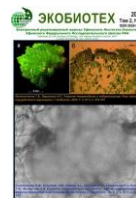




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



РАЗВИТИЕ МИКРОПОБЕГОВ В ЭМБРИОКУЛЬТУРЕ *PICEA OBOVATA* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТИДИАЗУРОНА

Железниченко Т.В., Воронкова М.С.

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,
Новосибирск

E-mail: zhelez05@mail.ru; bmc_87@mail.ru

В работе представлены результаты по исследованию адвентивного побегообразования в эмбриокультуре *Picea obovata* под действием тидиазурина. Установлено, что при культивировании зрелых зиготических зародышей на свету с тидиазурином происходило разрастание тканей эксплантов. Микропобеги успешно формировались при культивировании зиготических зародышей на питательной среде $\frac{1}{2}$ LV. Длительность первого пассажа на среде с тидиазурином (0,5–1 μ M) составляла 28 суток, а последующих (на безгормональной питательной среде) – 35 суток.

Ключевые слова: *Picea obovata*, эмбриокультура, тидиазурон, микропобеги

MICRO SHOOTS DEVELOPMENT ON THE EMBRYO RESCUE OF *PICEA OBOVATA* UNDER THIDIAZURON TREATMENT

Zheleznichenko T.V., Voronkova M.S.

Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the
Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

E-mail: zhelez05@mail.ru; bmc_87@mail.ru

The paper presents the results of the study of adventitious shoot formation in the embryo rescue of *Picea obovata* under thidiazuron treatment. It was established that the cultivation of mature zygotic embryos in the light with thidiazuron resulted in the growth of explant tissues. Micro shoots were successfully formed during the cultivation of zygotic embryos on a $\frac{1}{2}$ LV nutrient medium. The duration of the first passage on a medium with thidiazuron (0.5–1 μ M) was 28 days, and the second (on a hormone-free nutrient medium) was 35 days.

Keywords: *Picea obovata*, embryo rescue, thidiazuron, micro shoots

Поступила в редакцию: 30.09.2019

[DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-3-378-381](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-3-378-381)

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема сохранения биоразнообразия естественных экосистем, в том числе лесной растительности становится все более актуальной. Основным эдификатором лесов подзоны южной тайги Западной Сибири является ель сибирская (*P. obovata*). При естественном возобновлении этого древесного вида существуют некоторые сложности, поскольку семеношение хвойных происходит с периодичностью 2–5 лет, при этом количество полнозернистых семян может составлять всего 3 % [Третьякова, Бажина, 1996]. Также особенностью хвойных лесообразователей является низкая грунтовая всхожесть семян [Теринов, 2015]. В связи с этим требуется применение современных биотехнологических подходов для разработки эффективных методов и программ лесовосстановления. Альтернативу традиционным способам размножения растений, в том числе древесных, представляет метод культуры *in vitro*. Одним из эффективных и мощных триггеров морфогенеза древесных растений в системе *in vitro* является тидиазурон (ТДЗ) - N-фенил-N'-1,2,3-тидiazурол-5-мочевина [Murthy et al. 1998; Guo et al. 2011]. Уникальность этого синтетического регулятора роста заключается в том, что он одновременно способен проявлять как ауксиновый, так и цитокининовый эффект, несмотря на то, что химическому

строению он полностью отличается от обычно используемых ауксинов и цитокининов [Guo et al., 2011].

Цель работы: исследовать развитие микропобегов в эмбриокультуре *P. obovata* на питательных средах с ТДЗ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве эксплантов для введения в культуру использовали зрелые зиготические зародыши, выделенные из семян. Семена собирали со свободно-опыленных деревьев, произрастающих на территории дендрария ЦСБС СО РАН (Новосибирск). Материал стерилизовали 0,1% AgNO₃ (10 мин.), затем трехкратно промывали стерильной водой (10 мин.). Экспланты культивировали на питательной среде ½ LV [Litvay, 1985] при 23 °С и 16-часовом фотопериоде. В качестве регуляторов роста использовали ТДЗ в концентрации 0,5 мкМ и/или 1 мкМ. Длительность первого пассажа составляла 28 суток. Затем растительный материал переносили на безгормональные питательные среды того же состава.

Материал для морфо-гистологического анализа фиксировали в FAA – этанол : формалин : ледяная уксусная кислота (100 : 7 : 7), начиная с 4 суток культивирования и далее отбирали образцы с периодичностью 4–5 суток. Промывку и дальнейшее хранение осуществляли в 70 % этиловом спирте. Далее фиксированный материал подготавливали для заливки в Paraplast (Sigma, США), проводя через этанол, смесь этанола и хлороформа, хлороформ. Изучение процессов морфогенеза проводили на базе Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ЦСБС СО РАН на постоянных препаратах [Паушева, 1988]. Тонкие срезы (7–9 мкм) получали на ротационном микротоме (Microm, Германия), затем их помещали на предметные стекла и окрашивали гематоксилином по Эрлиху с подкраской алциановым синим. Гистологический анализ проводили с помощью светового микроскопа Axioskop-40 (Carl Zeiss, Германия) с программным управлением, оборудованным цифровой камерой. Полученные при культивировании *in vitro* морфогенные структуры и динамику их развития анализировали с помощью стереомикроскопа Carl Zeiss Stereo Discovery V 12. Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам, используя Microsoft Excel 2003. Все эксперименты проводили минимум в трехкратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали процесс формирования адвентивных микропобегов в эмбриокультуре *P. obovata* под влиянием ТДЗ 0,5 мкМ и 1 мкМ в питательной среде ½ LV. Процессы регенерации в тканях первичных эксплантов наблюдали при обеих концентрациях регулятора роста в питательной среде. На 4-е сутки культивирования отмечено небольшое увеличение зиготических зародышей в объеме и появление рыхлого каллуса в области гипокотилия. К 10-м суткам культивирования в зоне гипокотилия также продолжал развиваться белый рыхлый каллус, а ткани семядолей разрастались и приобретали зеленоватое окрашивание. На 28-е сутки культивирования разросшиеся семядоли приобретали ярко-зеленое окрашивание, а на их поверхности наблюдали образование многочисленных бугорков (рис. а). Анатомический

анализ показал, что ткани разросшихся семядолей внутри имели рыхлую структуру, а в эпидермальных слоях формировались многочисленные меристематические центры (рис. б). Объем клеточной массы увеличивался за счет переклиналильных делений, которые приводили к образованию десяти слоев клеток.

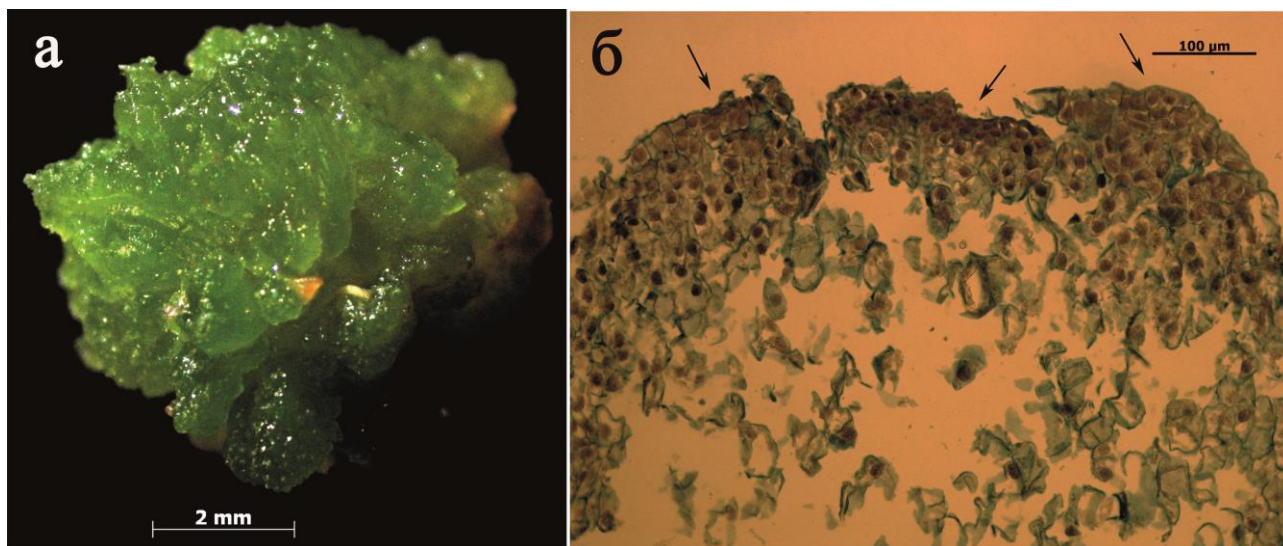


Рис. Морфологические изменения в эмбриокультуре ели сибирской под действием тидиазурона (0,5 μM) при культивировании на питательной среде ½ LV: а – разросшаяся ткань зародыша, масштаб: 2 мм; б – поперечный срез экспланта, видны меристематические центры (стрелки) в эпидермальных слоях разросшихся семядолей, масштаб: 100μm.

Установлено, что концентрация ТДЗ в питательной среде и длительность инкубации влияли на процессы органогенеза *P. obovata*. При более высокой концентрации ТДЗ (1 μM) – ткани семядолей приобретали розоватое окрашивание, а при пересадке материала на безгормональные питательные среды наблюдали некроз тканей. В предыдущих исследованиях при регенерации *P. pungens* в культуре *in vitro* [Железниченко и др., 2019] установлено, что наиболее оптимальная длительность первого пассажа составляла 28 суток. Более длительное культивирование приводило к формированию каллуса с нежизнеспособными меристемоидами. Развитие адвентивных почек и микропобегов из меристемоидов наблюдали при субкультивировании растительного материала, полученного в течение первого пассажа, на безгормональные питательные среды. При последующем культивировании в течение двух пассажей на безгормональной питательной среде наблюдали удлинение микропобегов, их длина в среднем составляла 8-15 мм.

Таким образом, установлено, что в эмбриокультуре *P. obovata*, при культивировании на свету с тидиазуром отмечено успешное формирование адвентивных почек и микропобегов из меристемоидов. При более низкой концентрации ТДЗ в питательной среде микропобеги были более жизнеспособными. Полученные результаты послужат основой для разработки эффективных систем клонального размножения ели сибирской.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00434 мол_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Третьякова И.Н., Бажина Е.В. Семенная продуктивность макростробилов и качество семян пихты сибирской в нарушенных лесных экосистемах // Экология. 1996. Т. 27. № 6. С. 35–42.
2. Теринов Н.Н. Грунтовая всхожесть семян ели сибирской (*Picea obovata*) // Леса России и хозяйство в них. 2015. № 4 Т. 55. С. 40–44.
3. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений - М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
4. Litvay J.D., Verma D.C., Jonson M.A. 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., 1985. – Vol. 4. – P. 325–328.
5. Железниченко Т. В., Мурасева Д. С., Стасова В. В., Новикова Т. И. Морфогенез *Picea pungens* Engelm. в культуре *in vitro* под действием тидиазурона // Сибирский лесной журнал. 2019. № 1. С. 57–64.
6. Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1998) Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis // In Vitro Cell Dev Biol – Plant. Vol. 34. P. 267–275.
7. Guo B, Abbasi BH, Zeb A, Xu LL, Wei YH (2011) Thidiazuron: a multidimensional plant growth regulator // Afr J. Biotechnol. Vol. 10. P. 8984–9000.