

УДК 581.143.6:582.475

Влияние аскорбиновой кислоты и глутатиона на индукцию соматического эмбриогенеза *Picea pungens* Engelmann

Т. В. Железниченко^{1,2}, Т. И. Новикова¹

¹Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, ул. Золотодолинская, 101, Новосибирск, 630090, Россия
E-mail: zhelez05@mail.ru

²Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России,
Красный пр-т, 52, Новосибирск, 630091, Россия

Ключевые слова: аскорбиновая кислота, глутатион, культура *in vitro*, соматический эмбриогенез, эмбрионально-суспензорная масса, *Picea pungens*.

Аннотация. Показано влияние экзогенных антиоксидантов – аскорбиновой кислоты (АК) и восстановленного глутатиона (ВГ) – на процесс инициации и пролиферации соматических зародышей ели голубой (*Picea pungens*) в культуре изолированных зародышей в зависимости от стадии развития эксплантов, генотипов деревьев-доноров, состава питательной среды с использованием цитологического анализа. Инициацию соматического эмбриогенеза проводили на базовых средах ½ DCR и ½ LV с добавлением АК (0 и 300 мг/л) и/или ВГ (0 и 300 мг/л). Наибольшую частоту каллусообразования (от 60 до 100 %) получили при введении в культуру зиготических зародышей на стадии сформировавшихся семядолей. Используя цитологический анализ, отмечено образование эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) на этапе инициации. Максимальная частота формирования ЭСМ достигала 8,4 % на среде ½ DCR и 28 % на среде ½ LV, дополненных 300 мг/л АК. Активная пролиферация отмечена только у одного из трех исследуемых генотипов. Применение антиоксидантов АК и ВГ стимулировало как частоту формирования каллуса, так и ЭСМ, но на развитие соматических зародышей влияло дифференцированно. Использование АК на стадиях инициации и пролиферации способствовало формированию соматических зародышей, а ВГ, напротив, замедлял их развитие. Формирование большого количества соматических зародышей достигнуто при оптимальном сочетании использования антиоксидантов: инкубации культур на этапе инициации с АК и внесении в среду ВГ на этапе пролиферации.

Effect of ascorbic acid and glutathione on somatic embryogenesis induction in *Picea pungens* Engelmann

T. V. Zheleznichenko^{1,2}, T. I. Novikova¹

¹Central Siberian botanical garden of SB RAS, Zolotodolinskaya st., 101, Novosibirsk, 630090, Russia

²Novosibirsk State Medical University, Krasny Prospekt, 52, Novosibirsk, 630091, Russia

Key words: ascorbic acid, embryonal-suspensor mass, glutathione, *in vitro* culture, *Picea pungens*, somatic embryogenesis.

Summary. Effect of exogenic antioxidants – ascorbic acid (AA) and reduced glutathione (GSH) – on initiation and proliferation processes of somatic embryos of blue spruce (*Picea pungens*) *in vitro* embryos culture in dependence of stage development, genotype of donor trees, medium composition was shown using a cytological analysis. Initiation of somatic embryogenesis was carried out on basic media ½ DSR and ½ LV supplemented with AA (0 and 300 mg/l) and/or GSH (0 and 300 mg/l). The highest frequency of callus formation (from 60 up to 100 %) was obtained when

establishing in zygotic embryo culture at the cotyledon stage. Formation of embryonal-suspensor masses (ESM) was detected at the initiation stage with the help of cytological analysis. The highest frequency of ESM formation achieved 8,4 % on ½ DSR medium and 28 % on ½ LV medium. Active proliferation was observed in only one of the genotypes studied. Application of antioxidants stimulated the frequency both of callus formation and ESM, however, AA and GSH affected on development of somatic embryos in different ways. Application of AA at the initiation and proliferation stages promoted formation of somatic embryos; GSH, on the contrary, reduced their development. Formation of the great number of somatic embryos was achieved with optimal combination of antioxidants: culture incubation at the initiation stage with AA and addition of GSH in culture medium at proliferation stage.

Введение

Ель голубая, или колючая (*Picea pungens* Engelmann), – вид хвойных, отличающийся высокой декоративностью благодаря уникальной окраске, варьирующей от чисто-зеленого до синевато-стального цвета, симметричной пирамидальной форме кроны и высокой продолжительности жизни. Вид толерантен к солевому туману и загрязнению воздуха, холоду и засухе. В связи с этим ель голубая перспективна для использования в ландшафтных композициях и в городском озеленении.

Природный ареал ели голубой находится в центральной и южной части Скалистых гор США. *P. pungens* произрастает вдоль ручьев на высоте около 2000–3300 м (Afele et al., 1992; Afele, Saxena, 1995) вместе с родственными видами – елью Энгельмана (*P. engelmannii* Parry ex Engelm.) и дугласовой пихтой (*Pseudotsuga menziesii* Mirb.) (Daubenmire, 1972). Благодаря высокой экологической пластичности ель голубую успешно культивируют далеко за пределами естественного ареала.

Традиционные методы размножения *P. pungens* трудоемки и сопряжены с рядом проблем. Так, при семенном размножении ели голубой только 4–6 % сеянцев приобретают голубую окраску хвои. Проводимый при контролируемом опылении многолетний отбор родительских линий, способных передать характеристику голубого окраса хвои потомству, также мало результативен, так как лишь половина потомства от скрещиваемых генотипов проявляет родительскую окраску (Stam, 1984). Растениям, полученным вегетативным способом размножения, а также путем прививок желательных форм на ель обыкновенную (*P. abies* L.) или на ель канадскую (*P. glauca* Moench), нередко передаются болезни от взрослых особей (Savella, 1965). Следовательно, традиционные методы не решают задач размножения элитных форм, к тому же стоимость посадочного материала при их применении высока.

Одним из альтернативных и перспективных направлений в лесной биотехнологии является размножение с помощью соматического эмбриогенеза (Tret'yakova, Barsukova, 2010). Данная технология позволяет не только массово тиражировать элитные генотипы хвойных, но и служит моделью для исследования структурных, физиологических и молекулярных механизмов зиготического эмбриогенеза (Stasolla, 2010).

К настоящему времени успешная регенерация сеянцев через соматический эмбриогенез показана для разных видов елей: черной (*P. mariana* Mill.) (Hakman et al., 1987), белой (*P. glauca*) (Dunstan et al., 1988), обыкновенной (*P. abies*) (Gupta, Durzan, 1986), гибридной (*P. glauca* × *P. engelmannii*) (Roberts et al., 1990), аянской (*Picea ajanensis* Fisch. ex Carr.) (Shalaev, Tret'yakova, 2011). Однако регенерации *P. pungens* в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез посвящены единичные работы (Afele et al., 1992; Afele, Saxena, 1995).

Критическим моментом в развитии соматического эмбриогенеза хвойных является низкий эмбриогенный потенциал тканей на стадии индукции (Stasolla, Yeung, 2003; Pullman et al., 2015). Для стимуляции процесса инициации и пролиферации эмбриогенных структур помимо регуляторов роста в состав питательных сред вводят антиоксиданты – аскорбиновую кислоту (АК) и восстановленный глутатион (ВГ) (Stasolla, Yeung, 1999; Stasolla, 2010). Известно, что АК и ВГ регулируют процессы органогенеза, регенерации и дифференциации в культуре ткани растений (Trigiano, Gray, 2000). Эти соединения, являясь важными компонентами окислительно-восстановительных реакций, управляют экспрессией генов, контролирующих процесс развития эмбриоидов у хвойных (Belmonte, Stasolla, 2009). Установлено, что АК играет ключевую роль на постэмбриональной стадии соматического эмбриогенеза через реактивацию апикальных меристем прорастающих соматических зародышей ели белой (Stasolla, Yeung, 1999), а ВГ оказывает воздействие на все стадии процесса,

способствуя пролиферации клеток, увеличивая количество глобулярных зародышей, стимулируя их созревание и прорастание (Stasolla, 2010).

В настоящей работе мы оценивали влияние антиоксидантов (АК, ВГ) на процессы инициации и пролиферации соматического эмбриогенеза у *P. pungens* в зависимости от стадии развития экспланта, генотипа деревьев-доноров и состава минеральной основы питательной среды с использованием гистологического анализа.

Материалы и методы

Растительный материал

Шишки собирали с трех свободноопыленных деревьев-доноров (G_1, G_2, G_3) ели голубой (*P. pungens* Engelmann), произрастающих в парковой зоне Академгородка г. Новосибирска. Деревья имели красивую пирамидальную форму кроны и выраженную голубую окраску хвои, возраст составлял 20–40 лет. Отбор образцов проводили с начала июля до середины августа в 2013–2015 гг.

Стерилизация

Шишки промывали с мылом, обрабатывали раствором 25%-го бытового отбеливателя «Domestos» («Юнилевер Русь», Россия), извлекали семена. Поверхностную стерилизацию семян проводили 10%-м раствором H_2O_2 (ЗАО «База № 1 Химреактивов», Россия) в течение 10 мин., затем однократно промывали стерильной дистиллированной водой в течение 10 мин. Семена очищали от покровных чешуй в асептических условиях. Зиготические зародыши на стадии глобулярного зародыша либо извлекали из мегагаметофитов, либо вводили в культуру вместе с гаметофитами. Зародыши, находившиеся на стадии инициации семядолей и стадии сформированных семядолей, извлекали из мегагаметофитов и инокулировали на питательные среды. Периодизацию зиготического эмбриогенеза хвойных определяли согласно работам E. M. Gifford, A. S. Foster (1989), а также S. Misra (1994).

Инициация соматического эмбриогенеза и пролиферация ЭСМ

Для инициации соматического эмбриогенеза из незрелых зиготических зародышей использовали базовые среды Дурзана (DCR) (Gupta, Durzan, 1985) и Литвая (LV) (Litvay et al., 1985) с уменьшенным вдвое содержанием макроэлементов. Все среды дополняли мезоинозитом – 100 мг/л (Sigma-Aldrich, США), гидролизатом

казеина – 500 мг/л (Fluca Analytical, США), глутаминовой кислотой – 500 мг/л (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) и агаром – 0,7 % (PanReac®, Испания).

Гормональный баланс в питательной среде и уровень сахарозы регулировали так же, как в экспериментах И. Н. Третьяковой и А. В. Барсуковой для видов лиственницы (Tret'yakova, Barsukova, 2012). При инициации соматического эмбриогенеза уровень регуляторов роста составлял: 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) – 2 мг/л (Sigma-Aldrich, США) и 6-бензоаминопурина (6-БАП) – 1 мг/л (Sigma-Aldrich, США). Переход к пролиферации регулировали снижением 6-БАП до 0,5 мг/л. На стадии инициации содержание сахарозы равнялось 30 г/л (ПАО «Шосткинский завод хим. реактивов», Украина), на этапе пролиферации – 20 г/л.

В качестве антиоксидантов применяли АК (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 300 мг/л ($\frac{1}{2} DCR_2$ и $\frac{1}{2} LV_2$ – инициация и $\frac{1}{2} DCR_5$ и $\frac{1}{2} LV_5$ – пролиферация) и ВГ (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 300 мг/л ($\frac{1}{2} DCR_3$ и $\frac{1}{2} LV_3$ – инициация и $\frac{1}{2} DCR_6$ и $\frac{1}{2} LV_6$ – пролиферация). Контролем служили питательные базовые среды, не содержащие антиоксидантов ($\frac{1}{2} DCR_1$ и $\frac{1}{2} LV_1$ – инициация и $\frac{1}{2} DCR_4$ и $\frac{1}{2} LV_4$ – пролиферация) (табл. 1).

Питательные среды доводили до pH = 5,8, затем автоклавировали (121 °C, 110 кПа, 20 мин.) Культивирование проводили в чашках Петри, помещая по 10–12 эксплантов, и инкубировали в темноте при 24 ± 2 °C. Длительность пассажа на этапе инициации составляла 4 недели, на этапе пролиферации – 2 недели. Наличие ЭСМ оценивали, используя временные давленные препараты. Препараты окрашивали водным раствором сафранина (Cypress Diagnostics, Бельгия), добавляли каплю глицерина (ЗАО «Союзхимпром», Россия) и накрывали покровным стеклом. Цитологический анализ препаратов проводили с помощью световых микроскопов Carl Zeiss Axiolab A. и Axioskop-40 с цветными цифровыми камерами высокого разрешения AxioCam MRC-5 и программой AxioVision 4.8 для получения, обработки и анализа изображений (Carl Zeiss, Германия) в ЦКП ЦСБС СО РАН. Число эмбриоподобных структур подсчитывали в 1 г сырой ЭСМ в трехкратной повторности для каждой клеточной линии.

Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам, используя Microsoft Excel 2003 и Statistica 10.0. На рисунках пред-

Таблица 1

Состав питательных сред, используемых для инициации соматического эмбриогенеза и пролиферации ЭСМ

стадия соматич. эмбриогенеза	питательная среда	антиоксиданты		сахароза (г/л)	БАП (мг/л)	2,4-Д (мг/л)
		АК (мг/л)	ВГ (мг/л)			
инициация	½ LV ₁	–	–	30	1	2
	½ LV ₂	300	–	30	1	2
	½ LV ₃	–	300	30	1	2
	½ DCR ₁	–	–	30	1	2
	½ DCR ₂	300	–	30	1	2
	½ DCR ₃	–	300	30	1	2
пролиферация	½ LV ₄	–	–	20	0,5	2
	½ LV ₅	300	–	20	0,5	2
	½ LV ₆	–	300	20	0,5	2
	½ DCR ₄	–	–	20	0,5	2
	½ DCR ₅	300	–	20	0,5	2
	½ DCR ₆	–	300	20	0,5	2

ставлены средние арифметические величины и их стандартные отклонения. Достоверность различий между средними оценена с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (критерий Дункана) $P \leq 0,05$.

Результаты

Индукция соматического эмбриогенеза из незрелых зиготических зародышей на разных этапах онтогенеза

При введении в культуру *in vitro* зиготических зародышей, находящихся на стадии раннего эм-

бриогенеза (сбор материала с 12 по 16 июля), как извлеченных из мегагаметофитов, так и вместе с ними, у всех исследуемых генотипов ели не отмечали никаких морфогенетических реакций на протяжении двух месяцев культивирования.

При инокуляции на питательные среды зиготических зародышей на стадии инициации семядолей (сбор материала с 20 по 24 июля) формировался плотный белый каллус, состоящий из округлых клеток только на среде ½ LV у Г₂ и Г₃ (рис. 1). Частота каллусообразования различалась в зависимости от генотипа дерева-донора и присутствия антиоксидантов в составе питательной среды. На среде без антиоксидантов (½ LV₁) у Г₂ всего у 40 % эксплантов формировался каллус, а у Г₃ каллусообразование отмечали у 31 % эксплантов ($P \leq 0,05$). Введение АК в состав питательной среды стимулировало частоту каллусообразования у Г₂ на 10 %, тогда как у Г₃ она осталась практически без изменения. При внесении в среду ВГ частота образования каллуса у Г₂ снизилась в 2,6 раз, а у Г₃ – в 6,2 раза по сравнению с контролем. Поскольку в образовавшихся каллусах эмбриоподобных структур не обнаружили, их в дальнейшем не переносили на среды для пролиферации.

При введении в культуру *in vitro* незрелых зиготических зародышей на стадии сформированных семядолей (сбор шишек с 8 по 15 августа) (рис. 2) у эксплантов со всех трех исследуемых деревьев-доноров наблюдали интенсивное каллусообразование. При этом отмечали формиро-

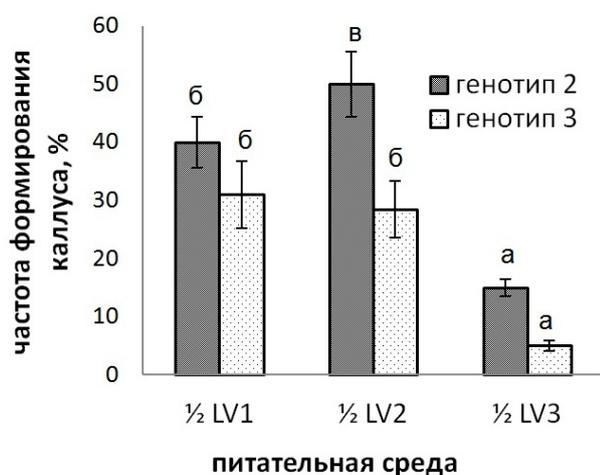


Рис. 1. Индукция каллуса из зародышей Г₂ и Г₃, инокулированных на питательные среды на стадии инициации семядолей. Разными буквами отмечены значения, различия между которыми достоверны при $P \leq 0,05$ (ANOVA, тест Дункана).

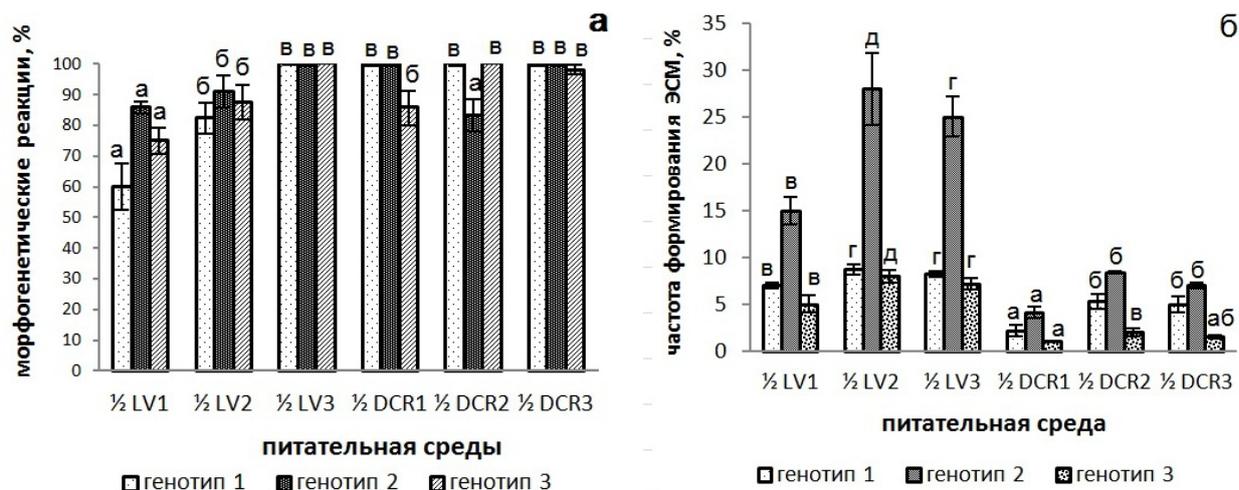


Рис. 2. Индукция культур из незрелых зиготических зародышей на стадии сформированных семядолей: а – частота каллусообразования, %; б – частота формирования ЭСМ, %. Разными буквами отмечены значения, различия между которыми достоверны при $P \leq 0,05$ (ANOVA, тест Дункана).

вание как рыхлого, так и плотного каллусов. При культивировании зиготических зародышей на питательной среде $\frac{1}{2}$ LV₁, не содержащей антиоксидантов (контроль), каллусогенез проявляли 60–85 % ($P \leq 0,05$) эксплантов в зависимости от дерева-донора. Внесение АК в питательную среду стимулировало этот показатель по сравнению с контролем на 5–22 % ($P \leq 0,05$) в зависимости от генотипа. Добавление ВГ в среду $\frac{1}{2}$ LV₁ увеличивало частоту каллусообразования у эксплантов до 100 %. При культивировании зиготических зародышей на среде $\frac{1}{2}$ DCR каллусогенез у эксплантов проявлялся активнее, чем на среде $\frac{1}{2}$ LV и изменялся в пределах 83–100 %, при этом присутствие антиоксидантов в питательной среде не оказывало существенного влияния.

Используя цитологический анализ, определили долю первичных культур, представленных ЭСМ (рис. 2б), состоящей из глобулярных соматических зародышей (рис. 3а–в). Частота формирования ЭСМ на этапе инициации соматического эмбриогенеза различалась в зависимости от используемой минеральной основы питательной среды и генотипа-донора. При инкубации культур на питательной среде $\frac{1}{2}$ LV частота формирования ЭСМ у Г₁ и Г₃ изменялась от 5 до 8,7 %, а у Г₂ эти показатели увеличились до 15–28 % в зависимости от отсутствия/присутствия и типа антиоксиданта в составе питательной среды. На среде $\frac{1}{2}$ DCR наблюдались такие же закономерности, однако доля образовавшейся ЭСМ снижалась и варьировала от 1 до 5,3 % у Г₁ и Г₃, а у Г₂ – от 4,1 до 8,4 %. Отмечено, что внесение антиоксидантов в состав питательной среды стиму-

лировало частоту формирования ЭСМ, при этом АК оказывала больший эффект.

При инициации соматического эмбриогенеза каллусы, образованные на среде $\frac{1}{2}$ DCR, темнели в течение первого пассажа и постепенно утрачивали жизнеспособность, поэтому их дальнейшее культивирование и анализ не проводили.

Цитологический анализ культур на питательной среде $\frac{1}{2}$ LV

Цитологический анализ первичных культур, полученных при инкубации незрелых зиготических зародышей на стадии сформированных семядолей на питательной среде $\frac{1}{2}$ LV, показал, что у всех исследованных деревьев-доноров формировалась соматические недифференцированные (глобулярные) зародыши (рис. 3а–в).

Интенсивная пролиферация ЭСМ с активным квиважом происходила только у Г₂ (рис. 3г–д). При этом количество, а также морфологические характеристики соматических зародышей различались в зависимости от состава среды, используемой для инициации и пролиферации соматического эмбриогенеза.

В культурах, инкубируемых на средах, не содержащих антиоксидантов (контроль), как на этапе инициации, так и на этапе пролиферации формировалась ЭСМ, состоящая из некрупных глобулярных зародышей (диаметр глобулы – $86,43 \pm 9,1$ мкм и длина суспензора – $441,2 \pm 22,7$ мкм) (табл. 2). Количество соматических зародышей составляло $608,6 \pm 8,3$ шт. ($P \leq 0,05$) в 1 г ЭСМ. Введение АК в состав питательной среды на этапе пролиферации приводило к увеличению

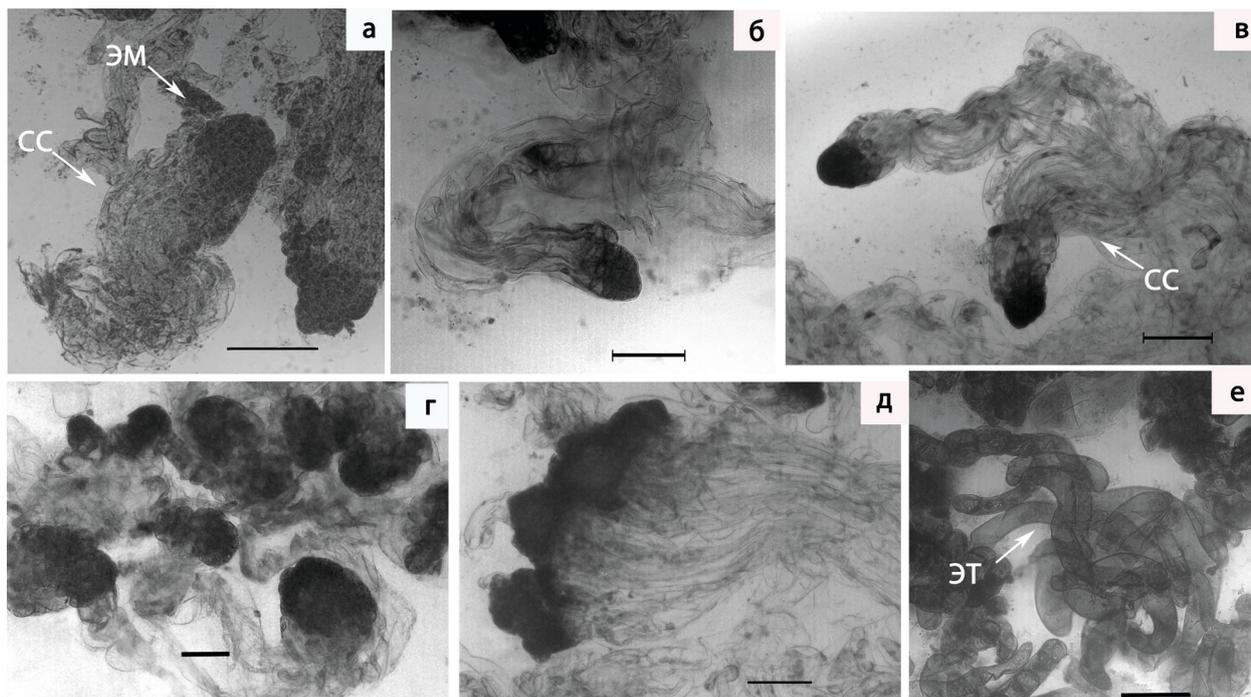


Рис. 3. Формирование соматических зародышей в ЭСМ при введении в культуру незрелых зиготических зародышей на стадии сформировавшихся семядолей: а – инициация соматических зародышей у Γ_1 на питательной среде $\frac{1}{2} LV_1$; б – инициация соматических зародышей у Γ_2 на питательной среде $\frac{1}{2} LV_2$; в – инициация соматических зародышей у Γ_3 на питательной среде $\frac{1}{2} LV_3$; г – пролиферирующие соматические зародыши на питательных средах: $\frac{1}{2} LV_1$ – инициация и $\frac{1}{2} LV_4$ – пролиферация; д – кливаж соматических зародышей на питательных средах: $\frac{1}{2} LV_2$ – инициация и $\frac{1}{2} LV_4$ – пролиферация; е – формирование эмбриональных трубок на питательных средах: $\frac{1}{2} LV_3$ – инициация и $\frac{1}{2} LV_4$ – пролиферация; ЭТ – эмбриональные трубки; ЭМ – эмбриональная масса; СС – суспензорная система. Масштаб – 100 мкм.

диаметра глобулы соматических зародышей в 1,5 раза к концу пассажа, но не оказывало существенного влияния на длину суспензора и на количество глобулярных соматических зародышей в ЭСМ.

В культурах, инкубируемых с АК на этапе инициации с последующим исключением ее на этапе пролиферации, наблюдалось присутствие крупных соматических зародышей, глобула увеличилась в 1,7 раза (табл. 2). Однако количество соматических зародышей в ЭСМ снизилось в 1,5 раза ($P \leq 0,05$). Введение АК в состав питательной среды, как на этапе инициации, так и на этапе пролиферации способствовало формированию наиболее крупных соматических зародышей, диаметр глобулы увеличился в 2,2 раза, а длина суспензора возросла в 1,3 раза, но количество соматических зародышей снижалось в 2,5 раза по сравнению с контролем.

Использование другого антиоксиданта – ВГ – показало иные результаты (табл. 2). Поддержание культур на среде без антиоксидантов на этапе инициации и с ВГ на этапе пролиферации приводило к формированию эмбриональных трубок в ЭСМ. Аналогичные результаты полу-

чили при культивировании ели голубой с этим антиоксидантом на этапе инициации и без него (контроль) на этапе пролиферации, а также при использовании ВГ на этапе пролиферации и АК на этапе пролиферации. Это указывает на торможение соматического эмбриогенеза при такой комбинации использования антиоксидантов. Применение ВГ как при инициации, так и при пролиферации ЭСМ привело к формированию крупных соматических зародышей, глобулы которых в 1,8, а суспензоры в 1,5 раза превышали контроль. При этом количество соматических зародышей в ЭСМ снизилось в 5,3 раза ($P \leq 0,05$). Инкубация культур с АК на этапе инициации и с ВГ на этапе пролиферации приводила к формированию максимального количества ($1132,7 \pm 147,5$ шт.) мелких соматических зародышей (диаметр глобулы – $63 \pm 5,2$ мкм и длина суспензора – $252,2 \pm 40,2$ мкм). Значения различаются при $P \leq 0,05$.

Обсуждение

Проведенное нами исследование показало, что на индукцию и развитие соматических зародышей ели голубой влияют такие факторы, как

Таблица 2

Действие антиоксидантов на продуктивность и параметры глобулярных соматических зародышей *Picea pungens*

Вариант опыта		Количество глобулярных зародышей в 1 г ЭСМ, шт.	Размеры глобулярных зародышей (мкм)	
Инициация	Пролиферация		Диаметр глобулы	Длина суспензора
контроль**	контроль**	608,6 ± 87,3 ^b	86,4 ± 9,1 ^б	441,2 ± 22,7 ^{бв}
контроль**	АК	610,9 ± 96 ^b	133,9 ± 24,6 ^б	470,9 ± 68,5 ^б
контроль**	ВГ	—*	—	—
АК	контроль**	396,1 ± 24 ^{бв}	154,2 ± 20 ^г	392,7 ± 70,5 ^б
АК	АК	235,3 ± 52,6 ^{аб}	197,5 ± 33,4 ^а	574,7 ± 67,3 ^г
АК	ВГ	1132,7 ± 147,5 ^г	63 ± 5,2 ^а	252,2 ± 40,2 ^а
ВГ	контроль**	—*	—	—
ВГ	АК	—*	—	—
ВГ	ВГ	113,6 ± 21,2 ^а	161,5 ± 34 ^г	686,2 ± 84,9 ^д

Примеч. Представлены среднеарифметические величины и их стандартные ошибки. Разные буквы обозначают достоверность количественных и морфометрических изменений (ANOVA, тест Дункана, $P \leq 0,05$).

* – в ЭСМ присутствовали только эмбриональные трубки, их количество не подсчитывали.

** – использовали питательные среды без антиоксидантов.

стадия развития экспланта, генотип дерева-донора, состав питательной среды (минеральная основа, антиоксиданты – АК и ВГ).

Стадия развития зиготических зародышей, использующихся в качестве исходного материала для инициации соматического эмбриогенеза, имеет определяющее значение. По нашим данным, введение в культуру незрелых зиготических зародышей *P. pungens* в качестве первичных эксплантов на стадии раннего эмбриогенеза (посткливажная стадия) как с мегагаметофитами, так и извлеченными из них, оказалось неэффективным. В то же время у других видов елей, например, *P. abies* (Krogstrup, 1986) и *P. mariana* (Lelu, Bornman, 1990), индукция соматического эмбриогенеза более активно идет именно из зиготических зародышей на этапе раннего эмбриогенеза на посткливажной стадии развития (мегагаметофиты). Введение в культуру *in vitro* незрелых зиготических зародышей на стадии инициации семядолей не привело к формированию ЭСМ. Индукция ЭСМ происходила только из незрелых зиготических зародышей, инокулированных на питательную среду $\frac{1}{2}$ LV₂ на стадии сформированных семядолей. Подобная морфогенная реакция отмечена у *P. glauca* (Roberts et al., 1989) и *P. abies* (Hakman, von Arnold, 1985).

Успешность соматического эмбриогенеза ели голубой, а также качество полученных соматических зародышей во многом зависели от генотипа растения-донора. В литературе отмечено, что индукция и пролиферация ЭСМ у хвойных в культуре *in vitro* происходят с ограниченного

числа деревьев (Filonova et al., 2000; Tret'yakova et al., 2012). В результате проведенной нами работы показано, что влияние генотипа дерева-донора проявилось в зависимости от стадии развития эксплантов. При введении в культуру *in vitro* зиготических зародышей на стадии инициации семядолей способность к каллусообразованию показали только два генотипа из исследуемых (Г₂ и Г₃). В то же время при использовании в качестве эксплантов зиготических зародышей со сформированными семядолями влияние генотипа не было существенным, на этапе инициации соматического эмбриогенеза в первичных культурах всех трех исследуемых генотипов присутствовали соматические зародыши. Однако только у одного генотипа (Г₂) отмечали пролиферацию ЭСМ. Это согласуется с мнением зарубежных авторов, что способностью к индукции ЭСМ могут обладать примерно 50–60 % деревьев-доноров, но лишь 1–2 % будут обладать способностью к пролиферации (Stasolla, Yeung, 2003).

На индукцию соматического эмбриогенеза оказывали влияние минеральный состав питательной среды (Stasolla, Yeung, 2003; Tret'yakova et al., 2012), а также присутствие в ней антиоксидантов АК и ВГ. При использовании питательной среды $\frac{1}{2}$ DCR частота каллусообразования у эксплантов была выше, чем при использовании среды $\frac{1}{2}$ LV, однако ЭСМ формировалась чаще на среде $\frac{1}{2}$ LV. АК и ВГ влияли на размеры и количество соматических зародышей. Внесение АК стимулировало частоту формирования ЭСМ при

инициации соматического эмбриогенеза и способствовало развитию глобулярных зародышей на этапе пролиферации, что, возможно, связано со стимулирующим действием этого антиоксиданта на процессы клеточной пролиферации (Liso et al., 1984). Однако количество соматических эмбрионов в ЭСМ снижалось в 1,5–2,5 раза по сравнению с контролем. В работе с *Pinus patula* Scheide et Deppe (Malabadi, Johannes, 2005) под воздействием антиоксидантов (аскорбиновой и лимонной кислот) также наблюдали снижение продукции соматических зародышей. По нашим данным, введение ВГ в состав питательной среды увеличивало частоту образования ЭСМ, но тормозило дальнейшее развитие соматических зародышей. Использование АК на этапе инициации соматического эмбриогенеза и применение ВГ на этапе пролиферации привело к формированию максимального количества мелких глобулярных соматических зародышей. Полученные данные согласуются с зарубежными работами по использованию антиоксидантов, включая АК и ВГ, в индукции соматического эмбриогенеза хвойных (Stasolla, 2010; Pullman et al., 2015). ВГ и АК регулируют окислительно-восстановительный потенциал клеток, контролирующий успешное прохождение всех стадий процесса (Stasolla, 2010; Pullman et al., 2015). Более того, при исследовании ранних стадий раз-

вития соматического эмбриогенеза у *Picea abies* показано, что механизм действия этих антиоксидантов опосредуется через влияние на экспрессию гена НВКЗ, осуществляющем контроль за дифференциацией проэмбриогенной массы в соматические зародыши (Belmonte, Stasolla, 2009). По-видимому, необходимы дальнейшие исследования для выяснения детального механизма, лежащего в основе воздействия АК и ВГ на соматический эмбриогенез у *P. pungens*.

Таким образом, проведена комплексная оценка факторов, влияющих на индукцию соматического эмбриогенеза у *P. pungens*. Полученные результаты свидетельствуют, что для успешного формирования соматических зародышей определяющим фактором является не только выбор донорных растений, но и стадия развития экспланта. Установлено, что лучшей стадией развития зиготических зародышей при введении в культуру *in vitro* у *P. pungens* является этап незрелых зародышей со сформированными семядолями, при этом оптимальной является питательная среда ½ LV. Впервые показано влияние антиоксидантов (АК и ВГ) на индукцию соматического эмбриогенеза у *P. pungens*: применение АК на этапе инициации соматического эмбриогенеза с последующим использованием ВГ на этапе пролиферации способствует массовому формированию глобулярных соматических зародышей.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Afele J. C., Saxena P. K. 1995. Somatic embryogenesis in blue spruce (*Picea pungens* Engelmann). In: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants Forestry Sciences*. Eds. S. M. Jain, P. K. Gupta, R. J. Newton. Springer Science+Business Media Dordrecht, 44–46: 99–109.
- Afele J. C., Senaratha T., Saxena P. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo culture *Picea pungens*. *Plant Cell Reports* 11: 299–303.
- Belmonte M. F., Stasolla C. 2009. Altered HBK3 expression affects glutathione and ascorbate metabolism during the early phases of Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis. *Plant Physiol Biochem.* 47: 904–911.
- Cram W. H. 1984. Needle color and vigor of inbred progenies of *Picea pungens*. *HortScience.* 19: 125–126.
- Daubenmire R. 1972. On the relation between *Picea pungens* and *Picea engelmannii* in the Rocky Mountains. *Canadian Journal of Botany* 50: 733–742.
- Dunstan D. I., Bekkaoui F., Pilon M., Fowke L. C., Abrams S. M. 1988. Effects of abscisic acid and analogues on the maturation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Plant Sci.* 58: 77–84.
- Filonova H. L., Bozhkov P. V., von Arnold S. 2000. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J. Exp. Bot.* 51: 249–264.
- Gifford E. M., Foster A. S. 1989. *Morphology and evolution of vascular plants*. W. H. Freeman and Company, New York, 327 pp.
- Gupta P. K., Durzan D. J. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Repts.* 4: 177–179.
- Gupta P. K., Durzan D. J. 1986. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis from subcultured callus of mature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 22: 685–688.
- Hakman I., Rennie P., Fowke L. C. 1987. A light and electron microscopy study of *Picea glauca* (white spruce) somatic embryos. *Protoplasma* 140: 100–109.

- Hakman I., von Arnold S.** 1985. Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies*. *J. Plant Physiol.* 121: 149–158.
- Krogstrup P.** 1986. Embryo-like structures from cotyledons and ripe embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Can. J. For. Res.* 16: 664–668.
- Lelu M.-A., Bornman C. H.** 1990. Induction of somatic embryogenesis in excised cotyledons of *Picea abies* and *Picea mariana*. *Plant Physiol. Biochem.* 28: 785–791.
- Liso R., Calabrese G., Bitonti M. B., Arrigoni O.** 1984. Relationship between ascorbic acid and cell division. *Exp. Cell Res.* 150: 314–320.
- Litvay J. D., Verma D. C., Jonson M. A.** 1985. Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Rep.* 4: 325–328.
- Malabadi R. B., Johannes V. S.** 2005. Role of antioxidants and amino acids on somatic embryogenesis of *Pinus patula*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 41: 181–186.
- Misra S.** 1994. Conifer zygotic embryogenesis, somatic embryogenesis, and seed germination: biochemical and molecular advances. *Seed Sci. Res.* 4: 357–384.
- Pullman G. S., Zeng X., Copeland-Kamp B., Crockett J., Lucrezi J., May S. W., Bucalo K.** 2015. Conifer somatic embryogenesis: improvements by supplementation of medium with oxidation–reduction agents. *Tree Physiol.* 35(2): 209–224.
- Roberts D. R., Flinn B. S., Webb D. T., Webster F. B., Sutton B. C. S.** 1989. Characterization of immature embryos of interior spruce by SDS-PAGE and microscopy in relation to their competence for somatic embryogenesis. *Plant. Cell. Rep.* 8: 285–288.
- Roberts D. R., Shutton B. C. S., Flinn B. S.** 1990. Synchronous and high-frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. *Canadian Journal of Botany* 68: 1086–1090.
- Savella L.** 1965. Propagation of *Picea pungens* glauca cultivars. *The International Plant Propagators' Society Proceedings.* 15: 199–202.
- Shalaev E. A., Tret'yakova I. N.** 2011. Induction of somatic embryogenesis of *Picea ajanensis* in culture *in vitro*. In: *Khvoynyye borealnoy zony [Coniferous of boreal region]* XXVIII, 1–2: 69–71 [In Russian]. (**Шалаев Е. А., Третьякова И. Н.** Индукция соматического эмбриогенеза у ели аянской в культуре *in vitro* // Хвойные бореальной зоны, 2011. Т. XXVIII, № 1–2. С. 69–71).
- Stasolla C.** 2010. Glutathione redox regulation of *in vitro* embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry.* 48: 319–327.
- Stasolla C., Yeung E. C.** 1999. Ascorbic acid improves conversion of white spruce somatic embryos. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 35: 316–319.
- Stasolla C., Yeung E. C.** 2003. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 74: 15–35.
- Tret'yakova I. N., Barsukova A. V.** 2010. Conservation of coniferous species genetic resources of Siberia using *in vitro* somatic embryogenesis – modern method of biotechnology. In: *Khvoynyye borealnoy zony [Coniferous of boreal region]* XXVII, 1–2: 180–186 [In Russian]. (**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. XXVII. № 1–2. С. 203–206).
- Tret'yakova I. N., Barsukova A. V.** 2012. Somatic Embryogenesis in *in vitro* Culture of Three Larch Species. *Russian Journal of Developmental Biology.* 43: 353–361.
- Tret'yakova I. N., Voroshilova E. V., Shuvaev D. N., Pak M. E.** 2012. The prospects of clonal micropropagation of coniferous using *in vitro* culture via somatic embryogenesis. In: *Khvoynyye borealnoy zony [Coniferous of boreal region]* XXX, 1–2: 180–186 [In Russian]. (**Третьякова И. Н., Ворошилова Е. В., Шуваев Д. Н., Пак М. Э.** Перспективы микроклонального размножения хвойных в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез // Хвойные бореальной зоны, 2012. Т. XXX. № 1–2. С. 180–186).
- Trigiano R. N., Gray D. J.** 2000. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises, 2nd edition.* Boca Raton, USA: CRC Press, 454 pp.