
БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 630*165.7:631.532

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ РЕГЕНЕРАЦИИ МИКРОРАСТЕНИЙ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ ИЗ ВЫСОКОПРОДУКТИВНОЙ ЭМБРИОГЕННОЙ ЛИНИИ

М. П. КУСЕНКОВА¹⁾

¹⁾Институт леса НАН Беларуси, ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Беларусь

Исследовано влияние органоминерального состава питательных сред, в том числе абсцисовой кислоты в концентрациях 15; 30 и 60 мкмоль/л, при созревании и прорастании эмбриоидов на регенерацию микрорастений в процессе соматического эмбриогенеза. В качестве исходного материала для проведения экспериментов использовалась каллусная ткань высокопродуктивной клеточной линии ели европейской (M2), полученная из семян белорусского происхождения. Среди апробированных вариантов модификаций питательных сред на этапе созревания эмбриоидов выраженный положительный эффект дало применение абсцисовой кислоты в концентрациях 30 и 60 мкмоль/л. Для этапа прорастания эмбриоидов оптимальной является питательная среда Литвея с половинным содержанием макросолей и добавлением активированного угля (5 г/л) и глутамина (0,5 г/л).

Ключевые слова: соматический эмбриогенез; ель европейская; эмбрионные культуры; эмбриоид, регенерант.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б21М-071). Автор выражает признательность сотрудникам научно-исследовательского отдела генетики, селекции и биотехнологии Института леса НАН Беларуси доктору биологических наук, член-корреспонденту НАН Беларуси, профессору В. Е. Падутову, кандидату биологических наук С. И. Ивановской и Д. В. Кулагину за помощь в планировании и организации экспериментальной работы и ценные замечания по тексту статьи.

Образец цитирования:

Кусенкова МП. Оптимизация условий регенерации микро-растений ели европейской из высокопродуктивной эмбрио-генной линии. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;3:47–56.
EDN: KOUSRL

For citation:

Kusenкова MP. Optimisation of regeneration conditions of Norway spruce microplants from highly productive embryo-genic line. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;3: 47–56. Russian.
EDN: KOUSRL

Автор:

Марина Петровна Кусенкова – научный сотрудник научно-исследовательского отдела генетики, селекции и биотехно-логии.

Author:

Marina P. Kusenкова, researcher at the department of genetics, breeding and biotechnology.
marinaggu@mail.ru



OPTIMISATION OF REGENERATION CONDITIONS OF NORWAY SPRUCE MICROPLANTS FROM HIGHLY PRODUCTIVE EMBRYOGENIC LINE

M. P. KUSENKOVA^a

^aForest Institute, National Academy of Sciences of Belarus,
71 Pralietarskaja Street, Gomel 246050, Belarus

The article presents the results of the study on the influence of nutrient media-composition, including the abscisic acid in different concentrations, on somatic embryo maturation and germination. The callus tissue of Norway spruce highly productive cell line (M2), obtained from seeds of Belarusian origin, was selected as the object of experimental study. Among the tested variants of abscisic acid concentration (15; 30 and 60 $\mu\text{mol/L}$) during somatic embryo maturation stage using the last two gave a pronounced positive effect. It has been showed that Litvay medium with the half-strength macrosalts and the addition of activated charcoal (5 g/L) and glutamine (0.5 g/L) is optimal for the somatic embryo germination stage.

Keywords: somatic embryogenesis; Norway spruce; embryogenic cultures; somatic embryo; regenerant.

Acknowledgements. This work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. B21M-071). The author expresses gratitude to the employees of the department of genetics, breeding and biotechnology, Forest Institute, National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (biology), corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, full professor V. E. Padutov, PhD (biology) S. I. Ivanovskaya and D. V. Kulagin for help in planning and organising of experimental work and valuable comments on the text of the article.

Введение

Соматический эмбриогенез – один из наиболее перспективных методов вегетативного размножения хвойных растений. Его суть заключается в дифференциации из соматических клеток зародышеподобных структур, которые по внешнему виду напоминают зиготические зародыши.

К преимуществам метода соматического эмбриогенеза следует отнести высокую скорость клонального размножения, наличие потенциала для автоматизации процесса и создания искусственных семян, а также возможность использования существующих технологий получения сеянцев и саженцев для выращивания посадочного материала из микрорастений [1; 2]. Стоит отметить, что вегетативное потомство, продуцируемое таким способом, полностью воспроизводит наследственные характеристики материнских форм. В связи с этим метод соматического эмбриогенеза может быть использован как для оценки и сохранения хозяйственно ценных генотипов, так и для массового размножения в целях создания плантационных лесных культур или коммерческой реализации посадочного материала декоративных растений [3].

Учитывая сказанное выше, актуальной задачей является разработка и совершенствование технологий соматического эмбриогенеза для экономически значимых древесно-кустарниковых растений. Исходя из литературных данных [4; 5] и собственного опыта [6; 7], в случае с елью европейской (*Picea abies* (L.) H. Karst.) наибольшие затруднения связаны с этапами, на которых растительный материал проходит через критически значимые физиолого-биохимические перестройки, а именно с этапами созревания эмбриоидов внутри клеточной массы и их трансформации в проростки.

Созревание – стадия соматического эмбриогенеза, которая начинается с формирования незрелых соматических зародышей из проэмбриогенных масс и заканчивается дифференциацией у них семядолей, гипокотыля, апикальных меристем побега и корня [8]. Одним из наиболее существенных факторов культивирования, определяющих эффективность этого процесса, являются наличие и концентрация абсцизовой кислоты (АБК) в питательной среде [9]. С одной стороны, названный фитогормон выступает индуктором остановки роста эмбриогенного каллуса и перехода к формированию эмбриоидов. При его низкой концентрации может потребоваться более частое субкультивирование материала [8]. С другой стороны, АБК является ингибитором роста растений, и высокая концентрация данного вещества или длительный контакт с ним эмбриоидов могут отрицательно влиять на прорастание зародышей и дальнейшее развитие регенерантов [10]. В ряде исследований показано, что реакция эмбриогенных тканей хвойных деревьев различных видов на этот фитогормон сильно варьирует [9]. Так, для правильного развития соматических эмбрионов у ели красной (*P. rubens* Sarg.) необходима высокая концентрация

экзогенной АБК (40 мкмоль/л) [11], в то время как для материала ели сизой (*P. glauca* (Moench) Voss) и ели черной (*P. mariana* (Mill.) Britton et al.) достаточно присутствия 12 мкмоль/л этого вещества [12].

Концентрация АБК, используемая в процессе соматического эмбриогенеза у ели европейской, по данным разных авторов, варьирует от 20 до 60 мкмоль/л [8–10; 13; 14]. Такой разброс значений, вероятно, можно объяснить особенностями лабораторной практики, применявшейся в каждом из исследований. Согласно работам [8; 14] эмбриониды, полученные при концентрации АБК на уровне 30 мкмоль/л, имели более высокие скорости прорастания, чем эмбриониды, созревшие при концентрации АБК 60 мкмоль/л. Кроме того, прослеживается следующая тенденция: с увеличением длительности нахождения каллусной ткани на питательной среде с этим фитогормоном замедляется развитие микрорастений на дальнейших этапах соматического эмбриогенеза (прорастание и адаптация к условиям *ex vitro*).

Прорастание – стадия соматического эмбриогенеза, во время которой происходит трансформация эмбрионидов в проростки, а также протекают начальные этапы роста зародышевого побега и корня. По окончании этой стадии микрорастения переносят из асептических условий в почвенные субстраты [15].

Некоторые исследователи отмечают, что важным условием нормального морфологического развития микрорастений хвойных видов в процессе соматического эмбриогенеза является сбалансированный состав источников углерода и азота в питательной среде. В случае с азотом определенную роль также играет используемая *in vitro* химическая форма. Для добавления в питательные среды применяются три вида соединений азота (как по отдельности, так и совместно): соли аммония, нитраты и органические вещества (аминокислоты, гидролизат казеина и др.) [16; 17]. Ряд исследований, выполненных на представителях рода *Picea*, показали, что использование органических веществ может положительно действовать на процессы, протекающие при соматическом эмбриогенезе. Так, применение глутамина повышало частоту инициации эмбриогенных линий и интенсивность мультипликации каллусной ткани, а также способствовало формированию и прорастанию соматических зародышей [18–20]. В работе [16] продемонстрировано, что при добавлении названной аминокислоты в питательные среды она является предпочтительным источником азота во время прорастания соматических зародышей ели европейской и на ее долю приходится до 50 % ассимиляции азота. Исходя из этого, автор предположил, что модификация питательных сред с применением глутамина позволит оптимизировать разрабатываемую методику соматического эмбриогенеза.

Положительный эффект, наблюдаемый при использовании активированного угля для культивирования растений в условиях *in vitro*, большинство исследователей связывают с физико-химическими процессами сорбции и десорбции различных веществ. Названная субстанция способна к нейтрализации токсичных продуктов метаболизма культивируемых тканей (например, некоторых фенольных соединений). Также активированный уголь может постепенно высвобождать вещества, которые способствуют росту (витамины, ионы металлов и фитогормоны, включая АБК и газообразный этилен), и благодаря этому пролонгировать их действие. С учетом вышесказанного можно предположить, что в ходе соматического эмбриогенеза активированный уголь смягчает действие регуляторов роста, а это, в свою очередь, положительно влияет на процессы созревания и прорастания соматических зародышей [21–23].

Таким образом, основной целью данного исследования была оптимизация органоминерального состава питательных сред для применения на этапах созревания эмбрионидов и получения микрорастений ели европейской.

Материалы и методы исследования

В опыте использовались питательные среды на основе прописей Мурасиге – Скуга (*Murashige – Skoog medium*, MS) и Литвея (*Litvay medium*, LM). Содержание источников макро- и микроэлементов, органических веществ в каждой из сред и их модификаций представлено в табл. 1.

Созревание соматических зародышей включало в себя культивирование эмбриогенного каллуса на питательной среде ½ LM (см. табл. 1) без регуляторов роста с добавлением активированного угля (10 г/л) в течение 1 нед., а затем на той же питательной среде с повышенным содержанием сахаразы (34 г/л) и фитогеля (7 г/л) на протяжении последующих 4 нед. В качестве регуляторов роста использовали АБК (15–60 мкмоль/л) и индолилмасляную кислоту (1 мкмоль/л). Культуры поддерживали при температуре 24 °С и круглосуточном освещении интенсивностью 0,2–0,4 клк.

Соматические эмбрионы на семядольной стадии отделяли и помещали для прорастания на питательные среды с половинным содержанием макроэлементов (½ LM, ½ LM – NH₄NO₃ и ½ MS). В части опытных вариантов они были модифицированы добавлением активированного угля (5 г/л) и глутамина (0,5 г/л). Культивирование осуществлялось при температуре 24 °С и круглосуточном освещении интенсивностью 0,5–2,0 клк. Продолжительность этапа составила 4 нед.

Таблица 1

Состав питательных сред для культивирования эмбрионной ткани
 и соматических зародышей ели европейской

Table 1

Composition of nutrient media for cultivation of embryogenic tissue
 and somatic embryos of Norway spruce

Компоненты	Концентрация в среде, мг/л				
	LM	½ LM	½ LM – NH ₄ NO ₃	MS	½ MS
NH ₄ NO ₃	1650	825	0	1650	825
KNO ₃	1900	950	950	1900	950
KH ₂ PO ₄	340	170	170	170	85
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1850	925	925	370	185
CaCl ₂ · 2H ₂ O	22	11	11	440	220
H ₃ BO ₃	31	31	31	6,2	6,2
MnSO ₄ · H ₂ O	21	21	21	16,9	16,9
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	43	43	43	10,6	10,6
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1,25	1,25	1,25	0,25	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,50	0,50	0,50	0,025	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,125	0,125	0,125	0,025	0,025
KI	4,15	4,15	4,15	0,83	0,83
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
Na ₂ EDTA	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3
Мезоинозитол	100	100	100	100	100
Никотиновая кислота	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Пиридоксин	0,1	0,1	0,1	0,5	0,5
Тиамин	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Статистическую обработку данных проводили с применением программных продуктов *Microsoft Excel* и *Statistica 10.0*. При представлении результатов в тексте статьи используются среднее значение и стандартное отклонение. Для определения статистической значимости различий между опытными группами были выбраны непараметрические методы анализа (критерий Краскела – Уоллиса для сравнения нескольких независимых серий результатов).

Результаты и их обсуждение

Всего было исследовано 34 опытных варианта. Следует отметить, что все применявшиеся питательные среды и их модификации обеспечили регенерацию микрорастений. Однако в ряде случаев наблюдались различия в интенсивности развития зародышевого побега и корня. Общая схема эксперимента, а также полученные усредненные количественные данные представлены в табл. 2.

Как следует из табл. 2, развитие соматических эмбрионидов наблюдалось во всех опытных вариантах. Главным образом происходил рост надземной части микрорастений, который характеризовался различной интенсивностью. Средние размеры побега после 30 сут прорастания составили от (0,6 ± 0,2) до (2,0 ± 0,4) см. Размеры зародышевого корешка в большинстве случаев изменялись в меньшей степени – от 0,1 до 1,0 см. В связи с этим можно предположить наличие дисбаланса в развитии соматических зародышей, возникновение которого может быть обусловлено, с одной стороны, условиями культивирования, с другой – физиологическим состоянием растительного материала. По этой причине при изучении воздействия факторов, связанных с химическими свойствами субстратов, а также при отборе наиболее подходящих составов питательных сред, помимо характеристик общей ростовой активности, учитывалась согласованность роста побега и корня у микрорастений.

Таблица 2

Морфометрические параметры микрорастений ели европейской,
полученных при прорастании соматических зародышей
(данные после 30 сут культивирования на питательных средах для прорастания)

Table 2

Morphometric parameters of Norway spruce microplants obtained by germination of somatic embryos
(data after 30 days of cultivation on nutrient media for germination)

Опытный вариант	Питательная среда на этапе прорастания	Исходное количество эмбрионов, шт.	Средние размеры гипокотыля, см	Средние размеры корня, см
<i>Концентрация АБК на этапе созревания 15 мкмоль/л</i>				
15-1-1	½ MS	20	0,7 ± 0,3 ^a	0,2 ± 0,1 ^b
15-1-2	½ MS + глутамин	10	0,9 ± 0,1 ^b	0,1 ± 0,0 ^a
15-1-3	½ MS + уголь	20	0,9 ± 0,5 ^b	0,2 ± 0,2 ^b
15-1-4	½ MS + глутамин + уголь	21	1,2 ± 0,4 ^{cc}	0,2 ± 0,2 ^b
15-2-1	½ LM	20	1,2 ± 0,4 ^{cc}	0,2 ± 0,2 ^b
15-2-2	½ LM + глутамин	17	1,0 ± 0,3 ^{bc}	0,2 ± 0,2 ^b
15-2-4	½ LM + глутамин + уголь	20	1,1 ± 0,5 ^{bc}	0,6 ± 0,4 ^{cf}
15-3-1	½ LM – NH ₄ NO ₃	40	0,9 ± 0,4 ^b	0,1 ± 0,1 ^a
15-3-2	½ LM – NH ₄ NO ₃ + глутамин	13	1,2 ± 0,2 ^{cc}	0,2 ± 0,2 ^b
15-3-3	½ LM – NH ₄ NO ₃ + уголь	32	1,1 ± 0,5 ^{bc}	0,4 ± 0,5 ^{de}
<i>Концентрация АБК на этапе созревания 30 мкмоль/л</i>				
30-1-1	½ MS	20	0,6 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
30-1-2	½ MS + глутамин	10	1,0 ± 0,2 ^{bc}	0,1 ± 0,0 ^a
30-1-3	½ MS + уголь	20	1,1 ± 0,6 ^{bc}	0,4 ± 0,4 ^{de}
30-1-4	½ MS + глутамин + уголь	21	1,3 ± 0,4 ^{cc}	0,5 ± 0,4 ^{de}
30-2-1	½ LM	26	1,0 ± 0,3 ^b	0,2 ± 0,2 ^b
30-2-2	½ LM + глутамин	26	1,1 ± 0,4 ^{cc}	0,3 ± 0,3 ^c
30-2-3	½ LM + уголь	10	1,8 ± 0,5 ^{cf}	1,0 ± 0,5 ^g
30-2-4	½ LM + глутамин + уголь	26	1,5 ± 0,6 ^{cf}	0,8 ± 0,5 ^{fg}
30-3-1	½ LM – NH ₄ NO ₃	37	0,8 ± 0,3 ^b	0,1 ± 0,0 ^a
30-3-2	½ LM – NH ₄ NO ₃ + глутамин	20	1,1 ± 0,5 ^{cc}	0,6 ± 0,6 ^{cf}
30-3-3	½ LM – NH ₄ NO ₃ + уголь	21	1,3 ± 0,4 ^{cc}	0,2 ± 0,2 ^b
30-3-4	½ LM – NH ₄ NO ₃ + глутамин + уголь	19	1,9 ± 0,4 ^{df}	0,7 ± 0,3 ^{ef}
<i>Концентрация АБК на этапе созревания 60 мкмоль/л</i>				
60-1-1	½ MS	20	0,6 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
60-1-2	½ MS + глутамин	9	0,8 ± 0,3 ^b	0,1 ± 0,0 ^b
60-1-3	½ MS + уголь	20	1,7 ± 0,7 ^{df}	0,3 ± 0,3 ^c
60-1-4	½ MS + глутамин + уголь	19	1,4 ± 0,4 ^{cf}	0,3 ± 0,2 ^c
60-2-1	½ LM	30	1,0 ± 0,4 ^{bc}	0,3 ± 0,3 ^c
60-2-2	½ LM + глутамин	25	1,2 ± 0,3 ^{cc}	0,3 ± 0,4 ^c
60-2-3	½ LM + уголь	11	1,7 ± 0,5 ^{df}	0,9 ± 0,9 ^g
60-2-4	½ LM + глутамин + уголь	27	1,6 ± 0,5 ^{df}	0,8 ± 0,5 ^{fg}

Опытный вариант	Питательная среда на этапе прорастания	Исходное количество эмбрионов, шт.	Средние размеры гипокотыля, см	Средние размеры корня, см
60-3-1	½ LM – NH ₄ NO ₃	23	0,8 ± 0,3 ^b	0,2 ± 0,1 ^b
60-3-2	½ LM – NH ₄ NO ₃ + глутамин	24	1,3 ± 0,3 ^{cc}	0,2 ± 0,1 ^b
60-3-3	½ LM – NH ₄ NO ₃ + уголь	10	1,6 ± 0,4 ^{cf}	0,1 ± 0,0 ^a
60-3-4	½ LM – NH ₄ NO ₃ + глутамин + уголь	11	2,0 ± 0,4 ^d	1,0 ± 1,2 ^g

Примечания: 1. Опытные варианты обозначены как N-K-M, где N – концентрация АБК на этапе созревания (15; 30; 60 мкмоль/л); K – органоминеральный состав питательной среды (1 – среда MS, 2 – среда LM, 3 – среда LM без добавления нитрата аммония); M – добавки в питательную среду (1 – отсутствие добавок, 2 – добавление глутамина, 3 – добавление активированного угля, 4 – добавление глутамина и активированного угля). 2. Буквенные индексы при численных значениях обозначают принадлежность к статистически однородным группам (каждой группе соответствует своя буква). Одинаковые буквенные индексы указывают на отсутствие статистически значимых различий.

В первую очередь было проведено сравнение данных опытных вариантов, различавшихся лишь концентрацией АБК в питательной среде для созревания эмбрионов. Полученные экспериментальные результаты позволяют провести 12 сопоставлений, из которых 10 сопоставлений включают по 3 опытные группы (15; 30; 60 мкмоль/л АБК). В большинстве случаев соответствующие средние размеры побега между экспериментальными группами статистически не отличались. В остальных сопоставлениях имеется тенденция к увеличению названного показателя с ростом концентрации фитогормона (серии опытных вариантов N-1-3, N-2-4 и N-3-3). Описанный тренд в большей степени прослеживается и для морфометрических характеристик корня: более крупные размеры органа имели микрорастения, культивировавшиеся на средах с концентрацией АБК 30 и 60 мкмоль/л. В целом количество индивидов с активно развивающейся подземной частью при указанных концентрациях было в 2,5–3,0 раза больше, чем при концентрации 15 мкмоль/л. Полученные результаты говорят о том, что все использовавшиеся в опыте концентрации АБК подходят для проведения этапа созревания эмбрионов. Однако содержание фитогормона на уровне 30 мкмоль/л является наиболее оптимальным, поскольку при данном его количестве уже наблюдается значительное увеличение доли нормально развивающихся микрорастений при сравнительно небольшом расходе дорогостоящего реактива.

Другой фактор, влияние которого можно оценить, основываясь на полученных экспериментальных данных, – это органоминеральный состав питательных сред. В опыте использовались среды MS и LM с половинной концентрацией макросолей. Один из вариантов выполнялся на среде со сниженным содержанием азота. Согласно литературным данным подобная модификация питательной среды позволяет стимулировать образование и рост корня [4]. Соответствующее сопоставление выполнялось для опытных вариантов, различавшихся лишь составом питательной среды для созревания эмбрионов. Полученные экспериментальные результаты позволяют провести 12 сопоставлений, из которых 10 сопоставлений включают по 3 опытные группы (½ MS, ½ LM и ½ LM – NH₄NO₃). Наименьшими средними морфологическими показателями характеризуется серия вариантов N-1-M (питательная среда ½ MS). Во всех сопоставлениях средние размеры побега в опытных группах, культивировавшихся на средах ½ LM и ½ LM – NH₄NO₃, имеют превышения по абсолютной величине, которые в 55 % случаев статистически значимы. Схожая тенденция наблюдается и для зародышевого корешка. Соответствующие превышения статистически значимы также в 55 % случаев. Сравнение опытных групп, культивировавшихся на питательных средах ½ LM и ½ LM – NH₄NO₃, между собой не выявило существенных различий в среднем размере побега. В то же время в 60 % случаев длина зародышевого корешка вариантов серии N-2-M (питательная среда ½ LM) имеет соответствующие статистически значимые превышения. Следовательно, снижение содержания азота в субстрате посредством удаления из него нитрата аммония не привело к желаемому эффекту (активизация роста корня) в условиях описываемого эксперимента. Таким образом, на основании опытных данных из применявшихся питательных сред для дальнейшего использования был выбран состав ½ LM как обеспечивающий наибольший выход микрорастений со сбалансированным развитием надземных и подземных органов.

Наиболее выраженное положительное влияние на рост и развитие микрорастений ели европейской оказало добавление в питательные среды глутамина и активированного угля. Названные вещества выбраны для использования в эксперименте на основе ряда литературных данных [16–23]. Для оценки влияния соответствующих добавок в питательные среды выполнены 9 сопоставлений опытных вариантов,

отличающихся только по этому фактору (отсутствие добавок, добавление глутамина, добавление активированного угля, добавление глутамина и активированного угля). Полученные результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты статистического сопоставления средних величин опытных (добавление глутамина и активированного угля в питательные среды) и контрольных (отсутствие добавок) вариантов

Table 3

Results of statistical comparison of average values of experimental (adding glutamine and activated charcoal to nutrient media) and control (without additives) variants

Состав среды, концентрация в ней АБК	Наличие статистически значимых превышений над средними значениями контрольных вариантов					
	Добавление глутамина		Добавление активированного угля		Добавление глутамина и активированного угля	
	Побег	Корень	Побег	Корень	Побег	Корень
½ MS, 15 мкмоль/л	+	–	+	–	+	–
½ MS, 30 мкмоль/л	+	–	+	+	+	+
½ MS, 60 мкмоль/л	+	–	+	+	+	+
½ LM, 15 мкмоль/л	–	–	Нет данных		–	+
½ LM, 30 мкмоль/л	+	+	+	+	+	+
½ LM, 60 мкмоль/л	–	–	+	+	+	+
½ LM – NH ₄ NO ₃ , 15 мкмоль/л	+	–	–	+	Нет данных	
½ LM – NH ₄ NO ₃ , 30 мкмоль/л	+	+	+	–	+	+
½ LM – NH ₄ NO ₃ , 60 мкмоль/л	+	–	+	–	+	+

Примечание. Знаком «плюс» обозначено наличие статистически значимых превышений над средними значениями контрольных вариантов, а знаком «минус» – их отсутствие.

Из табл. 3 следует, что в большинстве случаев как использование глутамина, так и применение активированного угля стимулировали рост побега микрорастений. Кроме того, добавление активированного угля положительно влияло на развитие зародышевого корешка. Таким образом, указанные вещества могут быть использованы для повышения эффективности прорастания эмбриоидов.

Сопоставление опытных групп, в которых добавлялся только глутамин или активированный уголь, между собой (серии вариантов N-K-2 и N-K-3) показало, что полученные во втором случае микрорастения имели несколько большие размеры побега (в 25 % сравнений имеются статистически значимые превышения) и корня (в 25 % сравнений имеются статистически значимые превышения). Для определения эффекта от совместного использования названных веществ был проведен анализ, результаты которого представлены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты статистического сопоставления средних величин опытных вариантов с совместным и раздельным использованием глутамина и активированного угля

Table 4

Results of statistical comparison of mean values of experimental variants with joint and separate use of glutamine and activated charcoal

Состав среды, концентрация в ней АБК	Наличие статистически значимых различий по отношению к средним значениям опытного варианта, в котором одновременно использовались глутамин и активированный уголь			
	Добавление глутамина		Добавление активированного угля	
	Побег	Корень	Побег	Корень
½ MS, 15 мкмоль/л	+	+	+	–
½ MS, 30 мкмоль/л	–	+	–	–
½ MS, 60 мкмоль/л	+	+	–	–

Состав среды, концентрация в ней АБК	Наличие статистически значимых различий по отношению к средним значениям опытного варианта, в котором одновременно использовались глутамин и активированный уголь			
	Добавление глутамина		Добавление активированного угля	
	Побег	Корень	Побег	Корень
½ LM, 15 мкмоль/л	–	+	Нет данных	
½ LM, 30 мкмоль/л	–	+	–	–
½ LM, 60 мкмоль/л	+	+	–	–
½ LM – NH ₄ NO ₃ , 15 мкмоль/л	Нет данных		Нет данных	
½ LM – NH ₄ NO ₃ , 30 мкмоль/л	+	–	+	+
½ LM – NH ₄ NO ₃ , 60 мкмоль/л	+	+	+	+

Примечание. Знаком «плюс» обозначено наличие превышений у варианта с совместным использованием глутамина и активированного угля, а знаком «минус» – отсутствие статистически значимых различий.

Как следует из табл. 4, во всех случаях при совместном использовании глутамина и активированного угля либо наблюдался ростостимулирующий эффект, либо статистически значимые различия отсутствовали. Следовательно, такой вариант применения этих веществ является наиболее предпочтительным для использования в дальнейшем. Схожие результаты описаны в работах [18; 23]. Предполагается, что положительное влияние глутамина связано с тем, что он оптимизирует азотное питание прорастающего эмбриоида. По-видимому, ростостимулирующий эффект активированного угля более выражен. Исходя из литературных данных [23], можно предположить, что подобное действие данного вещества связано с влиянием ряда факторов, таких как оптимизация осмотического питания микрорастений и адсорбция выделяющихся токсичных продуктов метаболизма проростков.

Заключение

Изучено влияние АБК в концентрациях 15; 30 и 60 мкмоль/л при созревании эмбриоидов и состава питательных сред при их прорастании на формирование полноценных микрорастений.

Установлено, что оптимальная концентрация АБК в питательной среде при созревании эмбриоидов составляет 30 мкмоль/л. При данном количестве фитогормона наблюдается значительное увеличение доли нормально развивающихся микрорастений при сравнительно небольшом расходе дорогостоящего реактива.

Исследование процессов прорастания соматических эмбриоидов ели европейской на различных питательных средах показало, что все использовавшиеся в опыте варианты подходят для проведения данного этапа. Однако наиболее оптимальной является питательная среда ½ LM с добавлением активированного угля (5 г/л) и глутамина (0,5 г/л).

Библиографические ссылки

1. Egertsdotter U. Plant physiological and genetical aspects of the somatic embryogenesis process in conifers. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 2019;34(5):360–369. DOI: 10.1080/02827581.2018.1441433.
2. Park YS. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Annals of Forest Science*. 2002;59(5–6):651–656. DOI: 10.1051/forest:2002051.
3. Fraga HPDF, Moraes PEC, Vieira LDN, Guerra MP. Somatic embryogenesis in conifers: one clade to rule them all? *Plants*. 2023; 12(14):2648. DOI: 10.3390/plants12142648.
4. Tikkinen M, Varis S, Peltola H, Aronen T. Improved germination conditions for Norway spruce somatic cotyledonary embryos increased survival and height growth of emblings. *Trees*. 2018;32:1489–1504. DOI: 10.1007/s00468-018-1728-6.
5. Hazubska-Przybył T, Wawrzyniak MK, Kijowska-Oberc J, Staszak AM, Ratajczak E. Somatic embryogenesis of Norway spruce and Scots pine: possibility of application in modern forestry. *Forests*. 2022;13(2):155. DOI: 10.3390/f13020155.
6. Кусенкова МП. Прорастание соматических эмбриоидов ели европейской, полученных при различной продолжительности культивирования эмбриогенного каллуса на питательных средах для созревания. *Проблемы лесоведения и лесоводства*. 2021; 81:169–177.
7. Кусенкова МП, Падутов ВЕ. Клональная изменчивость как фактор, определяющий протекание процессов созревания и прорастания соматических эмбриоидов ели европейской. *Проблемы лесоведения и лесоводства*. 2022;82:48–57.
8. Varis S. Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. In: Jain S, Gupta P, editors. *Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants*. Cham: Springer; 2018. p. 255–267 (Forestry sciences; volume 84). DOI: 10.1007/978-3-319-89483-6_19.
9. Bojarczuk K, Hazubska-Przybył T, Szczygiel K. Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of the genera *Picea*, *Abies* and *Larix*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2007;76(1):7–15. DOI: 10.5586/asbp.2007.001.

10. Högberg K-A, Bozhkov PV, Grönroos R, von Arnold S. Critical factors affecting *ex vitro* performance of somatic embryo plants of *Picea abies*. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 2001;16(4):295–304. DOI: 10.1080/02827580116772.
11. Lu CY, Harry IS, Thompson MR, Thorpe TA. Plantlet regeneration from cultured embryos and seedling parts of red spruce (*Picea rubens* Sarg.). *Botanical gazette*. 1991;152(1):42–50. DOI: 10.1086/337861.
12. Attree SM, Tautorius TE, Dunstan DI, Fowke LC. Somatic embryo maturation, germination, and soil establishment of plants of black and white spruce (*Picea mariana* and *Picea glauca*). *Canadian Journal of Botany*. 1990;68(12):2583–2589. DOI: 10.1139/b90-326.
13. Hazubska-Przybył T, Bojarczuk K. Somatic embryogenesis of selected spruce species (*Picea abies*, *P. omorika*, *P. pungens* ‘Glauca’ and *P. breweriana*). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2008;77(3):189–199. DOI: 10.5586/asbp.2008.023.
14. Tikkinen M, Varis S, Aronen T. Development of somatic embryo maturation and growing techniques of Norway spruce embryos towards large-scale field testing. *Forests*. 2018;9(6):325. DOI: 10.3390/f9060325.
15. Timmis R. Bioprocessing for tree production in the forest industry: conifer somatic embryogenesis. *Biotechnology Progress*. 1998;14(1):156–166. DOI: 10.1021/bp970143y.
16. Carlsson J, Egertsdotter U, Ganeteg U, Svennerstam H. Nitrogen utilization during germination of somatic embryos of Norway spruce: revealing the importance of supplied glutamine for nitrogen metabolism. *Trees*. 2019;33:383–394. DOI: 10.1007/s00468-018-1784-y.
17. Llebrés MT, Avila C, Cánovas FM, Klimaszewska K. Root growth of somatic plants of hybrid *Pinus strobus* (L.) and *P. wallichiana* (A. B. Jacks.) is affected by the nitrogen composition of the somatic embryo germination medium. *Trees*. 2018;32:371–381. DOI: 10.1007/s00468-017-1635-2.
18. Dahrendorf J, Clapham D, Egertsdotter U. Analysis of nitrogen utilization capability during the proliferation and maturation phases of Norway spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.) somatic embryogenesis. *Forests*. 2018;9(6):288. DOI: 10.3390/f9060288.
19. Bozhkov PV, Mikhlin SB, Shiryaeva GA, Lebedenko LA. Influence of nitrogen balance of culture medium on Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] somatic polyembryogenesis: high frequency establishment of embryonal-suspensor mass lines from mature zygotic embryos. *Journal of Plant Physiology*. 1993;142(6):735–741. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)80911-9.
20. Barrett JD, Park YS, Bonga JM. The effectiveness of various nitrogen sources in white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 1997;16:411–415. DOI: 10.1007/bf01146784.
21. Митрофанова ИВ. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2009;41(6):496–508.
22. Klimaszewska K, Hargreaves C, Lelu-Walter MA, Trontin J-F. Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. In: Germana M, Lambardi M, editors. *In vitro embryogenesis in higher plants*. New York: Humana Press; 2016. p. 131–166 (Methods in molecular biology; volume 1359). DOI: 10.1007/978-1-4939-3061-6_7.
23. Thomas TD. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*. 2008;26(6):618–631. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.08.003.

References

1. Egertsdotter U. Plant physiological and genetical aspects of the somatic embryogenesis process in conifers. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 2019;34(5):360–369. DOI: 10.1080/02827581.2018.1441433.
2. Park YS. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Annals of Forest Science*. 2002;59(5–6):651–656. DOI: 10.1051/forest:2002051.
3. Fraga HPDF, Moraes PEC, Vieira LDN, Guerra MP. Somatic embryogenesis in conifers: one clade to rule them all? *Plants*. 2023;12(14):2648. DOI: 10.3390/plants12142648.
4. Tikkinen M, Varis S, Peltola H, Aronen T. Improved germination conditions for Norway spruce somatic cotyledonary embryos increased survival and height growth of emblings. *Trees*. 2018;32:1489–1504. DOI: 10.1007/s00468-018-1728-6.
5. Hazubska-Przybył T, Wawrzyniak MK, Kijowska-Oberc J, Staszak AM, Ratajczak E. Somatic embryogenesis of Norway spruce and Scots pine: possibility of application in modern forestry. *Forests*. 2022;13(2):155. DOI: 10.3390/f13020155.
6. Kusenkova MP. Germination of Norway spruce somatic embryoids obtained at different duration of cultivation of embryogenic callus on nutrient media for maturation stage. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva*. 2021;81:169–177. Russian.
7. Kusenkova MP, Padutov VE. Clonal variability as a factor determining the processes of maturation and germination of somatic embryoids of European spruce. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva*. 2022;82:48–57. Russian.
8. Varis S. Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. In: Jain S, Gupta P. editors. *Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants*. Cham: Springer; 2018. p. 255–267 (Forestry sciences; volume 84). DOI: 10.1007/978-3-319-89483-6_19.
9. Bojarczuk K, Hazubska-Przybył T, Szczygiel K. Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of the genera *Picea*, *Abies* and *Larix*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2007;76(1):7–15. DOI: 10.5586/asbp.2007.001.
10. Högberg K-A, Bozhkov PV, Grönroos R, von Arnold S. Critical factors affecting *ex vitro* performance of somatic embryo plants of *Picea abies*. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 2001;16(4):295–304. DOI: 10.1080/02827580116772.
11. Lu CY, Harry IS, Thompson MR, Thorpe TA. Plantlet regeneration from cultured embryos and seedling parts of red spruce (*Picea rubens* Sarg.). *Botanical gazette*. 1991;152(1):42–50. DOI: 10.1086/337861.
12. Attree SM, Tautorius TE, Dunstan DI, Fowke LC. Somatic embryo maturation, germination, and soil establishment of plants of black and white spruce (*Picea mariana* and *Picea glauca*). *Canadian Journal of Botany*. 1990;68(12):2583–2589. DOI: 10.1139/b90-326.
13. Hazubska-Przybył T, Bojarczuk K. Somatic embryogenesis of selected spruce species (*Picea abies*, *P. omorika*, *P. pungens* ‘Glauca’ and *P. breweriana*). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2008;77(3):189–199. DOI: 10.5586/asbp.2008.023.
14. Tikkinen M, Varis S, Aronen T. Development of somatic embryo maturation and growing techniques of Norway spruce embryos towards large-scale field testing. *Forests*. 2018;9(6):325. DOI: 10.3390/f9060325.
15. Timmis R. Bioprocessing for tree production in the forest industry: conifer somatic embryogenesis. *Biotechnology Progress*. 1998;14(1):156–166. DOI: 10.1021/bp970143y.
16. Carlsson J, Egertsdotter U, Ganeteg U, Svennerstam H. Nitrogen utilization during germination of somatic embryos of Norway spruce: revealing the importance of supplied glutamine for nitrogen metabolism. *Trees*. 2019;33:383–394. DOI: 10.1007/s00468-018-1784-y.

17. Llebrés MT, Avila C, Cánovas FM, Klimaszewska K. Root growth of somatic plants of hybrid *Pinus strobus* (L.) and *P. wallichiana* (A. B. Jacks.) is affected by the nitrogen composition of the somatic embryo germination medium. *Trees*. 2018;32:371–381. DOI: 10.1007/s00468-017-1635-2.

18. Dahrendorf J, Clapham D, Egertsdotter U. Analysis of nitrogen utilization capability during the proliferation and maturation phases of Norway spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.) somatic embryogenesis. *Forests*. 2018;9(6):288. DOI: 10.3390/f9060288.

19. Bozhkov PV, Mikhlina SB, Shiryayeva GA, Lebedenko LA. Influence of nitrogen balance of culture medium on Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] somatic polyembryogenesis: high frequency establishment of embryonal-suspensor mass lines from mature zygotic embryos. *Journal of Plant Physiology*. 1993;142(6):735–741. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)80911-9.

20. Barrett JD, Park YS, Bonga JM. The effectiveness of various nitrogen sources in white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 1997;16:411–415. DOI: 10.1007/bf01146784.

21. Mitrofanova IV. Somatic embryogenesis as an *in vitro* system of cultivated plants propagation. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii*. 2009;41(6):500–508. Russian.

22. Klimaszewska K, Hargreaves C, Lelu-Walter MA, Trontin J-F. Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. In: Germana M, Lambardi M, editors. *In vitro embryogenesis in higher plants*. New York: Humana Press; 2016. p. 131–166 (Methods in molecular biology; volume 1359). DOI: 10.1007/978-1-4939-3061-6_7.

23. Thomas TD. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*. 2008;26(6):618–631. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.08.003.

Получена 15.08.2023 / исправлена 08.09.2023 / принята 08.09.2023.
Received 15.08.2023 / revised 08.09.2023 / accepted 08.09.2023.