

УДК 630*165.7: 631.532

ИНДУКЦИЯ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА У ЕЛИ АЯНСКОЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Е.А. Шалаев, И.Н. Третьякова

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН
660036 Красноярск, Академгородок, 50, e-mail: culture@ksc.krasn.ru

Ель аянская (*Picea ajanensis* Fisch. ex Carr.) является одним из основных лесообразователей умеренного климатического пояса. Работа по инициации соматического эмбриогенеза у ели аянской проводилась для решения проблемы лесовосстановления. Методика соматического эмбриогенеза для данного вида была разработана впервые.

Ключевые слова: ель аянская, соматический эмбриогенез, эмбриональная масса, соматические зародыши, каллус

Ajanensis spruce (*Picea ajanensis* Fisch. ex Carr.) is one of main species in temperate climate zone. The investigation of somatic embryogenesis of *Picea ajanensis* was conducted for solving of reforestation problem. This method was developed for the first time for this species.

Key words: *Picea ajanensis*, somatic embryogenesis, embryonal masses, somatic embryo, callus

ВВЕДЕНИЕ

Ель аянская (*Picea ajanensis* Fisch. ex Carr.) одна из основных лесообразующих пород, встречается на высотах от 400—500 до 1200 м над уровнем моря. На севере обычно растет вместе с лиственницей, на юге с магнолией, бамбуком, часто образует смешанные насаждения с пихтой белокорой, березами, кедром корейским. В других районах России, в том числе Сибири, ель аянская широко применяется как вид интродукцент.

Этот вид довольно морозостоек. Растет медленно, требователен к высокой влажности воздуха. Обитает на разнообразных, в том числе и на сильнокаменистых бедных песчаных и торфянистых почвах, не выносит заболачивания. Древесина идет на пиломатериалы, в строительство, заготавливается на баланс для целлюлозно-бумажной промышленности. При интродукции в европейскую часть часто страдает от поздних заморозков. (Крюссман, 1986). Для решения проблемы лесовосстановления видов хвойных за рубежом разрабатываются программы с использованием современных биотехнологий микроклонального размножения. Одной из самых перспективных биотехнологий микроклонального размножения хвойных является соматический эмбриогенез. Соматический эмбриогенез – асексуальный способ размножения, был открыт 30 лет назад у голосеменных растений – *Picea abies* (Chalupa, 1985; Hakman et al., 1985). В настоящее время с помощью соматического эмбриогенеза производят массовое тиражирование высокопродуктивных, устойчивых к фитопатогенам клеточных линий хвойных растений (Lelu et.al.1994;2008: Klimaszewska et al, 2002).

Этот способ регенерации растений имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами микроклонального размножения, позволяет сохранить генетические ресурсы в течение длительного

периода времени, благодаря высокой продуктивности эмбриональной массы и способности ее подвергаться длительной криоконсервации, а так же проводить исследования, направленные на массовое тиражирование генетически улучшенных форм хвойных.

У видов рода *Picea* соматический эмбриогенез был получен у *Picea omorica*, *P. glauca*, *P. breweriana* и *P. abies* (Hazubska, Szczygiel, 2003), *Picea mariana* (Lelu and Bornman, 1990).

Работа по инициации соматического эмбриогенеза у ели аянской проводилась впервые.

Цель настоящей работы заключалась в разработке биотехнологии соматического эмбриогенеза у ели аянской с подбором концентрации гормонов и желирующих агентов на процессы образования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Растительный материал. Объектом исследований служили деревья ели аянской, произрастающей на территории экспериментальной опытной базы Института леса "Погорельский бор" (Красноярский край).

Материалом для индукции соматического эмбриогенеза служили изолированные зиготические зародыши ели аянской находящиеся на стадии позднего эмбриогенеза.

В этот период длина зародыша в зародышевом канале достигала 2мм. Сбор посадочного материала осуществлялся с середины июля по август 2009г. Семена очищались от покровных чешуй, поверхность стерилизовались 5 % спиртовым раствором йода в течении 3 минут. После 3х кратной промывки в стерильной дистиллированной воде, зародыши извлекались из мегагаметофитов в стерильных условиях и помещались на питательную среду.

Индукция эмбриональной массы. Для инициации соматического эмбриогенеза из зиготических зародышей ели аянской использовались базовые среды TE, MS и DCR, с добавлением мезоинозита(1г/л), казеина(0,5г/л), глутамина(0,5г/л), саха-

розы(30г/л) и агара(7г/л). В качестве регуляторов роста использовались 2,4-Д(3мг/л) и БАП(1мг/л). pH среды был приведен к 5.8 до автоклавирования при 121°C, 110 кРа в течение 20 минут. Культиви-

рование производилось в чашках Петри на 20 мл индукционной среды в темноте при 25°C. Наличие эмбриональной массы определялось морфологическим наблюдением и цитологическим анализом.

Таблица 1 - Состав питательных сред, используемых в экспериментах по культуре *in vitro* у ели аянской

Компоненты среды	Концентрация элемента в среде, мг/л		
	MS	TE	DCR
Макроэлементы:			
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	556	556
NH ₄ NO ₃	1650	-	-
KNO ₃	1900	340	340
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	85	85
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	720	370
KH ₂ PO ₄	170	170	170
KCl	-	1900	-
CaCl ₂	-	158	-
Микроэлементы:			
KI	0,83	0,83	0,83
H ₃ BO ₃	0,62	0,62	0,62
MnSO ₄ · 4H ₂ O	19,6	25,35	22,3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	25,8	8,6
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ · 6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Железо:			
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8
Na ₂ · ЭДТА	37,3	37,3	37,3
Витамины и органические вещества:			
Мезоинозит	1	1	1
Тиамин	0,1	0,1	0,1
Глицин	0,1	0,1	0,1
Пиридоксин	0,5	0,5	0,5
Никотиновая кислота	0,5	0,5	0,5
Глутамин	-	500	-
Казеин	-	500	-
pH	5,8	5,8	5,8

Пролиферация эмбриональной массы. Для пролиферации полученной эмбриональной массы применялась базовая среда DCR содержащая 2,4Д (3мг/л), БАП (0,5мг/л) и сахарозу (16г/л). Культуры инкубировались в темноте при температуре 24±1°C. Пересадки на свежую питательную среду производились каждые 14 дней.

Цитологический анализ. Для проведения цитологического анализа использовались давленные препараты. Для приготовления давленных препаратов экспланты помещали на предметное стекло и 1-2 минуты выдерживали в красителе (сафранин с добавлением метиленового синего) (Паушева, 1980).

Далее добавляли глицерин, и накрывали препарат покровным стеклом. Просмотр микроскопических образцов осуществляли на микроскопе МБИ-6. Замеры клеток и эмбриональных структур проводили при помощи окуляр-микрометра с последующим переводом полученных едини в мкм. Статистическая обработка данных проводилась по стандартным методикам при помощи программы Microsoft Excel. Морфологические изменения фиксировались цифровой фотокамерой Fudjifilm FinePix S7000 (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный эксперимент показал, что состав базовых сред оказывает заметное влияние на формирование эмбриогенного каллуса ели аянской.

Индукция эмбриогенной ткани ели аянской лучше всего происходила на среде DCR (80 %), тогда как на среде MS и TE происходило в основном разрастание семядолей – образование каллуса не происходило. В течение 1го месяца клетки эмбриогенного каллуса активно делились и образовывали эмбрионально-супензорную массу (ЭСМ). ЭСМ характеризуется как белая, полупрозрачная масса содержащая 2 типа клеток: маленькие плотные цитоплазматические клетки – эмбриональные глобулы, и удлиненные клетки с большими вакуолями (эмбриональные трубки) – формируют супензор. Внутри ЭСМ из эмбриональных глобул формируются соматические зародыши. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* у ели аянской шел значительно быстрее, чем у других видов хвойных (Велоруссова, Третьякова, 2008). Уже через 1-2 недели пролиферации соматические зародыши четко выделялись в ЭСМ и начинали процесс дифференциации семядолей.

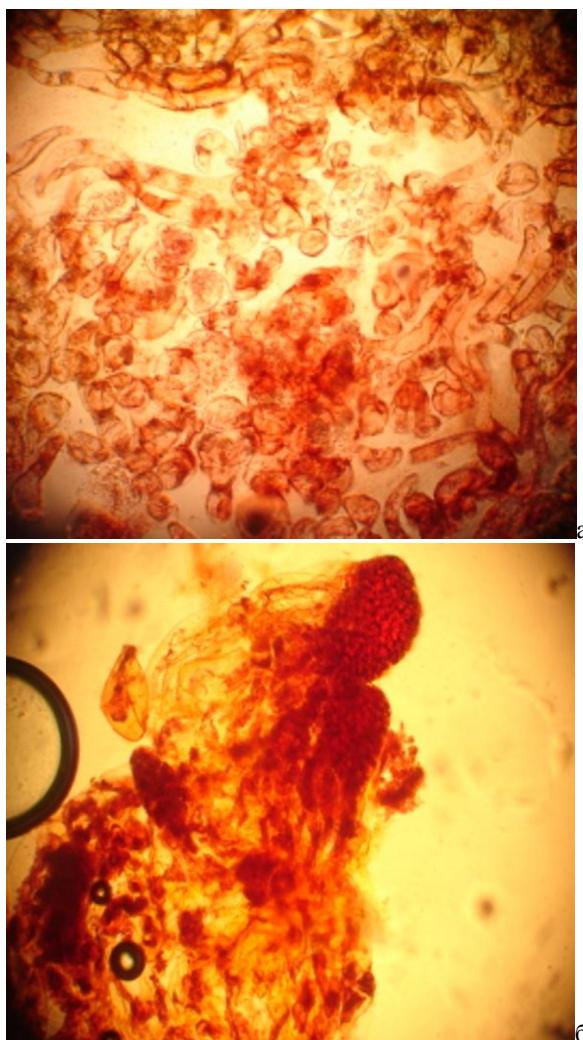


Рисунок 1 - Эмбрионально-супензорная масса с зародышами ели аянской.
а – округлые и удлиненные клетки, б – не зрелые соматические зародыши

У других видов хвойных, в том числе у лиственницы, этот процесс шел через 1-2 месяца культивирования на пролиферационной среде (Белоруссова, Третьякова, 2008).

Образование ЭСМ и развитие соматического эмбриогенеза у ели аянской в основном идет по схеме описанной для других видов елей (Arnold, 1988; Stasolla, 2003). За исключением изменения концентрации фитостимуляторов. В экспериментах Arnold и Hazubska концентрация гормонов составляла 2,4Д – 10мг/л, БАП – 5мг/л и 2,4Д – 4,5-9мг/л, БАП – 2,25мг/л соответственно. Принимая во внимание методики применяемые для других видов елей, концентрация 2,4 Д была увеличена до 3 мг/л. Концентрация БАП осталась прежней – 1мг/л. В результате мы получили высокую частоту

индукции эмбриогенного каллуса – 80 % , и массовое образование соматических зародышей.

Таким образом, впервые для ели аянской были получены соматические зародыши. Укоренение планируется производить с добавлением метаболитов *Trichoderma*. Дальнейшие опыты приведут к массовому тиражированию данного вида через соматический эмбриогенез.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Белоруссова А.С., Третьякова И.Н. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 2. С. 1-10.
- Крюссман Г. Хвойные породы. Пер. с нем./Ред. Предисловие канд.биол.наук Н.Б. Гроздовой. – М.: Лесн. Промст., 1986.–256 с.
- Милютин Л.И. Половая репродукция хвойных. Новосибирск: Наука, 1973. Т.2. 145 с.
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980. 340 с.
- Рожков А.С., Хллиманкова Е.С., Степанчук Е.С. Восстановительные процессы у хвойных при дефолиации. Новосибирск: Наука, 1991. 88 с.
- Третьякова И.Н., Баранчиков Ю.Н., Буглова Л.В., Белоруссова А.С., Романова Л.И. Особенности формирования генеративных органов лиственницы сибирской и их морфогенетический потенциал // Успехи современной биологии. 2006. Т. 126. №5. С. 472-480.
- Arnold S.. Woodward S. Organogenesis and embryogenesis in mature zygotic embryos of *Picea sitchensis* // Three physiology. 1988. V 4. P. 291-300.
- Chalupa W. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) // Karst. Communi. Inst. For. Cech. 1985. V. 14. P. 57-63.
- Hakman I., Fowke L. C., Von Arnold S., Eriksson T. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce) // Plant Sci. 1985. V. 38. P. 53-59.
- Hakman I., Von Arnold S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (white spruce) // Physiol. Plant. 1988. V. 72. P. 579-587.
- Hazubska T., Szczyligiel K. Induction of somatic embryogenesis in spruce: *Picea omorica*, *P. glauca*, *P. breweriana* and *P.abies* // Dendrobiology. 2003. V.50.P.17-24.
- Lelu M. A., Bastien C., Klimaszewska K., Ward C., Charest P.J. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoleucae*): Part 1. Somatic embryo maturation // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1994a. V. 36. P. 107-115.
- Lelu-Walter M-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2008. V. 92. P. 31–45.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. №4. P. 473-497.

Поступила в редакцию 12 января 2010 г.
Принята к печати 27 апреля 2011 г.