

УДК 581.143.6

## МОРФОГЕНЕЗ *Picea pungens* Engelm. В КУЛЬТУРЕ *in vitro* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТИДИАЗУРОНА

Т. В. Железниченко<sup>1</sup>, Д. С. Мурасева<sup>1</sup>, В. В. Стасова<sup>2</sup>, Т. И. Новикова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Центральный сибирский ботанический сад СО РАН  
630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101

<sup>2</sup>Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН  
660036, Красноярск, Академгородок, 50/28

E-mail: zhelez05@mail.ru, dsmuraseva@csbg.nsc.ru, vistasova@mail.ru, tin27@mail.ru

Поступила в редакцию 18.09.2018 г.

Исследовали особенности регенерации ели голубой *Picea pungens* Engelm. из зрелых зиготических зародышей в культуре *in vitro* под действием тидиазурона (ТДЗ) с использованием питательной среды ½ LV. Выявлено, что под влиянием ТДЗ независимо от используемой концентрации (0.5 или 1.0 мМ) при длительности первого пассажа 28 сут ткани семядолей эксплантов разрастались, в их эпидермальных слоях происходили активные митотические деления, приводящие к формированию меристематических центров (меристематидов), дающих начало структурам различной морфологии, без промежуточной стадии каллусообразования. При последующем культивировании материала на безгормональных питательных средах ½ LV прослеживались асинхронность развития структур и разнообразие типов органогенеза: наблюдали закладку *de novo* почек, развитие микропобегов, а также отдельных хвоинок. Такой эффект воздействия ТДЗ на регенерацию зародышей ели голубой в культуре *in vitro* отмечен впервые. Максимальное количество микропобегов с нормальной морфологией ((70.3 ± 7.5) шт. на эксплант) получено при индукции морфогенных процессов с использованием 0.5 мМ ТДЗ в течение первого пассажа (28 сут). Увеличение концентрации ТДЗ до 1 мМ привело к снижению числа морфогенных структур на эксплант в 1.6 раза. При увеличении длительности первого пассажа до 35 сут отмечали формирование неоднородного рыхлого каллуса, что свидетельствует о непрямом пути морфогенеза. При этом в каллусной массе, полученной в присутствии как 0.5, так и 1.0 мМ ТДЗ, наблюдали образование крупных меристематидов, которые при дальнейшем культивировании на безгормональных средах давали начало аномальным нежизнеспособным структурам.

**Ключевые слова:** гистология, культура *in vitro*, органогенез, микропобеги, тидиазурон, ель голубая.

DOI: 10.15372/SJFS20190105

### ВВЕДЕНИЕ

Ель голубая *Picea pungens* Engelm. – североамериканский вид хвойных растений, широко применяющийся в качестве декоративной культуры как за рубежом, так и в России благодаря уникальному окрасу хвои, а также высокой толерантности к городским условиям (Антипов, 2000; Булыгин, Ярмишко, 2001). Однако размножение этого вида традиционными способами затруднено. Семена ели голубой чаще всего имеют низкие посевные качества, а периодич-

ность плодоношения составляет 5–7 лет. При семенном размножении ели голубой только небольшое количество семян (5–16 %) наследует выраженный голубой окрас хвои материнского растения, а многолетний отбор родительских линий, проводимый при контролируемом опылении, приводит к тому, что лишь половина потомства от скрещиваемых генотипов проявляет родительскую окраску хвои (Стам, 1984).

Вегетативное размножение ели голубой также не всегда эффективно, хотя обеспечивает максимальный выход растений, аналогичных

материнскому. Формирование корнесобственных растений елей ограничено, поскольку виды *Picea* относятся к трудноукореняемым породам (Билык, 1989), а при получении саженцев путем прививок хорошим результатом считается 60 % приживаемости (Kirdar et al., 2009). При этом растениям, полученным такими способами, нередко передаются болезни от взрослых особей (Savella, 1965). Следовательно, традиционные методы не гарантируют размножение элитных форм хвойных деревьев.

Приоритетным направлением в лесной биотехнологии является применение методов культуры *in vitro*. Несмотря на то что в настоящее время разработано множество протоколов клонального микроразмножения древесных растений, частота регенерации для ряда видов остается низкой, особенно это касается хвойных растений (Tang, Newton, 2005), в частности ели голубой (Afele et al., 1992; Afele, Saxena, 1995; Железниченко, Новикова, 2017). Одним из способов решения проблемы размножения этих видов является оптимизация состава используемых регуляторов роста растений и их концентраций.

В последние годы большой интерес вызывает использование тиадазулона (ТДЗ) в качестве одного из наиболее эффективных регуляторов роста в культуре *in vitro*, особенно в случае клонального микроразмножения древесных растений (Murthy et al., 1998; Guo et al., 2011; Novikova, Zaytseva, 2018). ТДЗ – это синтетический регулятор роста (N-фенил-N'-1,2,3-тиадазулол-5-мочевина), разработанный исходно как дефолиант хлопка (Arndt et al., 1976), хотя в первую очередь ТДЗ рассматривают как синтетический цитокинин. Его уникальность заключается в способности одновременно проявлять как ауксиновую, так и цитокининовую активность, при этом по химическому строению он отличается от используемых ауксинов и цитокининов (Murthy et al., 1998).

К настоящему времени показана эффективность ТДЗ при клональном микроразмножении широкого спектра растений, в том числе трудноразмножаемых. ТДЗ успешно применялся для альбиции ланкоранской *Albizia julibrissin* Durazz. (Hosseini-Nasr, Rashid, 2000), яблони домашней *Malus domestica* Borkh. (Yancheva et al., 2003), рододендронов сихотинского *Rhododendron sichotense* Pojark и кэтевбинского *Rhododendron catawbiense* Michx. (Zaytseva et al., 2016). Также отмечена способность ТДЗ как отдельно, так и в сочетании с другими регуляторами роста инду-

цировать морфогенез у хвойных растений (Ellis et al., 1991; Tang, Newton, 2005; De Diego et al., 2010; Jerico et al., 2012).

Поскольку известно, что ТДЗ способен инициировать разнообразные морфогенетические реакции, включая формирование каллуса, органогенез, образование соматических эмбриоидов (Murthy et al., 1998), создание регенерационных систем на его основе должно сопровождаться гистологическим анализом процессов инициации и развития структур для уточнения типа морфогенеза.

В культуре *in vitro* при регенерации хвойных в качестве эксплантов наиболее часто используют незрелые или зрелые зиготические зародыши, так как у большинства этих видов сложно индуцировать соматический эмбрио- или органогенез из других типов эксплантов (Tang, Newton, 2005; Jerico et al., 2012).

В связи с этим целью исследования – оценка влияния ТДЗ на регенерацию ели голубой из зрелых зиготических зародышей и выявление типа морфогенеза с использованием морфогистологического анализа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Растительный материал.* Исследовали деревья ели голубой, имеющие выраженную голубую окраску хвои, произрастающие в искусственных насаждениях Академгородка г. Новосибирска. В качестве эксплантов для введения в культуру *in vitro* использовали зрелые зиготические зародыши, которые выделяли из семян свободноопыленных деревьев, собранных в начале сентября 2017 г.

*Стерилизация материала.* Поверхностную стерилизацию семян проводили поэтапно: сначала материал погружали в 70 % этиловый спирт на 1 мин, затем в 25 % раствор коммерческого отбеливателя «Domestos» («Юнилевер Русь», Россия) на 10 мин, после чего в 10 % раствор  $H_2O_2$  (ЗАО «База № 1 Химреактивов», Россия) на 10 мин. Асептический материал промывали трехкратно стерильной дистиллированной водой по 10 мин. Стерильные семена оставляли на ночь в стерильной воде для набухания.

*Индукция регенерации.* Культивирование проводили на твердой питательной среде  $\frac{1}{2}$  LV (Litvay et al., 1985), дополненной мезоинозитом – 100 мг/л (Sigma-Aldrich®, США), глутаминовой кислотой – 500 мг/л (Sigma-Aldrich, США), гидролизатом казеина – 500 мг/л (Fluca Analytical, США). Среда доводили до pH 5.8,

вносили агар 0.7 % (PanReac®, Испания), затем автоклавировали (121 °С, 110 кПа, 20 мин). Индукцию процессов морфогенеза стимулировали внесением в питательные среды после автоклавирования ТДЗ (BioReagent, Sigma-Aldrich®, США) в концентрации 0.5 или 1 мМ. Контролем служили питательные среды, не содержащие регуляторов роста. Экспланты извлекали в условиях ламинар-бокса и помещали на среды горизонтально. Культивирование проводили под люминесцентными лампами с интенсивностью освещения 2.24 клк при (23 ± 2) °С и 16-часовом фотопериоде. Длительность первого пассажа подбирали экспериментально, она составляла 28 или 35 сут. Затем растительный материал переносили на питательные среды, не содержащие регуляторов роста, длительность пассажа составляла 35 сут. Частоту регенерации подсчитывали после первого пассажа. После второго пассажа проводили подсчет числа образовавшихся морфогенных структур на эксплант. Выделяли адвентивные почки и адвентивные микропобеги с нормальной и аномальной морфологией, а также отдельные хвоинки. Учитывали микропобеги длиной более 3 мм с одной или двумя мутовками хвоинок и развитой верхушечной почкой. Почки и микропобеги считали адвентивными, поскольку они формировались из клеток и тканей, обычно их не образующих (Основы..., 2002).

**Морфогистологический анализ.** Материал для анализа в течение первого пассажа (на средах с ТДЗ) фиксировали на: 4, 10, 20, 28 и 35 сут после начала эксперимента, а также однократно в конце второго пассажа (на питательной среде без регуляторов роста). Для фиксации растительный материал помещали в FAA – этанол (96 %) : формалин (40 %) : ледяная уксусная кислота (99.9 %) в пропорциях 100 : 7 : 7 на несколько дней, затем промывали и хранили в 70 % этаноле. Перед заливкой в Paraplast (Sigma-Aldrich®, США) образцы обезвоживали, проводя последовательно через этанол, смесь этанола и хлороформа, хлороформ.

Изучение процессов морфогенеза проводили на базе Центра коллективного пользования микроскопического анализа объектов ЦСБС СО РАН на постоянных препаратах (Паушева, 1988). Тонкие срезы (7–9 мкм) получали на ротационном микротоме (Microm HM-325, 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)

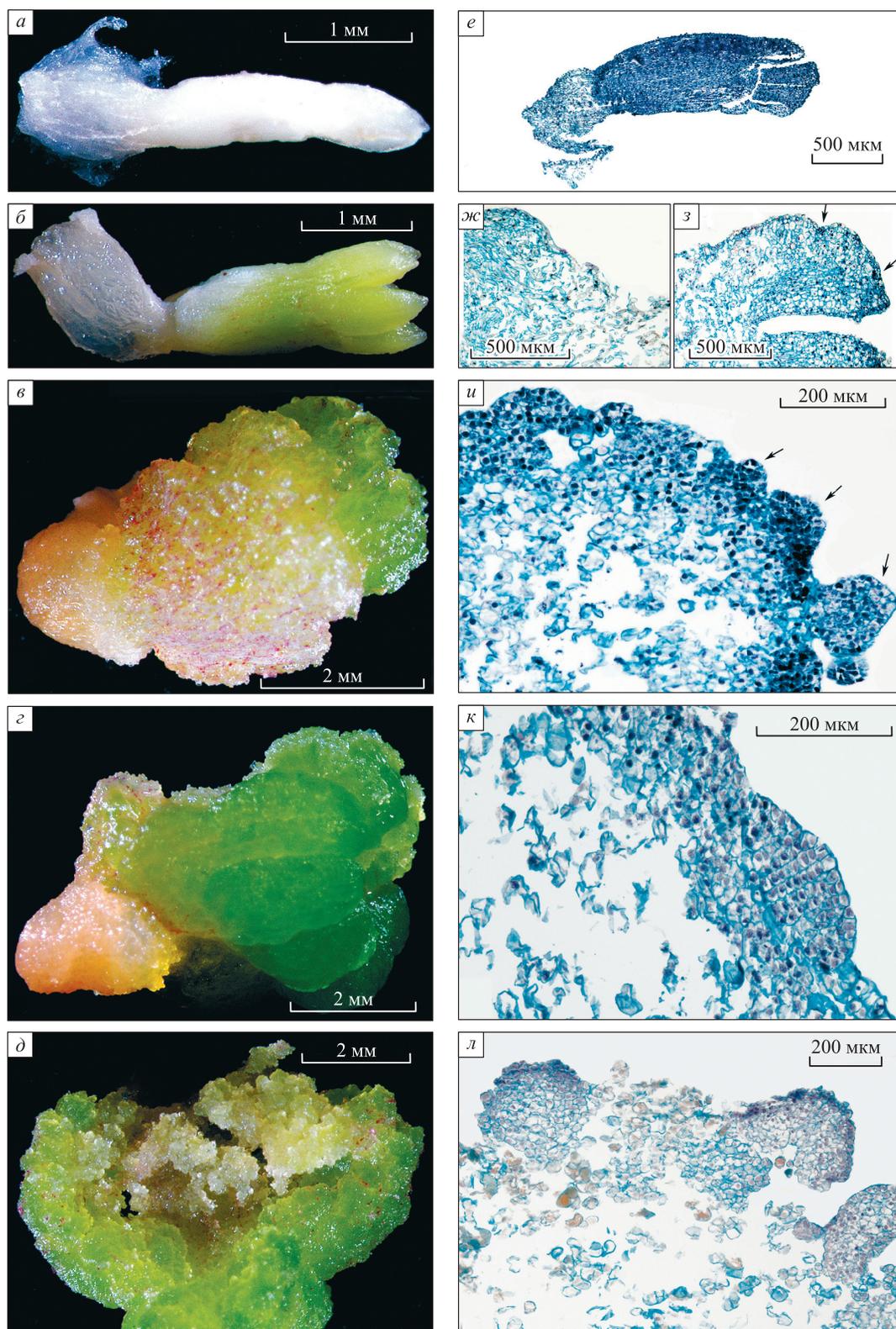
с программным управлением, оборудованным цифровой камерой. Полученные при культивировании *in vitro* морфогенные структуры и динамику их развития анализировали с помощью стереомикроскопа SteREO Discovery V 12 (Carl Zeiss, Германия).

**Статистическая обработка результатов.** Все эксперименты выполнены в трехкратной повторности. В каждом варианте опыта использовали не менее 50 эксплантов. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel 7.0 и Statistica 8. Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок ( $M \pm m$ ).

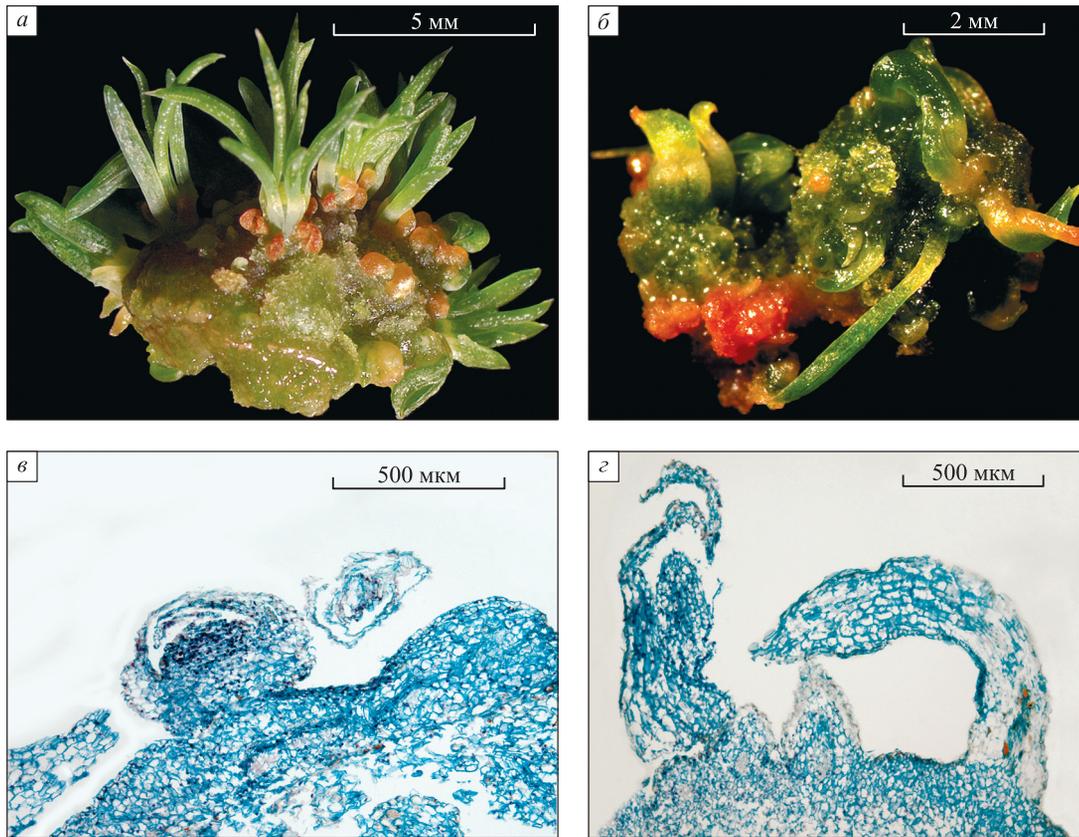
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании зародышей ели голубой частота регенерации эксплантов составляла 96–98 % через 28–35 дней культивирования как на безгормональных питательных средах (контроль), так и на средах, содержащих ТДЗ. Поскольку на безгормональных средах развивались только проростки и больше никакого морфогенеза не наблюдали, их гистологический анализ не проводили. Под действием ТДЗ в изучаемых концентрациях (0.5 и 1 мМ) отмечена регенерация почек и побегов, а также отдельных хвоинок из разросшихся тканей первичных эксплантов.

Морфогистологический анализ при формировании структур из тканей зародышей в течение первого пассажа приведен на рис. 1. Уже на 4-е сут культивирования на фоне изучаемых концентраций ТДЗ наблюдали незначительное увеличение объема эксплантов и появление рыхлого каллуса в базальной части зародышей (см. рис. 1, а, е). При использовании 1 мМ ТДЗ отмечали покраснение эксплантов. На 10-е сут в области гипокотили зародышей объем белого рыхлого каллуса увеличился (см. рис. 1, б), его клетки имели удлиненную форму (см. рис. 1, ж). При этом наблюдали разрастание и зеленоватое окрашивание семядолей эксплантов, что свидетельствует о начале ассимиляционной активности. С помощью гистологического анализа выявлена закладка меристематических центров в эпидермальном слое семядолей (см. рис. 1, з). На 20-е сут рыхлый каллус, сформировавшийся в зоне гипокотили, подвергался некрозу, тогда как семядоли зародышей продолжали разрастаться и приобрели более интенсивную зеленую окраску (см. рис. 1, в). Гистологический анализ позволил установить морфогенетическую ак-



**Рис. 1.** Морфологические (а–д) и гистологические (е–л) изменения зародышей ели голубой при культивировании на питательной среде  $\frac{1}{2}$  LV с добавлением тидиазурона ( $0.5 \mu\text{M}$ ) в течение первого пассажа: а, е – на 4-е сут культивирования, виден рыхлый каллус в зоне гипокотилия (е); б, ж, з – на 10-е сут культивирования, семядоли имеют зеленоватую окраску, объем каллуса в базальной части зародышей увеличился, клетки каллуса удлиненные, наблюдается пролиферация клеток (стрелки) в тканях семядолей; в, и – на 20-е сут культивирования, видны меристематические очаги (стрелки) в эпидермальных слоях разросшихся семядолей; г, к – на 28-е сут культивирования, семядоли имеют зеленый цвет, видны четкие слои клеток в меристемоиде; д, л – на 35-е сут культивирования, видны рыхлая структура каллуса и сформированные меристематические очаги.



**Рис. 2.** Морфологическое и гистологическое строение сформированных *de novo* структур ели голубой, полученных после культивирования растительного материала на питательной среде  $\frac{1}{2}$  LV, дополненной  $0.5 \mu\text{M}$  ТДЗ (первый пассаж) с последующим переносом на безгормональную среду  $\frac{1}{2}$  LV (второй пассаж). *а, в* – длительность пассажа с ТДЗ составляла 28 сут, длительность пассажа на безгормональной среде 35 сут; *б, з* – длительность первого и второго пассажей составила 35 сут, видны почка, имеющая anomальное строение, и хвоинки.

тивность, проявляющуюся в развитии меристематических очагов и формировании единичных глобулярных выпячиваний (см. рис. 1, *и*).

На 28-е сут культивирования разросшаяся ткань семядолей продолжала увеличиваться в объеме, а на ее поверхности отмечали образование многочисленных мелких бугорков (меристемоидов) (см. рис. 1, *з*). При этом гистологический анализ выявил различия между вариантами опыта: при использовании более низкой концентрации ТДЗ ( $0.5 \mu\text{M}$ ) в питательной среде меристематические центры имели более организованную структуру и насчитывали от 6 до 10 четко организованных клеточных слоев плотно упакованных делящихся клеток (см. рис. 1, *к*), тогда как при более высокой ( $1 \mu\text{M}$ ) концентрации регулятора роста такого развития меристемоидов не наблюдали. Вероятно, более высокая концентрация ТДЗ тормозит морфогенез в эмбриокультуре ели голубой при длительности пассажа свыше 20 сут.

Более длительное культивирование (35 сут) на среде с ТДЗ приводило к формированию неоднородного рыхлого каллуса (см. рис. 1, *д*). С помощью гистологического анализа выявили присутствие крупных меристемоидов в каллусной массе (см. рис. 1, *л*).

Дальнейшее развитие морфогенетических структур из меристемоидов наблюдали при субкультивировании растительного материала, полученного в течение первого пассажа, на безгормональных питательных средах (рис. 2).

При этом отмечено разнообразие путей органогенеза независимо от изучаемой концентрации ТДЗ в питательной среде и длительности первого пассажа. Одновременно происходило формирование как почек, так и побегов, а также развивались отдельные хвоинки (см. рис. 2, *в, з*). Такой эффект ТДЗ, выявленный в настоящем исследовании, при культивировании зародышей ели голубой отмечен впервые. Согласно литературным данным по другим хвойным растениям,

## Влияние концентрации и длительности воздействия ТДЗ на органогенез ели голубой

Структура	Количество структур на эксплант, шт.			
	Длительность первого пассажа			
	28 сут		35 сут	
	ТДЗ 0.5 $\mu\text{M}$	ТДЗ 1 $\mu\text{M}$	ТДЗ 0.5 $\mu\text{M}$	ТДЗ 1 $\mu\text{M}$
Общая сумма	112.1 $\pm$ 6.4	69.1 $\pm$ 11.1	44.2 $\pm$ 6.8	Единичные
Микропобеги	70.3 $\pm$ 7.5	41.5 $\pm$ 7.3	11 $\pm$ 1.6	–
Почки	25.8 $\pm$ 5.1	17.3 $\pm$ 5.5	18.1 $\pm$ 2.8	–
Хвоинки	10 $\pm$ 1.2	10.3 $\pm$ 1.7	15 $\pm$ 2.3	–

*Примечание.* Представлены средние арифметические величины и их стандартные ошибки. Прочерк – не учитывали количество структур.

добавление ТДЗ в питательные среды приводило только к формированию микропобегов (Ellis et al., 1991; Tang, Newton, 2005; De Diego et al., 2010; Jerico et al., 2012), которые часто имели аномалии в строении. В то же время в работе по клональному микроразмножению древесного лекарственного растения семекарпуса анакардиевого *Semecarpus anacardium* L. при культивировании семядолей на среде WPM, содержащей 9.08  $\mu\text{M}$  ТДЗ, отмечено как побегообразование, так и формирование соматических эмбриоидов прямым и непрямым путем через стадию каллусообразования (Panda, Hazra, 2012).

Согласно полученным в этом исследовании данным, концентрация и длительность воздействия ТДЗ оказывали существенное влияние на количество и соотношение сформированных *de novo* структур при регенерации ели голубой (см. таблицу).

Максимальное число морфогенных структур, в частности побегов, формировалось при использовании концентрации ТДЗ 0.5  $\mu\text{M}$  и длительности первого пассажа 28 сут. Повышение содержания регулятора роста до 1  $\mu\text{M}$  в среде приводило к снижению как общего количества образовавшихся структур, так и побегов в 1.6 раза. Микропобеги при использовании обеих концентраций ТДЗ в основном имели нормальную морфологию. Соотношение сформированных побегов и почек и при более низкой, и при более высокой концентрации регулятора роста было примерно равно. Отмечали лишь незначительное увеличение доли сформированных хвоинок с 8.1 до 14 % соответственно. В экспериментах по клональному микроразмножению других хвойных растений (De Diego et al., 2010; Jerico et al., 2012) в культуре *in vitro* под действием ТДЗ авторами отмечено, что при более низких концентрациях регулятора роста в среде

количество побегов было на порядок выше, чем при использовании более высоких. Более того, установлено, что ТДЗ являлся наиболее эффективным регулятором роста при размножении этих видов по сравнению с 6-бензиламинопурином, мета-тополином и зеатином (Jerico et al., 2012).

Более длительное культивирование зародышей ели голубой на средах с ТДЗ в течение первого пассажа (35 сут) значительно снижало количество сформированных микроструктур (см. таблицу). Так, при концентрации 0.5  $\mu\text{M}$  общее число образовавшихся структур сократилось в 2.5 раза, количество побегов – в 6 раз по сравнению с пассажем в 28 сут. Однако доля формирования отдельных хвоинок увеличилась до 33 % в этом варианте опыта. При увеличении концентрации ТДЗ до 1  $\mu\text{M}$  формировались единичные структуры, которые не учитывали.

Кроме того, увеличение длительности первого пассажа до 35 сут приводило к аномалиям развития побегов (см. рис. 2, б) и тормозило их дальнейшее развитие. Таким образом, несмотря на высокую активность, ТДЗ обладает тератогенным эффектом, а также способностью ингибировать развитие морфогенных структур. По мнению С. G. Zhang с соавт. (2005), такое влияние ТДЗ вызвано подавлением действия эндогенного ауксина.

Для преодоления аномалий, возникающих под действием ТДЗ, существует несколько подходов (Novikova, Zaitseva, 2018). В представленной работе реализовано три из них: применение низкой концентрации ТДЗ (0.5  $\mu\text{M}$ ), использование двухстадийного протокола (индукция регенерации на среде, содержащей эффективную концентрацию 0.5  $\mu\text{M}$  ТДЗ, с последующим переносом на безгормональную среду) и сокращение сроков культивирования с ТДЗ до 4 нед.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что при культивировании зрелых зиготических зародышей ели голубой в культуре *in vitro* на питательных средах, содержащих ТДЗ, при длительности инкубации 28 сут активный морфогенез протекает в эпидермальных слоях разросшихся семядолей эксплантов. При этом формируются меристематиды, из которых в дальнейшем развиваются морфогенные структуры. В данном исследовании отмечены асинхронность развития этих структур и разнообразие путей органогенеза (формировались почки, побеги и отдельные хвоинки). Такие особенности регенерации *P. pungens* под действием ТДЗ отмечены впервые.

На эффективность регенерации оказывают влияние как концентрация изучаемого регулятора роста, так и продолжительность культивирования. Оптимальной концентрацией ТДЗ в питательной среде для формирования побегов является 0.5 мМ при длительности пассажа 28 сут. Полученные результаты являются основой для разработки эффективных систем клонального размножения ели голубой.

Работа выполнена в рамках государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН № АААА-А17-117012610051-5 по проекту «Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами» и при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00434 мол\_а «Регуляция путей регенерации хвойных в системе *in vitro* на примере представителей рода *Picea*». В статье рассматривается материал коллекции *in vitro* лаборатории биотехнологии ЦСБС СО РАН, представляющий УНУ 440534 «Коллекции живых растений в помещении и на открытом воздухе».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Антипов В. Г. Декоративная дендрология. Минск: Дизайн ПРО, 2000. 279 с.  
 Билык Е. В. Размножение древесных форм ели стеблевыми черенками // Интродукция и акклиматизация деревьев и кустарников, выращивание новых сортов. Киев: Наук. думка, 1989. С. 9–13.  
 Бульгин Н. Е., Ярмишко В. Т. Дендрология. М.: МГУЛ, 2001. 528 с.  
 Железниченко Т. В., Новикова Т. И. Влияние аскорбиновой кислоты и глутатиона на индукцию соматического эмбриогенеза *Picea pungens* Engelm. // Turczaninowia. 2017. Т. 20. № 3. С. 27–35.

Основы биотехнологии растений. Культура растительных клеток и тканей: учеб. пособ. / Сост.: И. К. Сорокина, Н. И. Старичкова, Т. Б. Решетникова, Н. А. Гринь: Саратов: Саратов. гос. ун-т им. Н. Г. Чернышевского, 2002. 45 с.  
 Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Агропромиздат, 1988. 271 с.  
 Afele J. C., Saxena P. K. Somatic embryogenesis in blue spruce (*Picea pungens* Engelm.) // S. M. Jain, P. K. Gupta, R. J. Newton (Eds.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants. For. Sci. V. 44–46. Springer, Dordrecht, 1995. P. 99–109.  
 Afele J. C., Senaratna T., McKersie B. D., Saxena P. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo culture in blue spruce (*Picea pungens* Engelman.) // Plant Cell Rep. 1992. V. 11. Iss. 5–6. P. 299–303.  
 Arndt F. R., Rusch R., Stillfried H. V., Hanisch B., Martin W. C. A new cotton defoliant // Plant Physiol. 1976. V. 57. N. 5. P. 99.  
 Cram W. H. Needle color and vigor of inbred progenies of *Picea pungens* // HortSci. 1984. V. 19. N. 1. P. 125–126.  
 De Diego N. D., Montalbán I. A., Moncaleán P. *In vitro* regeneration of adult *Pinus sylvestris* L. trees // South Afr. J. Bot. 2010. V. 76. Iss. 1. P. 158–162.  
 Ellis D. D., Barczynska H., McCown B. H., Nelson N. A comparison of BA, zeatin and thidiazuron for adventitious bud formation from *Picea glauca* embryos and epicotyl explants // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1991. V. 27. Iss. 3. P. 281–287.  
 Guo B., Abbasi B. H., Zeb A., Xu L. L., Wei Y. H. Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator // Afr. J. Biotechnol. 2011. V. 10(45). P. 8984–9000.  
 Hosseini-Nasr M., Rashid A. Thidiazuron-induced shoot-bud formation on root segments of *Albizzia julibrissin* is an apex-controlled, light-independent and calcium-mediated response // Plant Growth Regulation. 2000. V. 36. Iss. 1. P. 81–85.  
 Jerico B. B., Lourdes I.-A., Lazaro S.-V., Jose C.-M., Nancy S.-B. *In vitro* regeneration of *Pinus brutia* Ten. var. *eldarica* (Medw.) through organogenesis // Afr. J. Biotechnol. 2012. V. 11. N. 93. P. 15 982–15 987.  
 Kirdar E., Ertekin M., Gökyer E., Çorbacı Ö. L. Mavi ladinin (*Picea pungens* Engelm.) Aşı ile Üretimi Üzerine Araştırmalar (Investigations on propagation by grafting of blue spruce (*Picea pungens* Engelm.)) // Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi (Kastamonu Univ. J. For. Fac.) 2009. V. 9. N. 1. P. 35–41 (in Turkish with English summary).  
 Litvay J. D., Verma D. C., Johnson M. A. Influence of a 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. V. 4. Iss. 6. P. 325–328.  
 Murthy B. N. S., Murch S. J., Saxena P. K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis // In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant. 1998. V. 34. Iss. 4. P. 267–275.

- Novikova T. I., Zaytseva Y. G. TDZ-induced morphogenesis pathways in woody plant culture // N. Ahmad, M. Faisal (Eds.). Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator. Singapore: Springer, 2018. P. 61–91.
- Panda B. M., Hazra S. Micropropagation of *Semecarpus anacardium* L.: a medicinally important tree species // Plant Biosystems. 2012. V. 146. Iss. sup. 1. P. 61–68.
- Savella L. Propagation of *Picea pungens* glauca cultivars // The Int. Plant Propagators' Soc. Proc. 1965. V. 15. P. 199–202.
- Tang W., Newton R. J. Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobus* L.) // Plant Cell Rep. 2005. V. 24. Iss. 1. P. 1–9.
- Yancheva S. D., Golubowicz S., Fisher E., Lev-Yadun S., Flaishman M. A. Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during *in vitro* organogenesis in apple // Plant Sci. 2003. V. 165. Iss. 2. P. 299–309.
- Zaytseva Y. G., Poluboyarova T. V., Novikova T. I. Effects of thidiazuron on *in vitro* morphogenic response of *Rhododendron sichotense* Pojark. and *Rhododendron catawbiense* cv. Grandiflorum leaf explants // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2016. V. 52. Iss. 1. P. 56–63.
- Zhang C. G., Li W., Mao Y. F., Zhao D. L., Dong W., Guo G. Q. Endogenous hormonal levels in *Scutellaria baicalensis* calli induced by thidiazuron // Rus. J. Plant Physiol. 2005. V. 52. Iss. 3. P. 345–351.

## MORPHOGENESIS OF *Picea pungens* Engelm. *in vitro* UNDER THE INFLUENCE OF THIDIAZURON

T. V. Zheleznichenko<sup>1</sup>, D. S. Muraseva<sup>1</sup>, V. V. Stasova<sup>2</sup>, T. I. Novikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Central Siberian Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch  
Zolotodolinskaya str., 101, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

<sup>2</sup> Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch  
V. N. Sukachev Institute of Forest, Russian Academy of Science, Siberian Branch  
Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

E-mail: zhelez05@mail.ru, dsmuraseva@csbg.nsc.ru, vistasova@mail.ru, tin27@mail.ru

Specific features of the blue spruce *Picea pungens* Engelm. regeneration from mature zygotic embryos *in vitro* culture under the influence of thidiazuron (TDZ) were studied. It was noted that under the influence of TDZ the explants cotyledons tissues were expanded, and active morphogenesis took place and meristemoids were formed in their epidermal layers. During the plant material subculturing, which was obtained within the first passage, in the hormone-free culture media, the asynchronous development of structures and the variety of morphogenetic pathways were observed: adventitious buds, microshoots and individual needles were formed at different stages of development. This TDZ influence on the regeneration of blue spruce was noted by us for the first time. The maximum microshoots formation with normal morphology was achieved by using a two-stage explants cultivation: induction of morphogenic processes in the ½ LV culture medium at the TDZ concentration of 0.5 µM during the first passage (28 days) followed by transfer of the obtained material to the ½ LV hormone-free medium. The number of microshoots per explant was (70.3 ± 7.5) pcs. With an increase in the TDZ concentration to 1 µM the number of regenerants per explant decreased 1.6 times and the increased duration of the first passage up to 35 days led to anomalies and inhibition of the microshoots development.

**Keywords:** histological analysis, *in vitro* culture, organogenesis, clonal micropropagation, thidiazuron, blue spruce.

**How to cite:** Zheleznichenko T. V., Muraseva D. S., Stasova V. V., Novikova T. I. Morphogenesis of *Picea pungens* Engelm. *in vitro* under the influence of thidiazuron // *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* (Sib. J. For. Sci.). 2019. N. 1: 57–64 (in Russian with English abstract).

DOI: 10.15372/SJFS20190105