

УДК 581.1

## Соматический эмбриогенез и растительная регенерация маньчжурского ясеня (*Fraxinus mandshurica* Rupr.)

© 2018 Л. ЯН<sup>1,2,3</sup>, Ц. ВАН<sup>1</sup>, Е.С СУХАНОВА<sup>3</sup>, Х.Л. ШЕН<sup>1</sup>, А.М. НОСОВ<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Северо-Восточный университет лесного хозяйства, лесной факультет, центральная государственная лаборатория генетики и селекции лесного хозяйства, Харбин, 150040, КНР

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119899

<sup>3</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, 127276

e-mail: al\_nosov@mail.ru\*

Поступила 18.12.2017 г.

Принята в печать 26.12.2017 г.

Исследовано влияние условий и срока культивирования на эффективность соматического эмбриогенеза и последующего постэмбрионального развития соматических зародышей ясеня маньчжурского (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) в растения-регенеранты. Для индукции образования соматических зародышей, проводимого путем прямого и непрямого эмбриогенеза, применяли питательную среду MS½ с добавлением 0,05 мг/л НУК, 400 мг/л гидролизата казеина, 25 г/л сахарозы, 6,0 г/л агар-агара. В качестве эксплантов использовали семядоли зрелых зиготических зародышей. Показано, что способность к размножению соматических зародышей, полученных в результате прямого эмбриогенеза из клеток семядолей, зависела от морфологических характеристик семядолей. Оценка эффективности регенерации на 30-е сутки субкультивирования показала, что наибольшее количество соматических зародышей, достигших семядольной стадии развития, и максимальное значение коэффициента размножения были получены для соматических зародышей белого цвета длиной 4 мм. Установлено, что эмбриогенный каллус сохраняет способность к образованию соматических зародышей в течение 8 мес. С увеличением возраста каллуса возрастало общее количество соматических зародышей, но при этом уменьшалась доля зародышей, находящихся на поздних стадиях развития (стадии торпеды и семядолей). Среди зародышей, полученных из каллуса на 30-е сутки субкультивирования (среда MS½ с добавлением 0,2 мг/л БАП, 20 г/л сахарозы, 200 мг/л гидролизата казеина и 6 г/л агара), наиболее активно прорастали соматические зародыши белого цвета длиной 4–8 мм (52% от общего числа). Такие же зародыши (белые, длиной 4–8 мм), но полученные из каллуса возрастом 240 сут, развивались в проростки лишь в 18% случаев. Таким образом, способность к прорастанию соматических зародышей одного типа зависит от возраста каллуса. Установлено, что происхождение полученных проростков не влияло на частоту формирования из них растений. В течение двух месяцев роста в почвенной культуре высота более 90% растений-регенерантов достигала 8–10 см. Полученные результаты являются основой для создания технологии крупномасштабного размножения и промышленного производства высококачественного зародышевого материала маньчжурского ясеня.

**Ключевые слова:** маньчжурский ясень, соматический зародыш, соматический эмбриогенез, регенерация растений.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-1-52-61

*Список сокращений:* АЗ – аномально развитый соматический зародыш; БАП – 6-бензиламинопурин; МТД – многократный тест-диапазон; НУК – альфа-нафтилукусная кислота; СЗ – соматический зародыш; СЗ-R1 – соматический зародыш, полученный путем прямого эмбриогенеза из клеток семядолей зиготического зародыша; СЗ-R2 – соматические зародыши, полученные путем прямого эмбриогенеза из СЗ-R1; СЗ-К – соматические зародыши, полученные путем непрямого эмбриогенеза из каллуса; среда MS – среда Мурасиге–Скуга; среда MS½ – среда с половинной концентрацией компонентов питательной среды MS; ЭК – эмбриогенный каллус.

Маньчжурский ясень (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) – это двудомное ветроопыляемое широколистное древесное растение, произрастающее в диком виде в северо-восточных районах Китая, Южной Кореи, Японии и на российском Дальнем Востоке [1]. Маньчжурский ясень является важной составляющей экосистемы лесов умеренно холодного климата [2–4]. Хозяйственное значение растения определяется его декоративными свойствами; также оно используется как источник ценной древесины [5].

В настоящее время для размножения и селекции маньчжурского ясеня применяют как традиционные, так и биотехнологические методы, которые позволяют наиболее полно реализовать потенциал размножения данного растительного организма [6]. Современные биотехнологии размножения и создания новых форм растений с использованием методов клеточной и генной инженерии основаны на естественно присущей клеткам растений тотипотентности и способности к регенерации, т.е. восстановлению целого организма из его части [6].

Полученный до настоящего времени обширный экспериментальный материал свидетельствует, что в культуре *in vitro* регенерация осуществляется путем эмбриогенеза, который принято называть соматическим эмбриогенезом и подразделять на прямой и непрямой в зависимости от того, какие клетки служат источником новообразования соматических зародышей: дифференцированные клетки первичного экспланта (прямой эмбриогенез) или каллусные клетки, поддерживаемые в культуре *in vitro* (непрямой эмбриогенез) [7–14]. Известно, что эти пути регенерации соматических зародышей характеризуются различным уровнем генетической стабильности размножаемых растений, коэффициента размножения и воспроизводимости результатов [15].

В работах [1, 16] были определены условия культивирования зиготических зародышей маньчжурского ясеня, при которых новообразование соматических зародышей осуществлялось путем прямого эмбриогенеза. Было отмечено, что разработанная методика имеет ряд недостатков, таких как невысокий коэффициент размножения и значительное количество соматических зародышей с морфологическими аномалиями, не способных к развитию в целое растение [5, 16].

Одним из способов повышения эффективности эмбриогенеза может быть разработка метода непрямого соматического эмбриогенеза, т.е. ис-

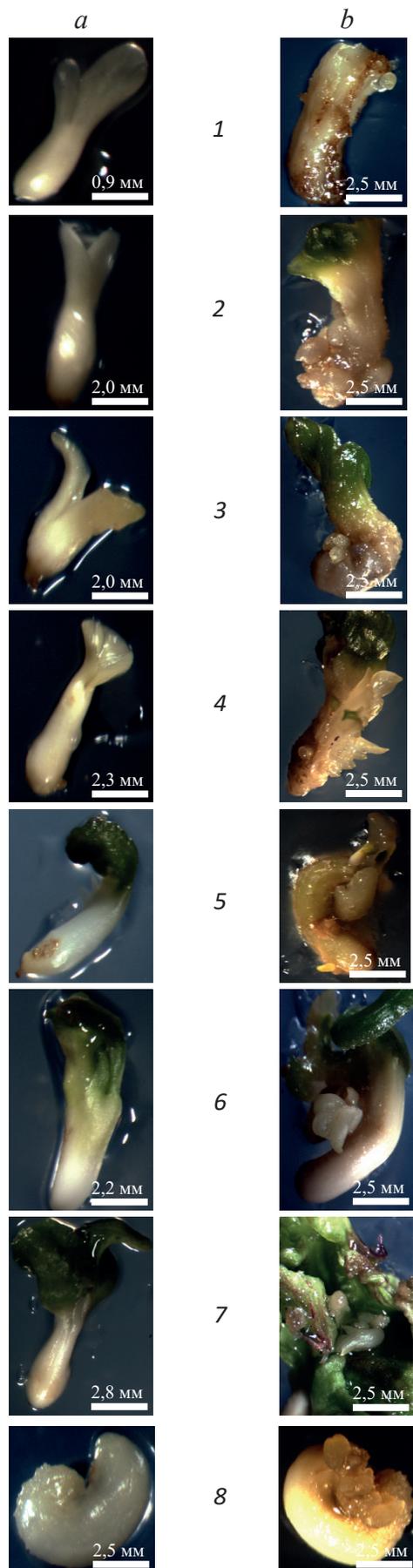
пользование в качестве эксплантов соматических зародышей, полученных в культуре *in vitro* – каллусной ткани [17–21].

Целью настоящего исследования была разработка эффективной, надежно воспроизводимой технологии регенерации из клеток каллусной ткани качественных, т.е. способных к полноценному постэмбриональному развитию, соматических зародышей маньчжурского ясеня.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Регенерация соматических зародышей путем прямого эмбриогенеза

Зрелые зиготические зародыши маньчжурского ясеня выделяли из крылаток с коричневой кожурой, которые были собраны с 10 взрослых здоровых материнских 50-летних деревьев на территории Северо-Восточного университета лесного хозяйства (Харбин, Китай) в середине октября 2012 г. После снятия кожуры семени выдерживали в проточной воде в течение двух дней, после чего стерилизовали 1 мин в 70%-ном этиловом спирте (спирт ректифицированный «Люкс», Россия) при постоянном перемешивании, а затем 15 мин в 5%-ном растворе NaClO (Merck, Германия). Семени промывали стерильной дистиллированной водой и затем в стерильных условиях выделяли из них зародыши. Отделенные от зародыша семядоли (10 шт.) помещали в чашки Петри (в пяти повторностях) таким образом, чтобы поверхность семядолей, обращенная к меристеме, контактировала со средой MS<sup>1/2</sup> следующего состава, мг/л: НУК – 5; БАП (фитогормоны производства Sigma-Aldrich China Shanghai Co., Ltd.) – 2; гидролизат казеина (Merck) – 400; сахароза (Merck) – 75 г/л и порошкообразный агар (Merck) – 6,5 г/л, pH 5,8 (среда И) [16]. Образцы культивировали в темноте при температуре 23–25 °С в течение двух циклов субкультивирования продолжительностью 30 сут каждый. На 60-е сутки семядоли, на которых возникали СЗ и ЭК, переносили на среду MS<sup>1/2</sup> с 0,05 мг/л НУК, 400 мг/л гидролизата казеина, 25 г/л сахарозы, 6 г/л агар-агара, pH 5,8 (среда II) и культивировали при 16-часовом световом дне (интенсивность света 40 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с)), температуре 23–25 °С и влажности воздуха 60–70%. На 30-е сутки под микроскопом Olympus SZX7-3732 (Olympus, Япония) из эксплантов выделяли соматические зародыши (СЗ-R1) и ЭК, которые поддерживали в тех же условиях (цикл субкультивирования составлял 30 сут).



Выделенные СЗ-Р1 разделяли с учетом их морфологии, длины и цвета на восемь классов: 1, 2, 3, 4-й классы – единичные СЗ-Р1 белого цвета длиной 2 мм, 3 мм, 4 мм и 5 мм, соответственно; 5, 6, 7-й классы – единичные СЗ-Р1 зеленого цвета длиной 3 мм, 5 мм и 7 мм, соответственно; 8-й класс – единичные anomalно развитые соматические зародыши (АЗ) (рис. 1). СЗ-Р1 каждого класса в количестве 30 шт. помещали в чашки Петри (в трех повторностях) и культивировали на среде П при 16-часовом световом дне (интенсивность освещения 40 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с)), температуре 23–25 °С и влажности воздуха 60–70%.

На 30-е сутки субкультивирования проводили оценку эффективности соматического эмбриогенеза, подсчитывая в каждой чашке Петри под микроскопом число образовавшихся СЗ-Р2, измеряя их длину и ширину и разделяя их по стадиям развития: глобулярные, сердцевидные, торпедовидные и соматические зародыши со сформированными семядолями.

#### Регенерация соматических зародышей путем непрямого эмбриогенеза

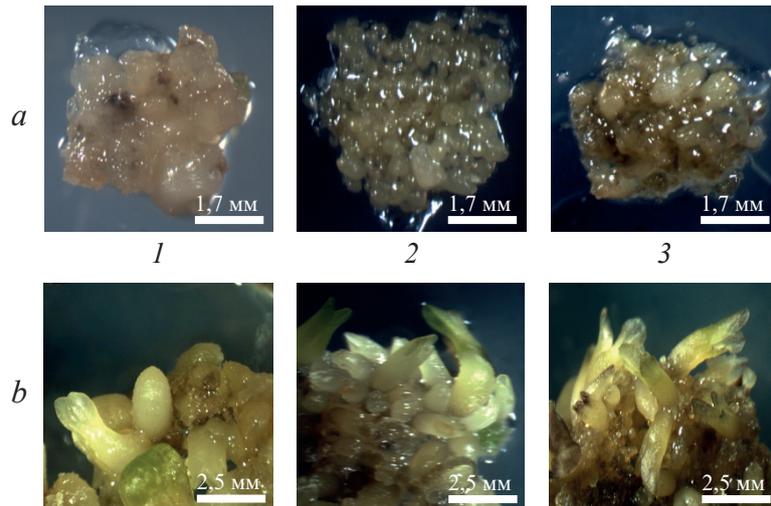
Возникший на семядолях ЭК размером 0,5 мм помещали в чашки Петри по 30 шт. (в трех повторностях) и выращивали на среде П в течение 6 мес. (рис. 2а). Цикл субкультивирования составлял 30 сут при общей длительности выращивания до 180 сут. Оценка эффективности соматического эмбриогенеза (см. рис. 2б) проводили на 30-е, 120-е и 180-е сутки описанным выше методом.

#### Регенерация растений из соматических зародышей

После первого субкультивирования на среде П на 30-е сутки под микроскопом из ЭК выделяли соматические зародыши (СЗ-К) с морфологически оформленными семядолями и разделяли их на шесть классов: 1, 2, 3-й классы – СЗ-К белого цвета длиной 2,5–4 мм, 5–6 мм и 7–8 мм, соответственно; 4, 5, 6-й классы – СЗ-К зеленого цвета длиной 2,5–8 мм, 9–12 мм, 13–16 мм, соответственно (рис. 3а).

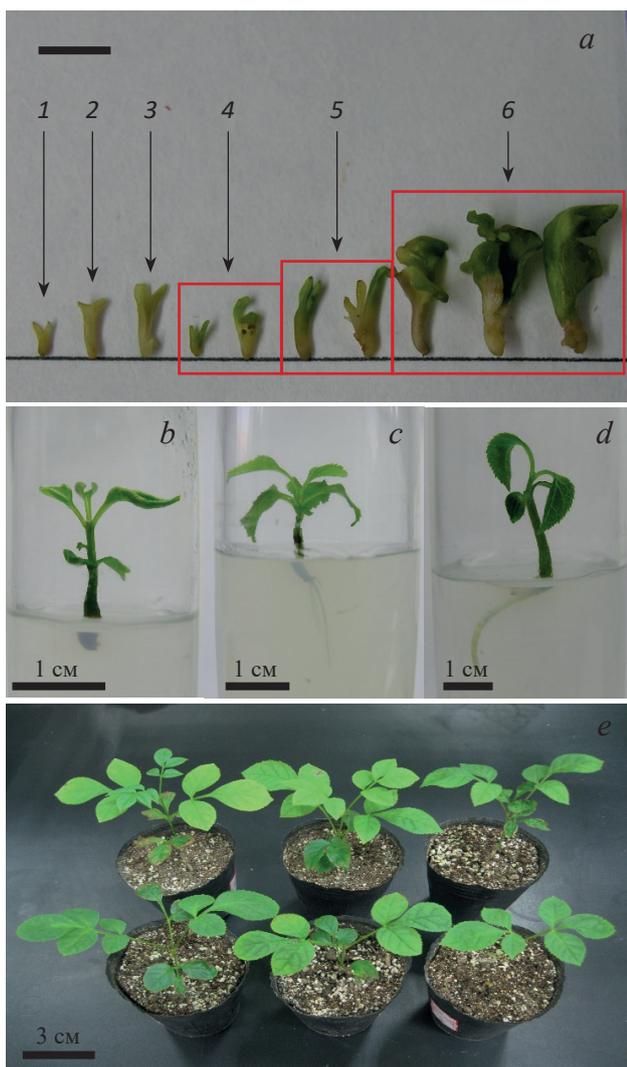
**Рис. 1.** Регенерация СЗ-Р2 маньчжурского ясеня путем прямого эмбриогенеза: а – СЗ-Р1; б – СЗ-Р2, образованные на СЗ-Р1 (30-е сутки субкультивирования). 1–8 – классы СЗ-Р1 (см. текст)

**Fig. 1.** Regeneration of Manchurian ash SE-R2 by direct embryogenesis: (a), SE-R1; and (b), SE-R2 newly formed on SE-R1 (30<sup>th</sup> day of subculturing). (1)–(8), SE-R1 classes (see text)



**Рис.2.** Регенерация соматических зародышей маньчжурского ясеня путем непрямого эмбриогенеза: *a* – каллус (ЭК); *b* – регенерация СЗ-К. 1–3 – продолжительность выращивания соответственно 30, 120, 180 сут

**Fig. 2.** Regeneration of Manchurian ash somatic embryos by indirect embryogenesis: (*a*), callus (CE); and (*b*), regeneration of SE-C. (1)–(3), time of culturing 30 days, 120 and 180 days, respectively



СЗ-К каждого класса помещали в пробирку со средой MS½, содержащей 0,2 мг/л БАП, 200 мг/л гидролизата казеина, 20 г/л сахарозы и 6 г/л агара (среда Р). Для каждого класса проводили эксперимент в трех повторностях по 30 экземпляров СЗ-К в каждой. Рост СЗ-К оценивали на 30-е сутки путем подсчета количества СЗ-К с зародышевым корнем и увеличенными в размере зелеными семядолями.

Отобранные по этим критериям, СЗ-К разделяли на две группы: СЗ-К с зародышевым корнем длиной 1–2 см и СЗ-К с зачаточным корнем (см. рис. 3*b* и 3*c*). Первую группу пересаживали на среду MS½, содержащую 20 мг/л сахарозы и 6 г/л агара, для формирования корневой системы. СЗ-К второй группы сначала культивировали в течение

**Рис. 3.** Развитие СЗ-К маньчжурского ясеня в проростки. *a* – СЗ-К, используемые в качестве исходного материала для получения проростков: 1–6 – классы СЗ-К (см. текст); *b*, *c* – проростки на 30-й день культивирования на среде Р с зачаточным корнем и с корнем длиной 1–2 см, соответственно; *d* – проросток на 30-й день культивирования на среде Y; *e* – растения-регенеранты на 60-й день после пересадки в почву

**Fig. 3.** Development of Manchurian ash sprouts from SE-C. (*a*), SE-C used as material for sprout obtaining: (1)–(6), SE-C classes (see text); (*b*) and (*c*), sprouts on the 30<sup>th</sup> day of culturing on P medium with rudimentary root and 1–2 cm long root, respectively; (*d*), sprout on the 30<sup>th</sup> day of culturing on Y medium; (*e*), plant regenerants on the 60<sup>th</sup> day after transplantation in soil

30 дней на среде Y ( $MS\frac{1}{2}$  + НУК, 0,01 мг/л) для стимуляции роста корня. В конце цикла субкультивирования второй группы подсчитывали количество СЗ-К с корнем длиной 1–2 см и затем переносили их на среду  $MS\frac{1}{2}$ . Способ переноса и условия адаптации СЗ-К в почвенной культуре были описаны ранее [16].

### Влияние возраста ЭК на качество СЗ-К

В течение 8 мес культивирования ЭК на среде П в конце каждого из восьми циклов субкультивирования продолжительностью 30 сут из него получали СЗ-К белого цвета длиной 4–8 мм с морфологически оформленными семядолями. Каждый СЗ-К переносили в пробирку со средой Р (три повторности по 30 экз.) и на 30-е сутки отбирали и подсчитывали СЗ-К, сформировавшиеся

из ЭК, с зелеными семядолями и зачаточным корнем или корнем длиной 1–2 см. Стимуляцию корнеобразования и получение целых растений проводили по описанной выше методике.

### Статистическая обработка данных

Для анализа полученных результатов использовали метод вариации ANOVA. При среднем значении на уровне  $P=0,05$  или  $P=0,01$  были проведены многократные тесты диапазона Дункана (МТД). Показатели в процентном выражении перед анализом подвергли синус-преобразованию. Анализ вариации ANOVA и использование МТД были проведены с применением программы SPSS17.0.

Для характеристики соматического эмбриогенеза использовали следующие коэффициенты ( $K$ ):

$K$ новообразований СЗ, %	– число эксплантов (СЗ-R1 или ЭК размером 0,5 мм) с образованием соматических зародышей $\times 100$ / общее число эксплантов;
$K$ размножения СЗ	– число просчитанных СЗ / общее число эксплантов (СЗ-R1 или ЭК размером 0,5 мм);
$K$ образования ЭК, %	– число СЗ-R1 с образованием каллуса $\times 100$ / общее число СЗ-R1;
$K$ гибели эксплантов, %	– число эксплантов (СЗ-R1 или ЭК размером 0,5 мм) с очевидными признаками некроза $\times 100$ / общее число эксплантов;
$K$ синхронизации СЗ, %	– число глобулярных СЗ (сердцевидных / торпедовидных / с семядолями) $\times 100$ / общее число соматических зародышей;
$K$ аномальности АЗ, %	– число аномальных соматических зародышей $\times 100$ / общее число соматических зародышей на поздних стадиях развития;
$K$ прорастания СЗ, %	– число проростков с зачаточным корнем или корнем длиной 1–2 см $\times 100$ / общее число СЗ-R2 с морфологически оформленными семядолями;
$K$ укоренения СЗ, %	– число проростков с корнем длиной 1 – 2 см $\times 100$ / общее число отобранных СЗ –R2 с зачаточным корнем;
$K$ выживаемости растений-регенерантов, %	– число растений-регенерантов $\times 100$ / общее число проростков с корнем.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Регенерация соматических зародышей путем прямого эмбриогенеза

Образование СЗ-R2 из всех исследуемых классов СЗ-R1 (рис. 1б, 1–8) происходило на гипокотиле (44%), зародышевом корне (40%) или семядолях (16%). При этом была отмечена следующая закономерность: чем меньше длина СЗ-R1, тем чаще СЗ-R2 возникали в его корневой области, а чем длиннее СЗ-R1, тем чаще образование СЗ-R2 происходило в области гипокотыля.

Одновременно на тех же органах СЗ-R1 формировался каллус. Однако, как правило, СЗ-R2 и

каллус были локализованы в разных областях одного и того же органа СЗ-R1.

Доля СЗ-R1, на которых происходило образование СЗ-R2 ( $K$  новообразований), изменялась от 20% до 43% в зависимости от морфологии (табл. 1).

Максимальное значение этой характеристики наблюдали у СЗ-R1 3-го и 8-го классов. Однако СЗ-R2 с аномальной морфологией ( $K$  аномальности АЗ), такой, как отсутствие, срастание или увеличение числа семядолей, встречались чаще у соматических зародышей, полученных на СЗ-R1 8-го класса (41%), чем на СЗ-R1 3-го класса (19%). Отмечено, что новообразование АЗ

## Эффективность регенерации СЗ-R2 маньчжурского ясеня из СЗ-R1 путем прямого эмбриогенеза

## Efficiency of Manchurian ash SE-R2 regeneration from SE-R1 by direct embryogenesis

Класс СЗ-R1	Морфология СЗ-R1		К новообразований СЗ, %	К размножения СЗ, %	К образования ЭК, %	К смертности СЗ, %	К аномальности АЗ, %
	Вид	Длина, мм					
1	Белый	2	26,7±4,7 <sup>bc</sup>	3,4±1,4	48,3±11,8 <sup>bc</sup>	1,7±0,4 <sup>b</sup>	7,1±3,6
2		3	28,8±1,7 <sup>bc</sup>	2,7±0,1	47,2±22,8 <sup>bc</sup>	0 <sup>b</sup>	15,3±4,0
3		4	43,0±5,2 <sup>a</sup>	2,9±0,3	61,8±11,6 <sup>abc</sup>	1,7±0,7 <sup>b</sup>	19,1±12,4
4		5	20,0±4,7 <sup>c</sup>	4,8±1,1	78,3±7,1 <sup>ab</sup>	0 <sup>b</sup>	11,9±4,9
5	Зеленый	3	37,9±3,0 <sup>ab</sup>	5,0±3,7	34,5±1,7 <sup>c</sup>	27,8±5,4 <sup>a</sup>	48,2±49,7
6		5	24,0±3,7 <sup>c</sup>	2,3±0,4	47,9±17,2 <sup>bc</sup>	0 <sup>b</sup>	31,7±2,4
7		7	23,4±7,4 <sup>c</sup>	2,3±1,8	72,1±0,9 <sup>ab</sup>	0 <sup>b</sup>	46,4±5,0
8	Аномальный	3–7	41,4±2,0 <sup>a</sup>	2,6±0,4	86,0±10,4 <sup>a</sup>	3,6±1,1 <sup>b</sup>	40,8±17,2

<sup>a-c</sup> Показатели значимости различий при многогранном тесте Дункана при  $P = 0,05$  (здесь и в табл. 2).

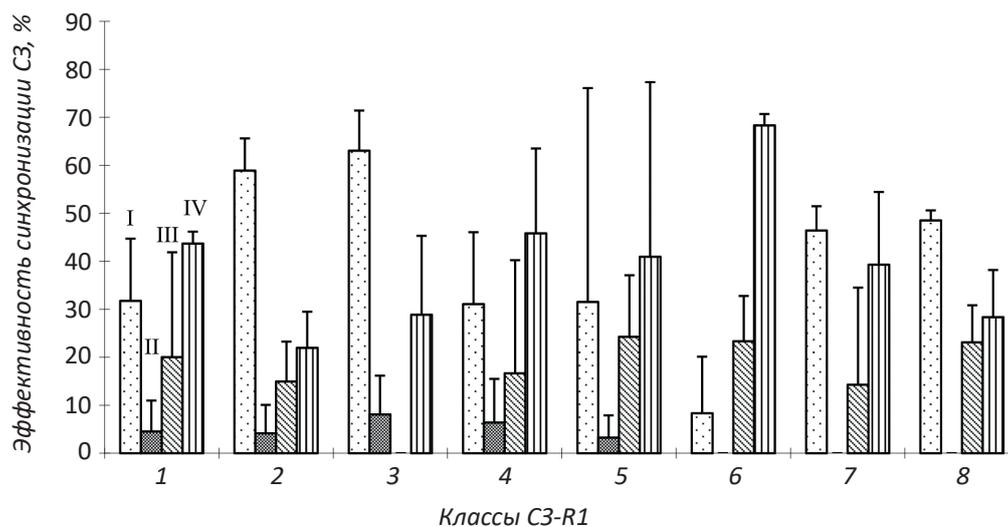
<sup>a-c</sup> Indices of significant differences at  $P = 0.05$  using Duncan's multiple range test (here and in Table 2).

происходило в 2 раза реже на СЗ-R1 белого цвета (1–4-й классы), чем на СЗ-R1 зеленого цвета и аномального вида (5–8-й классы). Все анализируемые СЗ-R1 характеризовались невысоким коэффициентом размножения – 2,3–5,0.

Образование каллуса происходило на СЗ-R1 всех классов. При этом чем длиннее был СЗ-R1, тем выше была интенсивность каллусообразования. Максимальную интенсивность каллусообразования ( $K$  образования ЭК = 86%) наблюдали у СЗ-R1 8-го класса.

На рис. 4 показаны результаты анализа качественного состава популяций СЗ-R2, образовавшихся на СЗ-R1 восьми классов.

В большинстве популяций СЗ-R2 присутствовали зародыши, находящиеся на глобулярной, сердцевидной, торпедовидной и семядольной стадиях развития. Независимо от класса СЗ-R1 средний размер СЗ-R2 на указанных стадиях развития был равен  $0,35 \times 0,35$  мм<sup>2</sup>,  $0,37 \times 0,32$  мм<sup>2</sup>,  $0,82 \times 0,54$  мм<sup>2</sup>,  $2,2 \times 1,08$  мм<sup>2</sup>, соответственно. В популяциях СЗ-R2, образованных на СЗ-R1 2, 3,



**Рис.4.** Распределение СЗ-R2 маньчжурского ясеня, образовавшихся на СЗ-R1 классов 1–8 (см. табл. 1), по стадиям развития: I – глобулярная; II – сердцевидная; III – торпеды; IV – семядолей

**Fig. 4.** Distribution of Manchurian ash SE-R2 formed on SE-R1 of 1–8 classes (see Table 1) by stages of development: I, globular; II, cordate; III, torpedo; and IV, cotyledon

## Влияние возраста ЭК маньчжурского ясеня на соматический эмбриогенез

## Effect of Manchurian ash EC age on somatic embryogenesis

Пассажи	Возраст ЭК, сут	K новообразованных СЗ, %	СЗ-К, шт./эксплант	Доля СЗ-К на разных стадиях развития, %				АЗ, %	K смертности СЗ, %
				Глобулярная	Сердцевидная	Торпедовидная	Семядольная		
1	30	83,0±5,2 <sup>b</sup>	5,9±0,2	40,9±2,3 <sup>b</sup>	9,9±3,3 <sup>b</sup>	4,6±1,2 <sup>b</sup>	45,5±6,3 <sup>a</sup>	46,0±2,4 <sup>a</sup>	0,1±0,1
4	120	100,0±0 <sup>a</sup>	7,0±3,4	35,6±5,2 <sup>b</sup>	25,9±3,3 <sup>a</sup>	12,6±1,2 <sup>a</sup>	25,8±7,4 <sup>b</sup>	14,9±4,2 <sup>b</sup>	0,2±0,4
6	180	100,0±0 <sup>a</sup>	10,9±2,1	50,3±1,3 <sup>a</sup>	17,7±5,0 <sup>a</sup>	11,9±3,7 <sup>a</sup>	19,3±6,5 <sup>b</sup>	15,2±2,5 <sup>b</sup>	0,8±0,3

7 и 8-го классов, больше 50% зародышей находились на ранних стадиях развития. Напротив, в популяции, образованной на СЗ-R1 6-го класса, 68% СЗ-R2 находились на торпедовидной и семядольной стадиях развития (см. рис. 4).

## Регенерация соматических зародышей путем непрямого эмбриогенеза

ЭК семядольного происхождения поддерживали в культуре в течение 6 мес. С увеличением срока культивирования менялась структура каллуса: он становился более рыхлым и однородным (см. рис. 2a, 1–3). После 30 сут культивирования на среде П в каллусе появлялись соматические зародыши (СЗ-К) (см. рис. 2b, 1–3).

Однако при увеличении срока культивирования каллуса менялся качественный состав возникающих в нем СЗ-К. Так, после первого пассажа суммарная доля торпедовидных СЗ-К и СЗ-К с семядолями составляла 50% и практически все СЗ-К имели дефекты в структуре семядолей.

К концу четвертого пассажа процентное содержание торпедовидных и сердцевидных СЗ-К увеличивалась в 2,5–3 раза (табл. 2), а глобулярных и семядольных снижалось, причем лишь около половины СЗ-К с семядолями имели нормальную морфологию. К концу шестого пассажа продолжала увеличиваться лишь доля глобулярных СЗ-К, доля СЗ-К на других стадиях развития снижалась, но при этом общее число соматических зародышей повышалось с увеличением длительности выращивания (см. табл. 2).

Независимо от возраста ЭК, из которого получали СЗ-К, их средний размер на глобулярной, сердцевидной, торпедовидной и семядольной стадиях развития был равен 0,20×0,19 мм<sup>2</sup>, 0,30×0,28 мм<sup>2</sup>, 0,72×0,54 мм<sup>2</sup>, 1,65×0,80 мм<sup>2</sup>, соответственно.

## Постэмбриональное развитие соматических зародышей

На рис. 5 представлены результаты экспериментов, проведенных на шести классах СЗ-К, отобранных из ЭК после первого пассажа на 30-е сутки культивирования.

После 30 суток культивирования на среде Р более 40% (см. рис. 5) СЗ-К 1, 2 и 3-го классов развивались в проростки (фотографии приведены на рис. 3b и 3c). При этом доля проростков с корнем длиной 1–2 см (см. рис. 3c) не превышала 5%. Не более 15% зеленых СЗ-К 4, 5 и 6-го классов развивались в проростки, из которых только 2% имели корень длиной 1–2 см.

Основываясь на полученных результатах по изучению влияния срока культивирования ЭК на качество СЗ-К, в дальнейшем использовали СЗ-К первых трех классов (СЗ-К белого цвета длиной 4–8 мм).

В результате проведенных экспериментов было также установлено, что с увеличением срока культивирования каллуса качество СЗ-К ухудшалось (рис. 6).

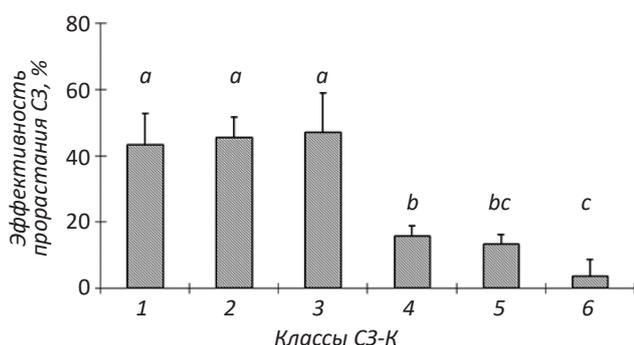


Рис. 5. Формирование проростков из шести классов СЗ-К маньчжурского ясеня (см. «Условия эксперимента»). a–c – показатели значимости различий при многогранном тесте Дункана при  $P = 0,05$  (здесь и на рис. 6)

Fig. 5. Formation of sprouts from SE-C of 6 classes (see EXPERIMENTAL section); a–c, indices of significant differences at  $P = 0.05$  using Duncan's multiple range (here and in Fig. 6)

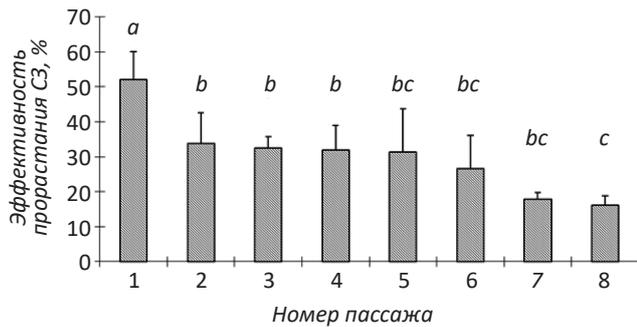


Рис.6. Влияние возраста ЭК на развитие проростков из СЗ-К маньчжурского ясеня

Fig. 6. Effect of EC age on development of Manchurian ash sprouts from SE-C

Так, СЗ-К, выделенные из каллуса после 2, 3 и 4-го пассажей, развивались в проростки в 32% случаев (фотографии см. на рис. 3b и 3c), и 30% проростков имели зачаточный корень (см. рис. 3b). К 8-му пассажу способность СЗ-К развиваться в проростки снижалась до 18%.

Результаты экспериментов по стимуляции роста корней показали, что у проростков с зачаточным корнем, полученных из СЗ-К, выделенных из каллуса после 1, 2 и 3-го пассажей, формирование корней на среде Y происходило в 15% случаев (данные не приведены).

У проростков, полученных из СЗ-К, которые были выделены из каллуса после 4-го пассажа, интенсивность корнеобразования была выше и достигала 22%. Способность к укоренению проростков, происходящих от СЗ-К, после более длительного культивирования (240 сут) падала ниже 5% (данные не приведены).

Все полученные проростки, имеющие корень и развитую надземную часть (см. рис. 3c и 3d), переносили в почву, используя ранее описанную методику [16]. На 15-й день после пересадки коэффициент выживания растений-регенерантов составил 100%. Средняя высота ростков достигала 3,75 см, листовые пластины увеличивались в размере и формировали новые перистосложные листья. В последующие 15 сут наблюдался активный рост растений-регенерантов; их средняя высота достигала 6,3 см. Через месяц средняя высота ростков увеличивалась до 9,26 см, средний диаметр стебля у корневой шейки был равен 2,15 мм, коэффициент выживаемости составлял 91% (см. рис. 3e).

В предыдущих работах Yang et al. описали двухэтапную процедуру размножения маньчжурского ясеня *in vitro*. Предложенная технология

позволяла осуществить на первом этапе регенерацию СЗ из клеток семядолей зиготических зародышей, а на втором – стимулировать их рост и развитие в растения-регенеранты [16]. В настоящем исследовании была предпринята попытка повысить эффективность получения СЗ путем прямого эмбриогенеза и сопоставить его результаты с данными, полученными методом непрямого эмбриогенеза из клеток СЗ, образовавшихся из каллуса в культуре *in vitro*.

Использование метода непрямого соматического эмбриогенеза может повысить эффективность размножения маньчжурского ясеня *in vitro* [22, 23]. Известно, что использование каллусов в качестве промежуточной стадии формирования СЗ увеличивает вероятность появления самоклональных вариантов, т.е. именно этот путь позволяет проводить клеточную селекцию, являющуюся важным этапом технологии получения новых форм растений в культуре *in vitro*.

Основываясь на результатах [16] о морфологических различиях полученных СЗ, авторы попытались, с одной стороны, стандартизовать материал, используемый в качестве первичного экспланта, а с другой – решить вопрос утилизации неспособных к постэмбриональному развитию СЗ. Количественная оценка эмбриогенного потенциала восьми морфотипов СЗ-R1 не выявила достоверных различий в интенсивности новообразования СЗ-R2 (см. данные о K размножения). Однако у СЗ-R1 с очевидными морфологическими аномалиями (8-й класс) коэффициент соматического эмбриогенеза был в 2 раза выше, чем у остальных тестируемых классов СЗ-R1. Кроме того, 8-й класс СЗ-R1 характеризовался максимальной интенсивностью каллусообразования (86%) (см. табл. 1).

Оценка распределения СЗ-R2 по стадиям развития позволила идентифицировать конкретный «морфотип», а именно СЗ-R1 6-го класса, у которого около 60% вновь образованных СЗ-R2 достигали семядольной стадии развития (см. рис. 4). У остальных тестируемых СЗ-R1 доля СЗ-R2 с морфологически оформленными семядолями была ниже (от 10% до 40%), причем преобладали СЗ-R2 на ранних стадиях развития (см. рис. 4). Аналогичная тенденция прослеживалась при регенерации СЗ из длительно поддерживаемого в культуре каллуса. С увеличением длительности культивирования каллуса среднее количество СЗ на экспланте увеличивалось с 5,9 до 10,9 шт., а содержание СЗ-К на семядольной стадии развития снижалось и к концу 6-го пассажа достигало 19,3%. Замедление развития СЗ на ранних

стадиях встречается часто и, по мнению ряда авторов, представляет собой «узкое место», которое определяет эффективность размножения растений *in vitro* [9, 10, 22].

Для решения этой проблемы необходимо создание условий, максимально приближенных к тем, в которых осуществляется развитие зародыша *in vivo*, а также поиск критериев, позволяющих оценивать степень соответствия соматического зародыша зиготическому на каждой стадии его развития.

Таким образом, в настоящем исследовании показана возможность использования альтернативных путей регенерации растений *in vitro* для размножения маньчжурского ясеня, определен оптимальный «морфотип» СЗ-R1 для получения СЗ, находящихся на семядольной стадии развития и установлен предельный возраст каллуса, способного к образованию СЗ.

Данное исследование может быть использовано в качестве основы технологии размножения и создания новых форм маньчжурского ясеня.

Работа выполнена при поддержке Государственного фонда развития естественных наук Китая (National Natural Science Foundation of China, гранты № 31400535) и Фонда фундаментальных исследований в центральных университетах Китая (Fundamental Research Funds for the Central Universities, гранты № 2572014CA13).

## ЛИТЕРАТУРА

- Kong D.M., Preece J.E., Shen H.L. Somatic embryogenesis in immature cotyledons of Manchurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2012, 108, 85–492.
- Hu L.J., Uchiyama K., Shen H.L., Ide Y. Multiple-scaled spatial genetic structures of *Fraxinus mandshurica* over a riparian–mountain landscape in Northeast China. *Con. Genet.* 2010, 11, 77–87.
- Wang Z.Q., Guo D.L., Wang X.R., Gu J.C., Mei L. Fine root architecture, morphology, and biomass of different branch orders of two Chinese temperate tree species. *Plant Soil.*, 2006. 288, 155–171.
- Mei L., Gu J.C., Zhang Z.W., Wang Z.Q. Responses of fine root mass, length, production and turnover to soil nitrogen fertilization in *Larix gmelinii* and *Fraxinus mandshurica* forests in Northeastern China. *J. Forestry Res.* 2010, 15, 194–201.
- Kong D.M., Shen H.L., Li N. Influence of AgNO<sub>3</sub> on somatic embryo induction and development in Manchurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.). *Afr. J. Biotechnol.*, 2012, 11(1), 120–125.
- Shen H.L., Zhao X., Xing Z.B., Huang J., Hu L.J., Liu C.L. Influencing factors of vegetative propagation of *Fraxinus mandshurica* by rooted cuttings. *J. Northeast Forestry Uni.*, 2005, 33, 5–6.
- Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J., Filonova L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2002, 69, 233–249.
- Mathieu M., Lelu-Walter M. A., Blervacq A. S., et al. Germin-like genes are expressed during somatic embryogenesis and early development of conifers, *Plant Mol. Biology*, 2006, 61, 615–627.
- Моисеева А.Н., Серебрякова В.Н., Нарди Л., Лукретти С., Бутенко Р.Г. Организменный уровень организации начальных этапов соматического эмбриогенеза в культуре ткани *Citrus sinensis* cv. Tarocco. *Физиол. растений*, 2006, 53, 621–620.
- Моисеева А.Н., Серебрякова В.Н., Нарди Л. и др. Морфогенетический статус соматических зародышей *Citrus sinensis*, содержащихся в зрелых многозародышевых семенах и полученных в культуре *in vitro*. *Физиол. растений*, 2010, 57, 771–782.
- Ghanti S. K., Sujata K. G., Rao M. S., et al. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature explants of chickpea. *Biologia Plantarum.*, 2010, 54, 121–125.
- Stasolla C., Yeung E.C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2003, 74, 15–35.
- Merkle S.A., Nairn C.J. Hardwood tree biotechnology. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 2005, 41, 602–619.
- Oh M.J., Na H.R., Choi H.K., et al. High frequency plant regeneration system for *Nymphoides coreana* via somatic embryogenesis from zygotic embryo-derived embryogenic cell suspension cultures. *Plant Biotechnol. Rep.*, 2010, 41, 125–128.
- Chen A.H., Yang J.L., Niu Y.D., et al. High-frequency somatic embryogenesis from germinated zygotic embryos of *Schisandra chinensis* and evaluation of the effects of medium strength, sucrose, GA<sub>3</sub>, and BA on somatic embryo development, *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 2010, 102, 357–364.
- Yang L, Bian L, Shen H, et al. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of Manchurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.). *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 2013, 115, 115–125.
- Neves L.O., Duque S.R.L., Almeida J.S., Fevereiro P.S. Repetitive somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* ssp. *Narbonensis* and *M. truncatula* Gaertn cv. *Jemalong*. *Plant Cell Rep.*, 1999, 18, 398–405.
- Uzelac B., Ninkovic' S., Smigocki A., Budimir S. Origin and development of secondary somatic embryos in transformed embryogenic cultures of *Medicago sativa*. *Biol. Plant*, 2007, 51, 1–6.

19. Kuamr J.V., Kuamri B.D.R., Castano E. Cyclic somatic embryogenesis and efficient plant regeneration from callus of safflower. *Biol. Plant.*, 2008, 52, 429–436.
20. Shi X.P., Dai X.G., Liu G.F., et al. Cyclic secondary somatic embryogenesis and efficient plant regeneration in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.). *In vitro Cell Dev. Biol.*, 2010, 46, 117–125.
21. Konan K.E., Durand-Gasselin T., Kouadio Y.J., et al. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. *Plant Cell Rep.*, 2010, 29, 1–13.
22. Yang L., Wang J.N., Li Y.H., Shen H.L. Cyclic secondary somatic embryogenesis and efficient plant regeneration in mountain ash (*Sorbus pohuashanensis*). *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 2012, 111, 173–182.
23. Wang Z.Z., Li K.Q., Zhang D.L., et al. Variation and high frequency somatic embryogenesis of embryogenic callus in *Gossypium Hirsutum*. *Acta Botanica Sinica*, 1994, 5, 331–338+407–408.

## Secondary Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration in Manchurian Ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.)

L. YANG<sup>1,2,3</sup>, J. WANG<sup>1</sup>, E.S. SUKHANOVA<sup>2,3</sup>, Kh.L. SHEN<sup>1</sup>, and A.M. NOSOV<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>The State Key Laboratory of Forest Genetics and Breeding, School of Forestry, North-Eastern Forestry University, 150040, Harbin China

<sup>2</sup>The Faculty of Biology, Moscow State University, 119899, Moscow Russia

<sup>3</sup>The Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russ. Acad. Sci., 127276, Moscow Russia

e-mail: al\_nosov@mail.ru\*

Received December 18, 2017

Accepted December 26, 2017

**Abstract**— Effects of cultural conditions and subculture times on secondary somatic embryogenesis of *Fraxinus mandshurica* and its postembryonic plantlet regeneration were studied. Secondary somatic embryos were induced *via* direct and indirect embryogenesis on the MS $\frac{1}{2}$  medium supplemented with 0.05 mg /L NAA, 400 mg /L casein hydrolyzate, 25 g /L sucrose and 6.0 g /L agar, using primary somatic embryos that derived from cotyledons of mature zygotic embryos as explants. The proliferation capacity of the primary somatic embryos depended on their morphological characteristics. The evaluation of the regeneration effectiveness was carried out on the 30<sup>th</sup> day of subculturing, and it showed that the highest secondary somatic embryogenesis rate, the highest number of secondary somatic embryos that reached cotyledon stage, and the maximum of multiplication were obtained when the white primary somatic embryos 4 mm long were used as explants. The embryonic callus of *F. mandshurica* could retain the capacity of embryogenesis well within 8 months. The total number of secondary somatic embryos increased, whereas those at the late stages of development (torpedo or cotyledon) decreased with the increasing preservation time. The highest germination rate (52%) was observed when the white cotyledon somatic embryos 4–8 mm long were cultured on the MS $\frac{1}{2}$  medium containing 0.2 mg/L BAP, 20 g/L sucrose, 200 mg/L casein hydrolyzate and 6 g/L agar after 30 days of subculturing. The germination rate of the same somatic embryos (white and 4–8 mm long) obtained from callus that were preserved for 240 days was only 18%. Therefore, it was proved that the germination of somatic embryos is a function of the callus age and the origin of the seedlings does not affect the frequency of plantlet formation. After 2 months of transplantation, the survival rate of the regenerated plantlets was 90% and the height of the plantlets was 8–10 cm. This study provides a feasible technology of large-scale propagation and industrial production of high-quality embryonic material of *F. mandshurica*.

**Key words:** Manchurian ash, somatic embryo, somatic embryogenesis, plantlet regeneration.

**Acknowledgement**—The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grants 31400535) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (Grants 2572014CA13).

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-1-52-61