

УДК 581.1;58.085

## **СОДЕРЖАНИЕ ФИТОГОРМОНОВ В КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ПРИ ИНДУКЦИИ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА У ЗАРОДЫШЕЙ ЕЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PICEA ABIES* [L.] KARST.)**

**К. А. Хмара**

*Институт экологических проблем Севера УрО РАН*

У зародышей *Picea abies* [L.] Karst. индуцировали соматический эмбриогенез добавлением в питательную среду 2,4-Д и БАП. На различных этапах формирования каллусной ткани с помощью иммуноферментного анализа определяли содержание ИУК, АБК, зеатин-рибозид и изопентениладенин (2иП) + изопентениладенозин (ИПА). Процесс образования эмбриогенного каллуса зависел от содержания ИУК и АБК в культивируемых тканях. В зародышах, способных образовывать эмбриогенный каллус, содержалось в 5–6 раз больше ИУК, чем у зародышей, не способных к соматическому эмбриогенезу. Содержание АБК у зародышей, способных образовывать эмбриогенный каллус, было в два раза выше, чем у зародышей, не способных к эмбриогенезу. В самом эмбриогенном каллусе наблюдался достаточно высокий уровень АБК. Одним из условий формирования эмбриогенного каллуса является высокое содержание цитокининов в культивируемых зародышах. Полученные данные показали, что эмбриогенный каллус содержит значительно меньшее количество цитокининов, чем культивируемая ткань зародышей. Эмбриогенный каллус имел низкое содержание фитогормонов по сравнению с каллусом, на котором он образовывался. Существование градиента концентрации фитогормонов – больших различий между эмбриогенным и неэмбриогенным каллусами – говорит об особой роли чувствительности тканей зародыша к регуляторам роста, которые определяют его компетентность и готовность воспринимать экзогенный гормональный сигнал и реагировать на него определенным образом.

Ключевые слова: *Picea abies*; ИУК; АБК; цитокинины; соматический эмбриогенез.

### **K. A. Hmara. THE CONTENT OF PLANT HORMONES IN CALLUS TISSUE DURING THE INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN EMBRYOS OF NORWAY SPRUCE (*PICEA ABIES* [L.] KARST.)**

Somatic embryogenesis was induced in embryos of *Picea abies* by adding 2,4-D and BAP to the culture medium. The content of IAA, ABA, zeatin-ribosid and 2ip was determined at various stages of callus tissue formation using ELISA. The process of embryogenic callus formation depended on the content of IAA and ABA in cultured tissues. The embryos capable of forming embryogenic callus contained 5–6 times more IAA than those incapable of somatic embryogenesis. The ABA content in embryos capable of forming embryogenic callus was two times higher than in embryos incapable of embryogenesis. A sufficiently high level of ABA was observed in embryogenic callus. One of the conditions for the formation of embryogenic callus was a high content of cytokinins in cultured embryos. The data showed that embryogenic callus contained a significantly smaller amount

of cytokinins than the cultured tissue of embryos. The level of phytohormones observed in embryogenic callus was low compared to the callus it was formed on. The concentration gradient of phytohormones or a major difference between embryogenic and nonembryogenic callus showed special embryo tissue sensitivity to the growth regulators that determined its competence and readiness to accept exogenous hormonal signal and respond to it in a certain way.

**Key words:** *Picea abies*; plant hormones; IAA; ABA; cytokinins; somatic embryogenesis.

## Введение

Известно, что семеношение хвойных пород подвержено значительному колебанию, поэтому лесное хозяйство испытывает недостаток в семенах. Для решения проблемы нехватки посадочного материала ведутся интенсивные исследования в области разработки методов размножения хвойных пород с помощью соматического эмбриогенеза [Белоруссова, Третьякова 2008; Третьякова, Ижболдина, 2008; Шалаев, Третьякова, 2011; Третьякова, Барсукова, 2012]. При индукции соматического эмбриогенеза у зародышей *Picea abies* [L.] Karst. наблюдается низкий эмбриогенный потенциал [von Arnold, 1987]. Применение в качестве эксплантов незрелых зародышей приводит к увеличению количества зародышей, способных образовывать эмбриогенный каллус [Весвар et al., 1987].

Одним из основных условий индукции эмбриогенеза в культуре ткани является присутствие в питательной среде определенного соотношения гормонов, которое играет основную роль в способности тканей зародыша образовывать эмбриогенный каллус. Скуг и Миллер установили, что при изменении соотношения между ауксином и цитокинином изменяется тип образующей меристемы: при высоком отношении ауксина к цитокининам из части клеток каллуса возникают зачатки корней, если концентрация цитокинина превышает концентрацию ауксина, то клетки дифференцируются в апикальные меристемы стебля [Skoog, Miller, 1957]. Часто эксплант, используемый для получения каллуса, является фрагментом органа и включает ткани, клетки которых различно дифференцированы и имеют разный уровень и соотношение гормонов. Онтогенетически молодые экспланты (незрелые зародыши, семена) продуцируют каллусы с более высокой долей морфотипов, способных к регенерации проростков, по сравнению с более зрелыми тканями [Mohan et al., 1988]. Возможно, разный потенциал развития незрелых зародышей и зрелых тканей обусловлен разной концентрацией гормонов.

Таким образом, эндогенные гормоны, такие как ауксины и цитокинины, играют важную роль при индукции соматического эмбриогенеза. Однако, несмотря на большое количество работ, посвященных изучению гормонального контроля эмбриогенеза, влияние гормонов на индукцию соматического эмбриогенеза изучено недостаточно [Kong et al., 1997; Vagner et al., 1999; Latkowska, Rakowski, 2000]. Так, до сих пор не понятно, какое количество и соотношение различных групп фитогормонов оказывает влияние на процесс формирования эмбриогенного каллуса и связан ли морфогенетический потенциал эксплантов с эндогенной концентрацией гормонов. Поэтому актуальной задачей является изучение содержания эндогенных фитогормонов в каллусе при индукции соматического эмбриогенеза в культуре ткани зародыша. Цель данной работы – определение количества фитогормонов в каллусной ткани при индукции соматического эмбриогенеза у зародышей *Picea abies* [L.] Karst. и изучение их влияния на процесс развития экспланта.

## Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали зародыши семян *Picea abies* [L.] Karst. Семена были собраны на Устюженской лесосеменной плантации в Вологодской области.

Для индукции соматического эмбриогенеза применяли питательную среду, содержащую минеральные соли, по Murashige and Skoog [1962]. В состав среды входили: 1 % сахарозы, 0,6 % агара, тиамин-НCl – 5 мг/л, пиридоксин – 1 мг/л, никотиновая кислота – 5 мг/л, инозит 100 мг/л. В питательную среду добавляли 2,4-Д – 2,2 мг/л и БАП – 1,1 мг/л. Экспланты культивировали на индукционной питательной среде в течение 28 дней, при температуре +21°, при 16-часовом освещении.

Определение содержания фитогормонов в культивируемых зародышах было разбито на этапы. Первый этап – это зародыши до введения в культуру ткани. Второй этап – 5 дней культивирования на индукционной питательной среде. Данный период культивирования на

индукционной питательной среде не способен вызвать эмбриогенез у тканей зародыша при пересадке их на питательную среду, в которой отсутствуют экзогенные регуляторы роста. Третий этап – после 15 дней культивирования на индукционных питательных средах, содержащих регуляторы роста. На данном этапе на поверхности каллусной ткани можно было обнаружить эмбриогенную каллусную ткань. Определение фитогормонов в культивируемых зародышах проводили в каллусной массе, на поверхности которой формировался эмбриогенный каллус, и в каллусе, на поверхности которого эмбриогенез не наблюдался. Четвертый этап – после 28 дней культивирования на индукционных питательных средах, содержащих регуляторы роста. На данном этапе определяли количество фитогормонов в эмбриогенном каллусе и в органогенном каллусе.

Определение нативных фитогормонов проводили с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА) [Катаева и др., 1990]

Экстракция фитогормонов из растительного материала. Замороженный растительный материал растирали в агатовой ступке при температуре +4 °С до гомогенного состояния и экстрагировали в течение 2 часов охлажденным до 0 °С 80%-м метиловым спиртом, содержащим 0,1 % БМФ в качестве антиоксиданта, при постоянном перемешивании в темноте в атмосфере азота.

Полученный экстракт центрифугировали, осадок отделяли, ресуспензировали в 80%-м метаноле, содержащем 0,1 % бутилметилфенола (БМФ), и проводили повторную экстракцию в тех же условиях еще 30 мин. Экстракт центрифугировали, осадок отбрасывали, супернатанты объединяли. Супернатант пропускали с помощью пластикового одноразового шприца через предколонки объемом 3 см<sup>3</sup>, заполненные обращенной фазой С-18 «Сепарон» (Чехия). Получали обесцвеченный экстракт, свободный от хлорофиллов, фенолов, каротиноидов и др. Затем экстракт делили на две равные части: одна часть для определения цитокининов, другая – для определения ИУК и АБК. Для определения потери фитогормонов при очистке в качестве стандартов применялись радиоактивные препараты. Радиоактивность образцов определяли на сцинтилляционном счетчике 1919 Рак Бета «Спектраль» (ЛКБ, Швеция). В соответствии с полученными результатами учитывали потери при очистке.

Процедура ИФА. Полистироловые планшеты сенсibilизировали в течение 12 часов раствором антител в гидрокарбонате

натрия (рН 9,5–9,7) при температуре +4 °С. В каждую лунку вносили по 200 мкл соответствующей антисыворотки. После сенсibilизации планшеты трижды промывали ТБС в течение 15 мин, в каждую лунку вносили по 200 мкл 0,1%-го раствора бычьего сывороточного альбумина в триссолевом буфере (ТБС) и инкубировали 30 мин при температуре +37 °С (кроме вариантов для определения ИУК и АБК). Затем планшеты промывали и в лунки вносили по 50 мкл стандартного раствора гормона или растительного экстракта, перемешивали 1 мин и инкубировали 1 час (температура инкубации для цитокининов +37 °С, для ИУК и АБК +18...+22 °С). Через 1 час в инкубационную смесь добавляли по 150 мкл соответствующего конъюгата – щелочную фосфатазу (ЩФ-гормон), перемешивали 1 мин и инкубировали 1 час в тех же условиях. Планшеты промывали с добавлением в ТБС 0,01%-го раствора детергента Тритон X-100, затем лунки заполняли 200 мкл субстрата (п-нитрофенилфосфат 1 мг/л в гидрокарбонате натрия, рН 9,5–9,7) и инкубировали 1 час при температуре +37 °С. Реакцию останавливали, добавляя в каждую лунку по 50 мкл 5N KOH. Оптическую плотность продукта реакции измеряли при 405 нм на спектрофотометре Multiscan MCC фирмы «Flow» (Англия).

Оценка результатов. В соответствии с методикой Родбард [Rodbard, 1974] определяли зависимость между ферментативной активностью при инкубации антител с возрастающими концентрациями гормона и ферментативной активностью при инкубации в аналогичных условиях без экзогенного гормона.

Все эксперименты проводили в четырех биологических повторностях. При проведении ИФА использовали пять аналитических повторностей. В таблице приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

## Результаты

В таблице приведены данные иммуноферментного анализа по содержанию различных групп фитогормонов в культивируемых тканях.

### *Содержание фитогормонов в каллусной ткани после 5 дней культивирования на индукционной питательной среде*

При культивировании в течение 5 дней на индукционной питательной среде содержание ИУК в тканях зародыша увеличивалось в 24 раза.

Зародыши имели высокое содержание эндогенной АБК (163 нг/г сухого веса). После

Содержание фитогормонов в каллусе в процессе индукции соматического эмбриогенеза на питательной среде, содержащей 2,4-Д и БАП

Тип экспланта	Содержание фитогормонов, в нг/г сухого веса			
	ИУК	АБК	Зеатин+зеатин-рибозид	2иП+ИПА
зародыши	83 ± 2	164 ± 1	109 ± 8	4 ± 1
после 5 дней культивирования	1982 ± 201	127 ± 3	7402 ± 194	4300 ± 121
после 15 дней культивирования (зародыши, способные к соматическому эмбриогенезу)	99400 ± 11217	2638 ± 21	10505 ± 157	65304 ± 3103
после 15 дней культивирования (зародыши, не способные к соматическому эмбриогенезу)	15658 ± 309	1454 ± 11	12094 ± 267	68902 ± 6960
после 28 дней культивирования (зародыши, не способные к соматическому эмбриогенезу)	27000 ± 800	874 ± 5,6	8816 ± 12	62840 ± 3211
эмбриогенный каллус	74 ± 26	1241 ± 109	4256 ± 272	1029 ± 117

5 дней культивирования на индукционной питательной среде наблюдалось незначительное снижение содержания АБК в культивируемых зародышах до 127 нг/г сухого веса.

После 5 дней культивирования на индукционной питательной среде содержание зеатина и зеатин-рибозида в зародышах увеличивалось до 7402 нг/г сухого веса. Количество эндогенных зеатина и зеатина-рибозида в культивируемых зародышах в течение первых 5 дней увеличивалось в 70 раз.

В первые дни культивирования происходило значительное увеличение содержания цитокининов ряда 2иП и ИПА в культивируемых зародышах.

*Содержание фитогормонов в каллусной ткани после 15 дней культивирования на индукционной питательной среде*

Культивирование в течение 15 дней приводило к увеличению содержания ИУК в зародышах, на поверхности которых формировался эмбриогенный каллус, в 1200 раз. Зародыши, не способные к соматическому эмбриогенезу, имели уровень ИУК значительно ниже, увеличение составило 190 раз.

Содержание АБК в культивируемых зародышах, способных к эмбриогенезу, было высоким – 2638 нг/г сухого веса. Зародыши, не способные к соматическому эмбриогенезу, имели уровень АБК 1454 нг/г сухого веса.

К 15-му дню культивирования содержание зеатина и зеатин-рибозида в зародышах, способных к индукции соматического эмбриогенеза, было 10 505 нг/г сухого веса. Зародыши, не способные к соматическому эмбриогенезу, имели уровень 12 094 нг/г сухого веса.

Содержание цитокининов ряда 2иП и ИПА в зародышах, формирующих эмбриогенный

каллус, было 65 304 нг/г сухого веса. Зародыши, не способные к соматическому эмбриогенезу, имели уровень 2иП и ИПА 68 902 нг/г сухого веса. Количество эндогенных цитокининов ряда 2иП и ИПА в культивируемых зародышах, способных образовывать эмбриогенный каллус, в течение первых 15 дней увеличилось в 16 326 раз.

*Содержание фитогормонов в каллусной ткани после 28 дней культивирования на индукционной питательной среде*

В зародышах, не способных формировать эмбриогенный каллус, содержание ИУК достигало 27 000 нг/г сухого веса. Содержание ИУК в эмбриогенном каллусе – 74 нг/г сухого веса.

Содержание АБК в эмбриогенном каллусе достигало 1241 нг/г сухого веса, что значительно превышало содержание ее в каллусе, не способном образовывать эмбриогенный каллус.

Эмбриогенный каллус содержал зеатина и зеатин-рибозида 4256 нг/г сухого веса, что в два раза меньше, чем у зародышей, не способных к органогенезу.

Зародыши, не способные к органогенезу, содержали цитокинины ряда 2иП и ИПА 62 840 нг/г сухого веса. В эмбриогенном каллусе – 1029 нг/г сухого веса.

**Обсуждение**

Одним из факторов, влияющих на дифференцировку клетки, является воздействие фитогормонов. По нашим данным [Хмара, 2011], способность зародышей *in vitro* к органогенезу зависит от соотношения цитокининов к АБК в культивируемых тканях, а при индукции соматического эмбриогенеза основную роль играет ИУК.

### Содержание ИУК

В первые дни культивирования зародышей в условиях, стимулирующих образование эмбриогенного каллуса, происходило увеличение содержания ИУК в тканях. Аналогичные данные были получены при индукции органогеनेза [Хмара, 2011]. К 15-му дню культивирования уровень ИУК в тканях превосходил исходный уровень более чем в 1000 раз. По нашим данным [Хмара, 2011], при индукции органогеनेза содержание ИУК к 12-му дню культивирования увеличивалось в 166 раз. К концу пассажа содержание ИУК в тканях при индукции соматического эмбриогенеза было таким же, как и при индукции органогеनेза. В зародышах, способных образовывать эмбриогенный каллус, содержалось в 5–6 раз больше ИУК, чем у зародышей, не способных к соматическому эмбриогенезу. В эмбриогенном каллусе содержание ИУК было низким и соответствовало исходному уровню в зародышах. Вагнер [Vagner et al., 1999] отмечал в эмбриогенном каллусе *Norway spruce* пониженное содержание ИУК. Полученные нами и литературные данные свидетельствуют о влиянии концентрации ИУК на способность тканей зародыша к соматическому эмбриогенезу, но при этом сам эмбриогенный каллус содержал значительно меньшее количество ИУК.

### Содержание АБК

После 5 дней культивирования содержание АБК в тканях зародыша снижалось. По нашим данным [Хмара, 2011], снижение содержания АБК на первом этапе культивирования – необходимое условие для начала развития зародышей *in vitro*. При дальнейшем культивировании происходило увеличение уровня АБК. При индукции органогеनेза у зародышей *in vitro* наблюдается увеличение содержания АБК в культивируемых тканях, связанное с интенсивным накоплением биомассы [Хмара, 2011]. К 28-му дню культивирования уровень ее снижался. Содержание АБК у зародышей, способных образовывать эмбриогенный каллус, было в два раза выше, чем у зародышей, не способных к эмбриогенезу. В самом эмбриогенном каллусе наблюдался достаточно высокий уровень АБК. Конг [Kong et al., 1997] наблюдал высокое содержание АБК в зиготических эмбриоидах. Таким образом, на первом этапе развития зародыша происходит снижение содержания АБК в тканях, при дальнейшем культивировании происходит накопление АБК в тканях, но при этом в эмбриогенном каллусе наблюдалось высокое содержание АБК.

### Содержание цитокининов

Содержание цитокининов группы зеатинов в культивируемых зародышах возрастало первые 5 дней культивирования. При дальнейшем культивировании содержание их существенно не менялось. Содержание цитокининов группы изопентениладенина к 5-му дню культивирования значительно возрастало, а к 15-му дню культивирования происходило значительное увеличение содержания их в тканях экспланта и превышало уровень содержания их на 5-й день культивирования более чем в 30 раз. По нашим данным [Хмара, 2011], при индукции органогеनेза у зародышей увеличивалось количество цитокининов группы зеатинов. К концу пассажа содержание цитокининов группы изопентениладенина также было достаточно высоким. Эмбриогенный каллус содержал значительно меньшее количество цитокининов по сравнению с каллусной тканью зародышей. Полученные данные показали, что одним из условий формирования эмбриогенного каллуса является высокое содержание цитокининов в культивируемых зародышах. Полученные данные показали, что эмбриогенный каллус содержит значительно меньшее количество цитокининов, чем культивируемая ткань зародышей.

Основным фактором, вызывающим индукцию эмбриогенного каллуса, является высокое содержание фитогормонов в культивируемых зародышах. При этом сам эмбриогенный каллус имел низкое содержание фитогормонов, лишь содержание АБК в нем было достаточно высоким. Данный фактор указывает на то, что эмбриогенный каллус обладает автономной гормональной регуляцией, так как даже высокое содержание фитогормонов в питательной среде не способно значительно повысить уровень фитогормонов в эмбриогенном каллусе.

Значительные отличия в содержании фитогормонов между каллусной тканью зародышей, способных образовывать эмбриогенный каллус, и каллусной тканью зародышей, не способных формировать эмбриогенный каллус, говорят о том, что не только влияние экзогенных фитогормонов определяет путь развития экспланта, но и способность самих тканей к биосинтезу эндогенных гормонов определяет путь развития экспланта в культуре ткани.

Существование градиента концентраций фитогормонов – больших различий между эмбриогенным и неэмбриогенным каллусами, а также между зародышами, способными образовывать эмбриогенный каллус,

и зародышами, не способными образовывать его, свидетельствует:

- об определенной роли складывающегося гормонального баланса в индукции морфогенеза *in vitro*;
- об особой роли чувствительности тканей зародышей к регуляторам роста, которые определяют его компетентность и готовность воспринимать экзогенный гормональный сигнал и реагировать на него определенным образом.

## Литература

Белоруссова А. С., Третьякова И. Н. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты // Онтогенез. 2008. Т. 39, № 2. С. 106–115.

Бутенко Р. Г. Гормональная регуляция дифференцировки растительной клетки в культуре *in vitro* // Рост и гормональная регуляция жизнедеятельности растений. Иркутск: Наука, 1974, С. 67–85.

Катаева Н. В., Александрова И. Г., Карягина Т. Б., Машкова А. Х. Возможности метода иммуноферментного анализа для определения фитогормонов в культивируемых *in vitro* побегах // Физиология растений. 1990. Т. 37, № 4. С. 813–821.

Кулаева О. Н. Цитокинины, их структура и функции. М.: Наука, 1973. 264 с.

Меняйло Л. Н. Гормональная регуляция ксилогенеза хвойных. Новосибирск: Наука, 1987. 185 с.

Полевой В. В. Фитогормоны. Ленинград: ЛГУ, 1982. 183 с.

Третьякова И. Н., Ижболдина М. В. Особенности роста эмбрионного каллуса и получение соматических зародышей у кедра сибирского // Хвойные бореальной зоны. 2008. Т. 25, № 1–2. С. 71–76.

Третьякова И. Н., Барсукова А. В. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы // Онтогенез. 2012. Т. 43, № 6. С. 425–435.

Хмара К. А. Динамика содержания фитогормонов в каллусной ткани при индукции органогенеза *in vitro* зародышей *Picea abies* L. Karst // Труды КарНЦ РАН. 2011. № 3. С. 131–136.

Чайлахян М. Х., Ложникова В. Н. Фитогормоны и цветение растений // Регуляторы роста и развития растений. Киев, 1989. С. 117–132.

Шалаев Е. А., Третьякова И. Н. Индукция соматического эмбриогенеза у ели саянской в культуре *in vitro* // Хвойные бореальной зоны. 2011. Т. 28, № 1–2. С. 69–71.

Весвар М., Noland T., Wann S. Somatic embryo development and plant regeneration from embryogenic

Norway spruce callus // Tappi, 1987. Vol. 70, No 2. P. 155–160.

Burrows W. Cytokinins // Biochem. Soc. Trans, 1978. Vol. 6. P. 1395–1400.

Hmara K. A., Kataeva N. V. Effect of plant genotype and cytokinin-like substances Norway Spruce (*Picea abies* L.) *in vitro* organogenesis // Russian Journal of Plant Physiology. 1993. Vol. 40, No 5. P. 802–803.

Kong L., Attree S. M., Fowke L. C. Changes of endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophytes in *Picea glauca* // Physiol. Plant. 1997. Vol. 101. P. 23–30.

Label Ph., Sotta B., Miginiac E. Endogenous levels of ABA and IAA during *in vitro* rooting of Wild Cherry explants produced by micropropagation // Plant Growth Red. 1989. Vol. 8. P. 325–333.

Latkowska M. J., Rakowski K. Endogenous levels of phytohormones in the embryogenic tissue of Norway spruce // Quality enhancement of plant production through tissue culture. Working Group 2, Advanced propagation techniques. Inaugural meeting in Tampere. (Finland, 7–10 July. 2000 г.). Finland, 2000. P. 23–25.

Mohan C. J., Wenton R. J., Soltes E. J. Enhancement of somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies* L.) // Theor Appl Genet. 1988. Vol. 76, No 4. P. 501–506.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 5, No 95. P. 473–497.

Rodbard D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays // Clin. Chem. 1974. Vol. 20, No 8. P. 1255–1261.

Skoog F., Miller W. Chemical regulation of growth and organ formation *in vitro* // Symp. Soc. Exp. Biol., 1957. Vol. 11. P. 118–121.

Stabel P., Eriksson T., Engstrom P. Changes in Protein Synthesis upon Cytokinin-Mediated Adventitious Bud Induction and during Seedling Development in Norway Spruce, *Picea abies* // Plant Physiology. 1990. Vol. 92. P. 1174–1183.

Vagner M., Vondrakova Z., Spackova J. et al. Norway spruce somatic embryogenesis: Endogenous levels of phytohormones during somatic embryo development // In: Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21 Century (Altman A. et al. eds.), Kluwer Ac. Publ., Netherlands. 1999. P. 93–96.

von Arnold S. Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. // J. Plant Physiol. 1987. Vol. 128, No 2. P. 233–244.

Walton D. Biochemistry and physiology of abscisic acid // Annu. Rev. Plant Physiol. 1980. Vol. 31. P. 453–489.

Поступила в редакцию 02.11.2015

## References

Belorussova A. S., Tret'yakova I. N. Osobennosti formirovaniya somaticheskikh zarodyshej u listvennicy sibirskoj: ehmbriologicheskie aspekty [Patterns of somatic embryo formation in Siberian larch: embryological

aspects]. *Ontogenez* [Russ. J. Developmental Biol.]. 2008. Vol. 39, No 2. P. 106–115.

Chajlahyan M. H., Lozhnikova V. N. Fitogormony i cvetenie rastenij [Phytohormones and flowering of

plants]. Regulyatory rosta i razvitiya rastenii [Regulators of growth and development in plants]. Kiev, 1989. P. 117–132.

Hmara K. A. Dinamika sodержaniya fitogormonov v kallusnoj tkani pri indukcii organogeneza *in vitro* zarodyshej *Picea abies* L. Karst [Dynamics of phytohormones in callus tissue during the induction of organogenesis in embryos of *Picea abies* L. Karst *in vitro*]. *Trudy KarNC RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2011. No 3. P. 131–136.

Kataeva N. V., Aleksandrova I. G., Karyagina T. B., Mashkova A. H. Vozmozhnosti metoda immunofermentnogo analiza dlya opredeleniya fitogormonov v kul'tiviruemyh *in vitro* pobegah [Possibilities of enzyme-linked immunosorbent assay for determining phytohormones in *in vitro* grown shoots]. *Fiziologiya rastenij* [Russ. J. Plant Physiol.]. 1990. Vol. 37, No 4. P. 813–821

Kulaeva O. N. Citokininy, ih struktura i funkcii [Cytokinins, their structure and functions]. Moscow: Nauka, 1973. P. 9–23.

Menyajlo L. N. Gormonal'naya regulyaciya ksilogeneza hvojnnyh [Hormonal regulation of xylogenesis in conifers]. Novosibirsk: Nauka, 1987. 185 p.

Polevoj V. V. Fitogormony [Phytohormones]. Leningrad: LGU, 1982. 183 p.

Shalaev E. A., Tret'yakova I. N. Indukciya somaticheskogo ehmbriogeneza u eli ayanskoj v kul'ture *in vitro* [Induction of somatic embryogenesis by *Picea ajanensis* in culture *in vitro*]. *Hvojnnye boreal'noj zony* [Conifers of the boreal zone]. 2011. Vol. 28, No 1–2. P. 69–71.

Tret'yakova I. N., Barsukova A. V. Somaticheskij ehmbriogenez v kul'ture *in vitro* trekh vidov listvennicy [Somatic embryogenesis in *in vitro* culture of three larch species]. *Ontogenez* [Russ. J. Developmental Biol.]. 2012. Vol. 43, No 6. P. 425–435.

Tret'yakova I. N., Izhboldina M. V. Osobennosti rosta ehmbriogenenogo kallusa i poluchenie somaticheskikh zarodyshej u kedra sibirskogo [Peculiarities of embryogenic callus growth and obtaining somatic embryos of *Pinus sibirica*]. *Hvojnnye boreal'noj zony* [Conifers of the boreal zone]. 2008. Vol. 25, No 1–2. P. 71–76.

Becwar M., Noland T., Wann S. Somatic embryo development and plant regeneration from embryogenic Norway spruce callus. *Tappi*, 1987. Vol. 70, No 2. P. 155–160.

Burrows W. Cytokinins. *Biochem. Soc. Trans.*, 1978. Vol. 6. P. 1395–1400.

Hmara K. A., Kataeva N. V. Effect of plant genotype and cytokinin-like substances Norway Spruce (*Picea*

*abies* L.) *in vitro* organogenesis. *Russian Journal of Plant Physiology*. 1993. Vol. 40, No 5. P. 802–803.

Kong L., Attree S. M., Fowke L. C. Changes of endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophytes in *Picea glauca*. *Physiol. Plant*. 1997. Vol. 101. P. 23–30.

Label Ph., Sotta B., Miginiac E. Endogenous levels of ABA and IAA during *in vitro* rooting of Wild Cherry explants produced by micropropagation. *Plant Growth Red.* 1989. Vol. 8. P. 325–333.

Latkowska M. J., Rakowski K. Endogenous levels of phytohormones in the embryogenic tissue of Norway spruce. Quality enhancement of plant production through tissue culture. Working Group 2. Advanced propagation techniques. Inaugural meeting in Tampere. (Finland, 7–10 July, 2000 r.). Finland, 2000. P. 23–25.

Mohan C. J., Wenton R. J., Soltes E. J. Enhancement of somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea adies* L.). *Theor Appl Genet*. 1988. Vol. 76, No 4. P. 501–506.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 5, No 95. P. 473–497.

Rodbard D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays. *Clin. Chem*. 1974. Vol. 20, No 8. P. 1255–1261.

Skoog F., Miller W. Chemical regulation of growth and organ formation *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1957. Vol. 11. P. 118–121.

Stabel P., Eriksson T., Engstrom P. Changes in Protein Synthesis upon Cytokinin-Mediated Adventitious Bud Induction and during Seedling Development in Norway Spruce, *Picea abies*. *Plant Physiol*. 1990. Vol. 92. P. 1174–1183.

Vagner M., Vondrakova Z., Spackova J., Cvikrova M., Eder J., Lipavska H., Albrechtova J., Svobodova H., Machackova I. Norway spruce somatic embryogenesis: Endogenous levels of phytohormones during somatic embryo development. In: *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21 Century* (Altman A. et al. eds.), Kluwer Ac. Publ., Netherlands. 1999. P. 93–96.

von Arnold S. Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *J. Plant Physiol*. 1987. Vol. 128, No 2. P. 233–244.

Walton D. Biochemistry and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 1980. Vol. 31. P. 453–489.

Received November 02, 2015

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ:

### Хмара Константин Алексеевич

научный сотрудник, к. б. н.

Институт экологических проблем Севера УрО РАН

Набережная Северной Двины, 23, Архангельск,

Россия, 163000

эл. почта: KAX1961@yandex.ru

## CONTRIBUTOR:

### Hmara, Konstantin

Institute of Ecological Problems of the North,

Ural Branch, Russian Academy of Sciences

23 Severnaya Dvina Emb.,

163000 Arkhangelsk, Russia

e-mail: KAX1961@yandex.ru