генотипа использованных деревьев к переходу РЕМІІ к стадии РЕМІІІ, что является ключевым моментом в развитии ЭК. Как отмечается канадскими учеными, РЕМІІ не восприимчив к действию АБК и обычно погибает в его присутствии (Filonova et al., 2000).

Созревания соматических зародышей лиственницы Сукачева проводили на среде МА с использованием различных концентраций АБК, ПЭГ, Gelrite и сахарозы. При этом на среде, содержащей АБК (40 μ М), повышенное содержание сахарозы (60 г/л) и желирующего агента (7 г/л Gelrite), развитие соматических зародышей не происходило (табл.1). Наблюдалось иссушение ЭМ, соматические зародыши не переходили к созреванию и погибали. Применение в качестве осмотического агента ПЭГ, оказалось более продуктивным. Однако низкие его концентрации (5-7,5%) все же были малопригодными для достижения созревания соматических зародышей, в этом случае наблюдались обводнение и деградация ЭМ, соматические зародыши распались на отдельные клетки.

Оптимальной для развития соматических зародышей оказалась среда, содержащая 60 μ М АБК, 10% ПЭГ, 40 г/л сахарозы и 4 г/л Gelrite (МА_{IV(9)}). На данной среде уже через три-четыре недели культивирования происходило формирование семядольных соматических зародышей. Эмбриональная масса к этому времени уже состояла из глобулярных зародышей, а также зародышей на стадии торпедо, длина которых достигала 400 мкм (рис.5Ж). Через две недели культивирования соматические зародыши увеличивались в размерах до 0,7/0,4 мм. Происходили закладка и формирование семядольного кольца. На 50 сутки культивирования на среде для созревания соматические зародыши достигали размера 1,1 – 1,5 мм, имели хорошо выраженную биполярную структуру тела зародыша и полностью сформированные семядоли (рис.5З).

Созревание соматических зародышей листовенницы Сукачева на различных вариантах состава питательной среды

<i>Среда</i>	<i>АБК,</i> <i>мг/л</i>	<i>ПЭГ,</i> <i>%</i>	<i>Сахароза,</i> <i>г/л</i>	<i>Gelrit,</i> <i>г/л</i>	<i>ИМК,</i> <i>мг/л</i>	<i>Соматические</i>
						<i>зародыши,</i> <i>шт/500мгЭМ</i>
МА _{IV(1)}	16	5	40	4	0,2	0
МА _{IV(2)}	16	7,5	40	4	0,2	0
МА _{IV(3)}	16	10	40	4	0,2	1
МА _{IV(4)}	24	5	40	4	0,2	0
МА _{IV(5)}	24	7,5	40	4	0,2	0
МА _{IV(6)}	24	10	40	4	0,2	2
МА _{IV(7)}	32	5	40	4	0,2	0
МА _{IV(8)}	32	7,5	40	4	0,2	4
МА_{IV(9)}	32	10	40	4	0,2	30
МА _{IV(10)}	32	0	60	8	0,2	0
МА _{IV(11)}	16	10	40	4	0	1
МА _{IV(12)}	16	0	60	7	0	0

Для перехода соматических зародышей клеточных линий листовенницы к созреванию использовали предобработку эмбриональной массы в жидкой питательной среде. После такой обработки даже спустя 14 месяцев активной пролиферации у Кл1 удалось снова получить зрелые соматические зародыши. При данной технике также происходило более массовое формирование зрелых соматических зародышей.

Сроки появления зрелых соматических зародышей сильно варьировали в зависимости от экспланта. Так, для созревания соматических зародышей у Кл1 требовалось 38-41 день, для Кл2 – 48-55 дней и для Кл3 – 60 и более дней. У Кл4 созревания соматических зародышей даже спустя три месяца культивирования на среде МА_{IV(9)} не происходило.

Проращение соматических зародышей

Соматические зародыши с хорошо развитыми семядолями переносили на среду для проращения (МА базового состава, без растительных регуляторов роста с добавлением активированного угля (10 мг/л)). Через 7-10 дней культивирования происходило удлинение гипокотилия и развитие семядолей. Еще через несколько дней наблюдалось развитие корешка (на свету гипокотиль и корешок приобретали красный оттенок) (рис.5И). Однако в 90 % случаев нормального развития растений не происходило – гипокотиль изгибался или утолщался, а вместо корня формировался каллус. Такие регенеранты были нежизнеспособными и погибали.

Снижение концентрации макро-, микроэлементов и железа (в два раза), а также исключение источников органического азота и витаминов (МА_{V(3)}) положительно сказывались на проращении соматических зародышей - в 70% происходило нормальное развитие соматических зародышей в проростки. На данной среде на пятые-седьмые сутки культивирования отмечены удлинение гипокотилия и появление корешка.

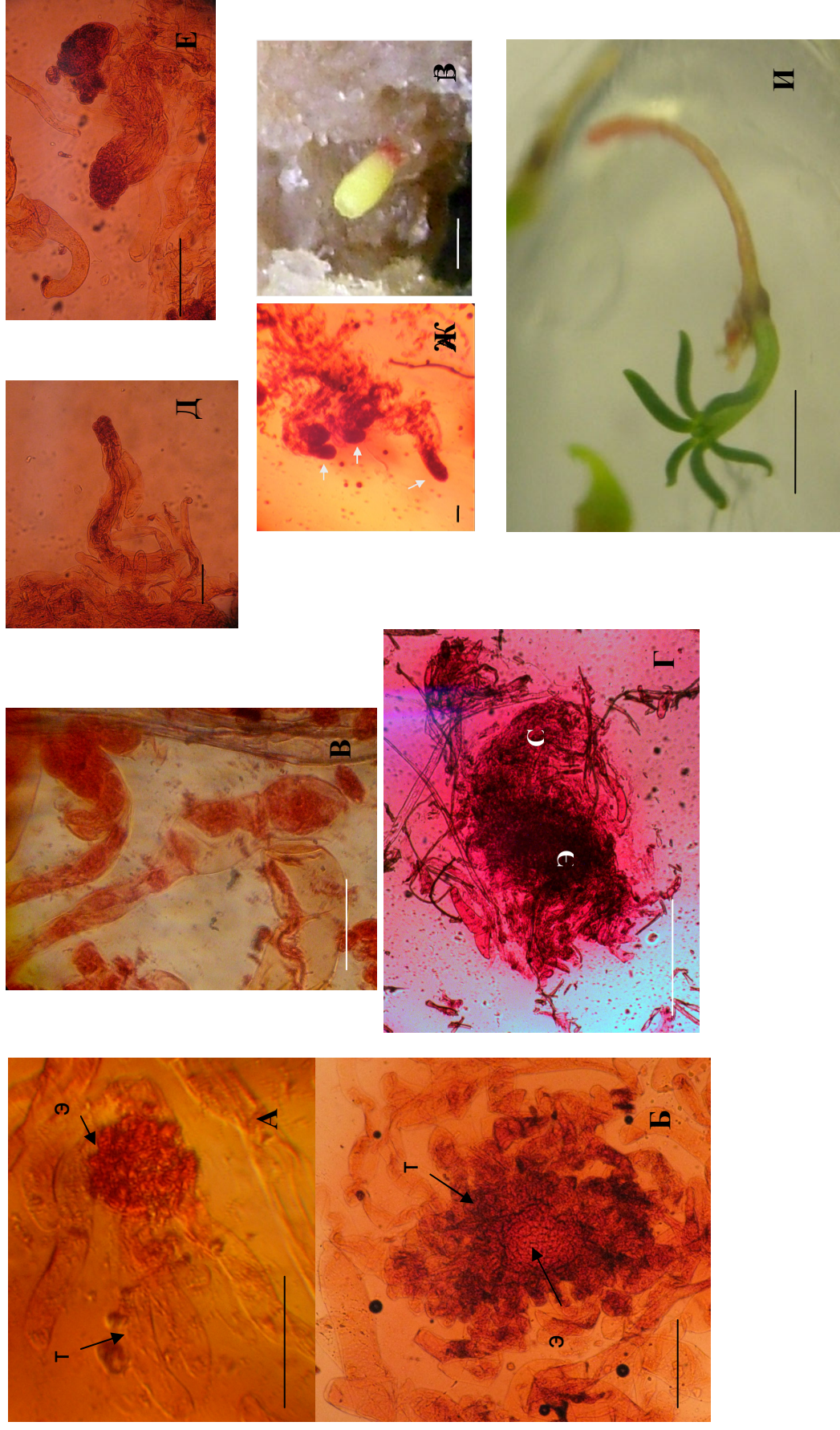


Рис. 5. Развитие эмбрионных структур в культуре *in vitro* у сибирских видов лиственницы: лиственницы сибирской - А,Б (формирование эмбриональных глобул и эмбриональных трубок); лиственницы Гмелина - В,Г (образование эмбриональных и клеток суспензорного типа); лиственницы Сукачева - Д,Е (формирование глобулярного зародыша), Ж (стадия торпедо), З (зрелый соматический зародыш), И (проросток)

Появление эпикотилия происходило через две-три недели культивирования на среде для прорастания. Соматические зародыши с хорошо развитым корешком и эпикотилем считали полноценными растениями и переносили в экопочву.

Таким образом, впервые были получены четыре клеточные эмбриогенные линии лиственницы Сукачева, способные продуцировать массовые соматические зародыши.

ГЛАВА 4. СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ ГИБРИДНЫХ СЕМЯН ЛИСТВЕННИЦЫ

Для проверки влияния материнского растения на получение соматического эмбриогенеза а также получения новых клеточных линий в 2009 - 2010 гг. проводили контролируемое опыление деревьев лиственницы Сукачева $C_{нп1}$ и $C_{нп4}$, способных и не способных продуцировать эмбриогенный каллус. В качестве опылителей использовали пыльцу тех же деревьев лиственницы Сукачева ($C_{нп1}$, $C_{нп4}$), а также пыльцу лиственницы сибирской, обладающей высоким эмбриогенным потенциалом (D_y), устойчивых к поражению лиственничной почковой галлицей, и пыльцу дерева лиственницы Гмелина произрастающей на территории Погорельского стационара (э/х «Погорельский бор»), выделяющегося в древостое по обильности формирования генеративных органов (Ld_2).

Введение в культуру *in vitro* гибридных зародышей, полученных в результате контролируемого опыления, проводили в III декаде июля в 2009 - 2010гг.

Индукция эмбриогенного каллуса при всех вариантах опыления происходила только у эксплантов материнским растением которого служило дерево лиственницы Сукачева, обладающего высоким эмбриогенным потенциалом, способного к формированию эмбриональной массы (см. главу 3) – дерево $C_{нп1}$. Индукции эмбриогенного каллуса у не способного к формированию ЭК дерева $C_{нп4}$ (см. главу 3) при опылении пыльцой эмбриогенных деревьев $C_{нп1}$ и D_y не произошло. Формирование эмбриональной массы, происходило у отдельных эксплантов только гибрида лиственницы Сукачева с лиственницей сибирской, в 3-4 % случаев (табл. 15). У других гибридов формирования эмбриональной массы не происходило.

В результате индукции эмбриогенного каллуса и его активной пролиферации была получена клеточная линия, способная формировать соматические зародыши и растения регенеранты: клеточная линия 5 (09-03-01-05) - получена в 2009 году на среде МА в результате перекрестного опыления лиственницы Сукачева ($C_{нп1}$) с лиственницей сибирской (D_y)

Полученная клеточная линия отличалась более высокой скоростью пролиферации в сравнении с другими клеточными линиями лиственницы Сукачева (Кл1, Кл2, Кл3, Кл4). Так, удвоение эмбриональной массы происходило уже на девятые сутки культивирования в цикле пролиферации (рис. 6А), и на четвертой неделе культивирования вес ЭМ достигал 22,7 г. Число соматических зародышей в пролиферирующей эмбриональной массе было аналогично Кл1 и Кл4 до 390 шт в 100 мг ЭМ (рис.6 Б).

Для перехода соматических зародышей к созреванию использовали предобработку эмбриональной массы в жидкой питательной среде. Для созревания использовали питательную среду $MA_{IV(9)}$. Появление зрелых соматических зародышей происходило аналогично Кл1 на 38-41 день культивирования.

Прорастание соматических зародышей Кл5 активно происходило на среде с уменьшенной концентрацией макро-, микроэлементов, железа и сахарозы ($MA_{V(3)}$).

Удлинение гипокотилия и развитие корешка наблюдались уже на седьмые сутки культивирования.

Клеточные линии заметно различались по морфометрическим показателям полученных растений. Так, у Кл5 отмечалось развитие длинных семядолей ($5,9 \pm 0,3$ мм), а у Кл2 – более короткого гипокотилия ($4,1 \pm 0,4$). Длина развивающегося корня, между линиями достоверных отличий не имела ($P < 0,05$).

Появление эпикотилия происходило через две-три недели культивирования на среде для прорастания (рис. 7). Соматические зародыши с хорошо развитым корешком и эпикотилем считали полноценными растениями и переносили в экочуву. Растения, помещенные в экочуву, активно развивались, и через два месяца культивирования наблюдалось развитие второго побега в условиях светокультуры.

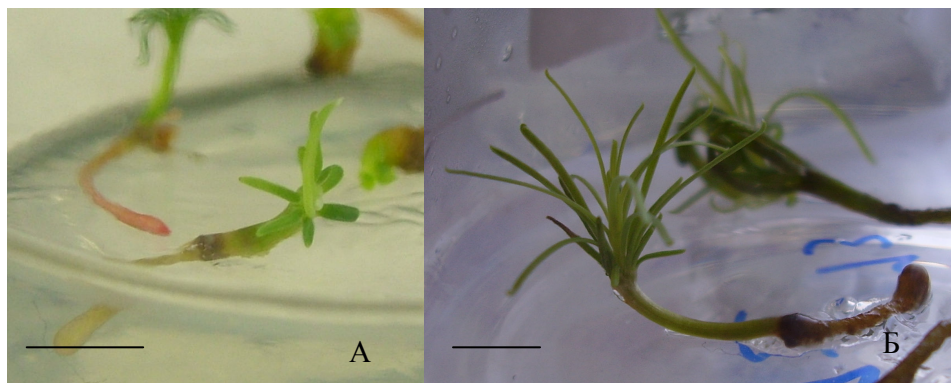


Рис. 7. Соматические проростки гибрида лиственницы: А – развитие эпикотилия через две недели на среде для прорастания, Б - проросток лиственницы через пять недель на среде для прорастания (масштаб: 5 мм)

Таким образом, были проведены работы по контролируемому опылению видов лиственницы и получены клонированные проростки. На основании данных исследований можно утверждать, что способность к соматическому эмбриогенезу, вероятно, заложена в материнском растении. Следовательно, для получения соматического эмбриогенеза у деревьев, не поддающихся к индукции данного процесса возможно использование контролируемого опыления эмбриогенных деревьев, однако необходимо провести цикл экспериментальных работ по адаптации клонированных растений к условиям почвенного грунта.

ГЛАВА 5. ОБРАБОТКА МЕТАБОЛИТАМИ РОДА *TRICHODERMA* И *STREPTOMICES* ПРОРОСТКОВ ЛИСТВЕННИЦЫ

При прорастании зародышей лиственницы в условиях культуры *in vitro* отмечается развитие аномальных проростков (с отсутствием корней, разрастанием гипокотилия, не развитием семядолей). Одним из возможных вариантов преодоления данных проблем может служить использование современных биопрепаратов на основе метаболитов жизнедеятельности микроорганизмов. О стимулирующем действии метаболитов штаммов рода *Trichoderma* и *Streptomyces* указывалось в многочисленных работах как отечественных, так и зарубежных исследователей, а также установлено, что они выделяют элиситоры, оказывающие ростостимулирующий эффект (Harman et al., 2004).

Исследования, проведенные на зиготических зародышах лиственницы сибирской показали, что использование метаболитов штамма 19/97М *Streptomyces lateritius* приводит к аномальному развитию проростков в 80% случаев. Поэтому для

выявления ростстимулирующего эффекта на клоновые проростки лиственницы Сукачева использовали далее только метаболиты различных штаммов грибов рода *Trichoderma*.

Обработку метаболитами клонированных зародышей лиственницы Сукачева проводили на твердой питательной среде МА без добавления растительных регуляторов роста. В качестве эксплантов использовали аномальные (без корешка) и нормальные (с корнем, гипокотилем и развитыми семядолями) соматические проростки лиственницы Сукачева в возрасте одного месяца.

Исследования показали, что метаболиты не оказали достоверного влияния на формирование корня у исследуемых соматических проростков лиственницы. Формирование корня происходило как в контрольном варианте (без использования метаболитов), так и в вариантах с добавлением метаболитов.

Влияние метаболитов штамма рода *Trichoderma* на развитие гипокотыля у соматических проростков лиственницы Сукачева также не прослеживалось. Удлинение гипокотыля происходило аналогично контрольным эксплантам, как у аномально развитых проростков, так и у проростков с нормальным строением. Однако, при культивировании наблюдались морфологические изменения в развитии гипокотыля – происходило его утолщение, и в редких случаях развитие каллуса, как в контрольном, так и в вариантах с использованием метаболитов.

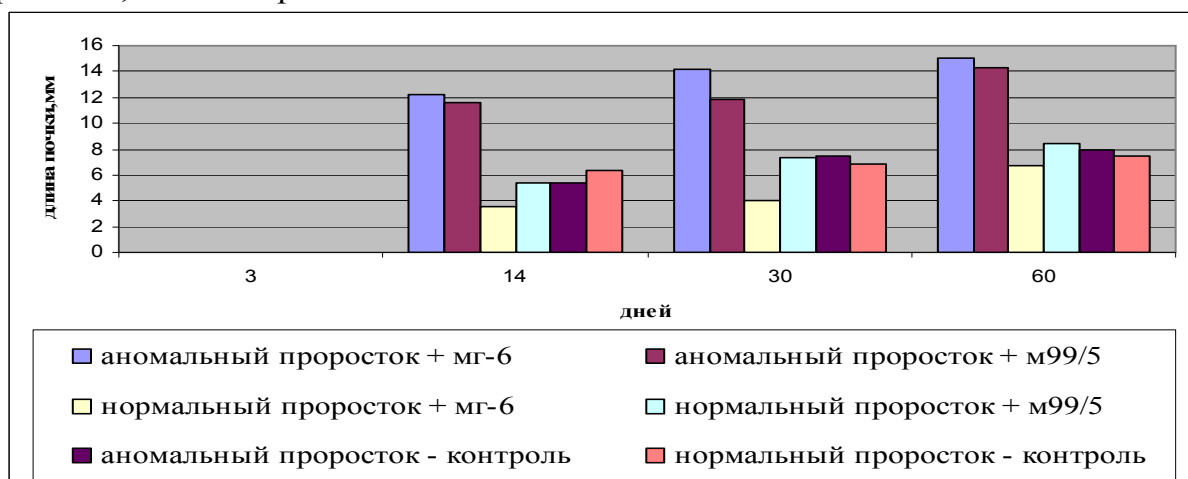


Рис. 9. Влияние метаболитов штамма рода *Trichoderma* на развитие побега у соматических проростков лиственницы Сукачева

Исследования действия метаболитов штамма рода *Trichoderma* на развитие побега соматических проростков лиственницы Сукачева показали достоверное влияние данного фактора на удлинение и формирования побега ($P < 0,05$). В варианте с нормально развитыми проростками наблюдались различия в длине побега при действии различных метаболитов (рис. 9, 10). Достоверно лучше развитие побегов происходило на среде с метаболитом *МГ-6* ($14,1 \pm 0,7$ мм), в сравнении с *контролем* ($7,4 \pm 0,5$ мм) и с метаболитом *М99/5* ($11,8 \pm 0,5$ мм). В варианте с аномально развитыми проростками лиственницы Сукачева тенденция наблюдалась в обратном направлении: наилучшее развитие происходило на среде с добавлением метаболита *М99/5* ($7,3 \pm 0,5$ мм), в *контроле* - $6,8 \pm 0,5$ мм и наименьший результат был получен с метаболитом *МГ-6* ($4 \pm 0,8$ мм).

Таким образом, в результате проведения ряда экспериментов была разработана методика для получения клоновых проростков видов лиственницы и их гибридов. Прослежены морфологические процессы, происходящие во время развития

соматических зародышей, а также установлено влияние метаболитов биоконтрольных агентов грибов рода *Trichoderma* (штаммы *MG-6* и *M99/5*) на развитие полученных проростков. Кроме того, в результате проведения контролируемого опыления были получены пять клеточных линий с высоким эмбриогенным потенциалом.

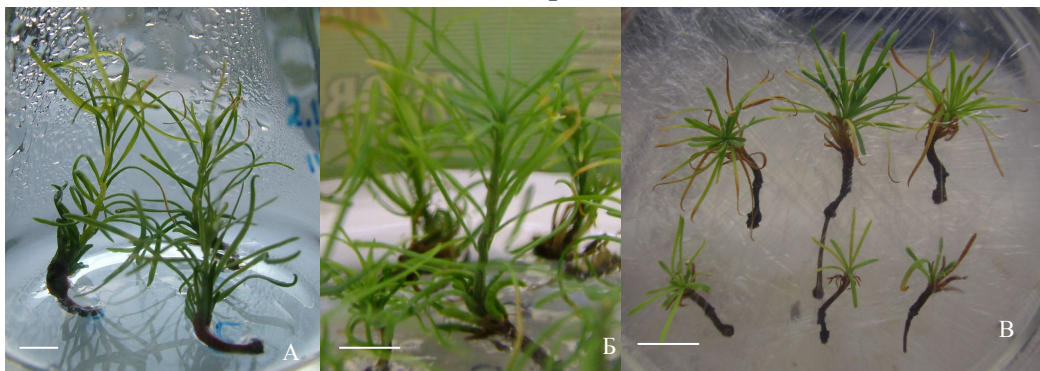


Рис. 10. Развитие соматических проростков на среде МА при обработке метаболитами *Trichoderma* *MG-6* (А) и *M99/5* (Б) и без обработки (В). (масштаб: 1 см)

ВЫВОДЫ

1. Оптимальной для индукции и развития соматических зародышей является разработанная нами питательная среда МА, с увеличенным содержанием мезоинозита, гидролизата казеина, тиамина, добавлением L-глутамина и аскорбиновой кислоты.

2. Формирование каллуса и эмбриональной массы у видов лиственницы (лиственницы Гмелина, лиственницы Сукачева и лиственницы сибирской) идет по одной схеме: под действием регуляторов роста (ауксины и цитокинины) происходит вытягивание клеток и их асинхронное деление, далее клетки претерпевают последовательные деления, в результате чего происходит формирование эмбриональных трубок и эмбриональных глобул, ведущих к формированию соматического зародыша.

3. Для остановки пролиферации и перехода соматических зародышей к созреванию наиболее продуктивным является культивирование эмбриональной массы в жидкой питательной среде без добавления растительных регуляторов роста и активированного угля в течении 3-5 дней.

4. Оптимальными условиями для созревания соматических зародышей является культивирование на питательной среде МА, дополненной АБК (60 μM), ИМК (1 μM), сахарозой (40 г/л), ПЭГ (10%) и Gelrite (4 г/л).

5. Для прорастания зрелых соматических зародышей необходимо исключение из питательной среды растительных регуляторов роста, источников органического азота, витаминов и снижение концентрации сахарозы.

6. Генотип растения донора оказывает доминирующее влияние на индукцию и пролиферацию, а также на способность к созреванию и прорастанию соматических зародышей;

7. Ростстимулирующая активность метаболитов биоконтрольных агентов грибов рода *Trichoderma* (штаммы *MG-6*, *M-99/5*) проявляется на росте побега развивающихся соматических проростков в культуре *in vitro*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Барсукова А.В.**, Белоруссова А.С. Закономерности микроспориального эмбриогенеза (андроклинии) у лиственницы сибирской в зависимости от состава питательных сред // Экология Южной Сибири и сопредельных территорий. Абакан. 2006. Вып.10, Т.1. С. 10.
2. Белоруссова А.С., **Барсукова А.В.** Влияние экзогенных факторов на микроспориальный эмбриогенез лиственницы сибирской // Материалы II международной школы молодых ученых «эмбриология, генетика и биотехнология». Уфа. 2007. С. 22-23.
3. **Барсукова А.В.**, Белоруссова А.С. Индукция андроклинии *in vitro* у лиственницы сибирской // Материалы конференции молодых ученых «Исследования компонентов лесных экосистем». Красноярск. - 2007. Вып. 8. С. 10- 12
4. Иваницкая А.С., **Барсукова А.В.**, Третьякова И.Н. Содержание эндогенных фитогормонов в микростробилах и андроклинном каллусе лиственницы сибирской // Тезисы IX международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». Москва. 2008. С.150-152.
5. Третьякова И.Н., Иваницкая А.С., **Барсукова А.В.**, Ижболдина М.В., Носкова Н.Е. Биотехнология хвойных *in vitro*: проблемы и перспективы // Материалы конференции «Факторы экспериментальной эволюции организмов». Киев. 2008. Т.5. С. 323-328.
6. Третьякова И.Н., Белоруссова А.С., Носкова Н.Е., Савельев С.С., Лукина Н.В., **Барсукова А.В.**, Ижболдина М.В., Череповский Ю.А. Перспективы применения методов биотехнологии для размножения генетически ценных форм лесных древесных видов хвойных // **Хвойные бореальные зоны**. 2007. Т. 2, № 23. С. 1-8.
7. Третьякова И.Н., Иваницкая А.С., Носкова Н.Е., Савельев С.С., **Барсукова А.В.**, Ижболдина М.В. Регуляция морфогенеза клеток при образовании соматических зародышей у сибирских видов хвойных в культуре *in vitro* // Матер. III международной научной конференции «Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений». Минск. 2008. С. 328-333.
8. **Барсукова А.В.**, Иваницкая А.С., Ижболдина М.В. Особенности размножения хвойных видов через соматический эмбриогенез // Материалы XII международной Пущинской школы конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино. 2008. С. 194.
9. Бондарь П.Н., Ижболдина М.В., **Барсукова А.В.** Оценка возможности использования сибирских штаммов *Trichoderma* для создания биопрепаратов защиты растений нового поколения // Материалы XII международной Пущинской школы конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино. 2008. С. 197-198.
10. Третьякова И.Н., Иваницкая А.С., Иванова А.Н., **Барсукова А.В.** Содержание фитогормонов в микростробиллах и андроклинном каллусе *in vitro* у лиственницы сибирской (*Larix sibirica* L.) // **Физиология растений**. 2009. №5. С.718-725.
11. Третьякова И.Н., Садыкова В.С., Носкова Н.Е., Бондарь П.Н., Гаидашева И.И., Громовых Т.И., Иваницкая А.С., Ижболдина М.В., **Барсукова А.В.** Ростстимулирующая активность штаммов рода *Streptomyces* и *Trichoderma* и перспективы их использования для микроклонального размножения хвойных // **Биотехнология**. 2009. №1. С. 39-44.
12. **Барсукова А.В.** Особенности соматического эмбриогенеза у лиственницы сибирской // Материалы III международной школы молодых ученых «эмбриология, генетика и биотехнология». Саратов. 2009. С. 155-158.
13. Третьякова И.Н., **Барсукова А.В.**, Ижболдина М.В. Проблемы и перспективы соматического эмбриогенеза: инициация, пролиферация вызревание // Материалы конференции «Факторы экспериментальной эволюции организмов». Киев. 2009. Т.7. С. 189-193.

14. Третьякова И.Н., Иваницкая А.С., **Барсукова А.В.**, Савельев С.С., Сиренко А.С. Перспективы плантационного лесовыращивания хвойных при помощи современных методов селекции и биотехнологии, такой как соматический эмбриогенез // Материалы Всероссийской конференции с участием иностранных ученых «Эколого-географические аспекты лесообразовательного процесса». Красноярск. 2009. С. 219-222.
15. Бажина Е.В., Третьякова И.Н., **Барсукова А.В.** Динамика состояния пихты сибирской в горах Южной Сибири и сохранение ее генофонда в культуре *in vitro* // Материалы Всероссийской конференции с участием иностранных ученых «Эколого-географические аспекты лесообразовательного процесса». Красноярск. 2009. С. 184-187.
16. Третьякова И.Н., **Барсукова А.В.** Сохранение генофонда хвойных видов Сибири при помощи соматического эмбриогенеза *in vitro* – современного метода биотехнологии // **Хвойные бореальной зоны**. 2010. Т.28, № 1. С.1-8.
17. **Барсукова А.В.** Размножение лиственницы сибирской (*Larix sibirica* LEDEB.) путем соматического эмбриогенеза // Материалы международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Современные проблемы и перспективы рационального лесопользования в условиях рынка». Санкт-Петербург. 2009. С.54-56.
18. Третьякова И.Н., **Барсукова А.В.** Соматический эмбриогенез хвойных в культуре *in vitro*: фундаментальные и прикладные аспекты // Материалы III Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира». Волгоград. - 2010. - С. 282-288.
19. **Барсукова А.В.** Размножение лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) путем соматического эмбриогенеза // Материалы конференции молодых ученых «Исследования компонентов лесных экосистем Сибири». Красноярск. 2009. Вып. 10. С. 10- 12.
20. Третьякова И.Н., **Барсукова А.В.**, Савельев С.С., Сиренко А.С. Сочетание классической селекции и применение современных методов биотехнологии для сохранения генофонда хвойных видов Сибири // Материалы международной научной конференции «Актуальные проблемы прикладной генетики, селекции и биотехнологии растений». Ялта, Украина. 2009. Т.131. С.5-9.
21. Третьякова И.Н., **Барсукова А.В.** Проблемы и перспективы биотехнологии хвойных в культуре *in vitro* в России // Лесохозяйственная информация. - 2009. - №1-2. - С.51-57.
22. Tretyakova I.N., **Barsukova A.V.** Somatic embryogenesis of coniferous species in Russia: theoretical and experimental data // Abstract of conference «Advances in somatic embryogenesis of trees and its application for future forests and plantations». Suwon, Korea. 2010. P.43-44.
23. **Barsukova A.V.**, Tretyakova I.N. Somatic embryogenesis of Siberian larch // Abstract of conference «Advances in somatic embryogenesis of trees and its application for future forests and plantations». Suwon, Korea. 2010. P.80.

Подписано в печать 22.12.10

Формат 60x84/16

Бумага офсетная 80 г/м² Отпечатано на ризографе.

Заказ № 333. Тираж 100 экз.

Отпечатано в типографии «ДарМа-печать»

660036 г. Красноярск, Академгородок, 50/28, оф. 156

Тел. 290-72-32