

ОРИГИНАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

УДК 630\*161.6: 582.475.2: 631.532

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ ЛИСТВЕННИЦ  
И КЕДРА СИБИРСКОГО В СИБИРИ\*

© 2012 г. И. Н. Третьякова, А. В. Барсукова

Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН

660036 Красноярск, Академгородок

E-mail: culture@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 01.03.2011 г.

Процесс соматического эмбриогенеза у *Larix sibirica*, *L. gmelinii*, *L. sukaczewii* и *Pinus sibirica* в культуре *in vitro* состоит из индукции эмбрионного каллуса, пролиферации эмбриональной массы, созревания соматических зародышей и их прорастания. Все эти этапы у разных видов хвойных шли под действием регуляторов роста в определенной концентрации и их разном соотношении друг с другом. Получены четыре эмбрионных клеточных линий у лиственницы Сукачева, которые отличались пролиферативной активностью. Успех соматического эмбриогенеза зависел от срока развития зародышей, используемых для индукции эмбрионного каллуса, эксплантов, компонентов питательной среды, гормональной регуляции и дерева-донора.

*Соматический эмбриогенез, питательная среда, гормоны, Larix sibirica, L. gmelinii, L. sukaczewii, Pinus sibirica.*

В последнее десятилетие произошел значительный прогресс в области размножения древесных растений в культуре *in vitro*. Наиболее интересные результаты были получены при исследовании соматического эмбриогенеза, с помощью которого изучались процессы морфогенеза (тотипотентность, детерминация, дифференциация), проводились молекулярные и генетические исследования, а также осуществлялось массовое тиражирование улучшенных генотипов растений [9, 10, 12–14, 17–20].

Впервые у голосеменных растений соматический эмбриогенез был получен в 1985 г. у *Picea abies* [7, 8]. К настоящему времени регенерация растений посредством соматического эмбриогенеза у хвойных была описана у 16 видов рода *Pinus*, 11 видов рода *Picea*, 4 видов и 2 гибридов рода *Abies*, у 6 видов и гибридов рода *Larix*, а также у *Pseudotsuga menziesii* [9]. В качестве источника соматических клеток для индукции соматического эмбриогенеза у хвойных использовали

мегагаметофиты, зрелые и незрелые зародыши и их отдельные органы (семядоли и гипокотиль), хвою молодых растений [7, 12, 13, 19], а также сегменты вегетативных побегов взрослых деревьев [15].

Несмотря на активные исследования по соматическому эмбриогенезу у хвойных в последние годы, регенерация растений путем соматического эмбриогенеза все еще остается проблематичной для ряда видов. Критическим моментом является переключение соматических клеток на путь соматического эмбриогенеза и созревание соматических зародышей, а также получение полноценных зародышей, способных к прорастанию.

Исследования соматического эмбриогенеза у хвойных видов в России начали проводить в начале XXI в. в Институте леса СО РАН (г. Красноярск). Были показаны особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской (эмбриологические аспекты). Выявлено, что первым цитологическим маркером соматического эмбриогенеза у этого вида является растяжение соматических клеток зиготического зародыша, их неравное деление и образование маленьких инициальных клеток и клеток трубки. В дальнейшем инициальные клетки делились и формировали глобулы соматических зародышей [2].

\* При финансовой поддержке РФФИ (проекты № 08-04-00107, № 09-04-98008) и интеграционного проекта фундаментальных исследований УРО и ДВЦ РАН N 53 “Генофонд хвойных Урала и Сибири: структура организации, принципы сохранения ценного генофонда сибирских видов хвойных с помощью инноваций и использование в селекционных программах”

Цель настоящего изучения заключалась в оптимизации протокола получения соматических зародышей и растений у представителей родов *Larix* и *Pinus*, основных лесообразователей Сибири, и проведении цитоэмбриологического контроля соматического эмбриогенеза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служили 13 деревьев сосны сибирской (кедра сибирского, *Pinus sibirica* Du Tour), произрастающих в естественном древостое Западного Саяна, и 3 клона (каждый включает 12–15 рамет), произрастающих на клоновой прививочной плантации Западно-Саянского опытного лесного хозяйства, а также 25 деревьев лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), 10 деревьев лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) и 4 дерева лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Dylis), произрастающих на территории дендрария Института леса СО РАН.

В качестве материала для индукции соматического эмбриогенеза были взяты изолированные зиготические зародыши на стадии глобулярного зародыша, инициации и развития семядолей, а также зрелые семена. Сбор посадочного материала осуществляли с июля по август в 2007–2009 гг. Семена очищали от покровных чешуй, поверхностно стерилизовали 5%-м спиртовым раствором йода в течение 3 мин. После 3 – кратной промывки в стерильной дистиллированной воде мегагаметофиты обрабатывали перекисью водорода в течение 5–10 мин. Зародыши извлекали из мегагаметофитов в стерильных условиях, помещали на увлажненную фильтровальную бумагу в чашках Петри и затем переносили на питательную среду.

*Индукция эмбриогенного каллуса (ЭК).* Для инициации эмбриогенного каллуса у видов лиственницы использовали минеральные основы базовых сред  $\frac{1}{2}$  MS [16], MSG [4], АИ (патент №2431651), для сосны сибирской применяли среды LV,  $\frac{1}{2}$  LV, MS, и DCR с добавлением мезоинозита ( $0.1-1 \text{ г л}^{-1}$ ), аскорбиновой кислоты ( $0.4 \text{ г л}^{-1}$ ), казеина ( $1 \text{ г л}^{-1}$ ), L-глутамин ( $0.5 \text{ г л}^{-1}$ ), сахарозы ( $30 \text{ г л}^{-1}$ ) и агара ( $7 \text{ г л}^{-1}$ ). В качестве регуляторов роста использовали 2,4-Д ( $2 \text{ мг л}^{-1}$ ) и БАП ( $1 \text{ мг л}^{-1}$ ). Водородный показатель среды приводили к 5.8 до автоклавирования при  $121^\circ\text{C}$ , 110 кПа в течение 20 мин. В каждой чашке Петри культивировали 5 зародышей на 20 мл индукционной среды в темноте при  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

*Пролиферация эмбриональной массы (ЭМ).* Для пролиферации ЭМ применяли указанные базовые среды, содержащие 2,4-Д ( $2 \text{ мг л}^{-1}$ ), БАП

( $0.5 \text{ мг л}^{-1}$ ) и сахарозу ( $20 \text{ г л}^{-1}$ ). Культуры инкубировали в темноте при температуре  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . Пересадки на свежую питательную среду проводили каждые 14 дней.

*Предсозревание соматических зародышей.* Через 7 дней после субкультивирования на пролиферационной среде кусочки активно растущей ЭМ весом 100–300 мг, переносили на безгормональную базовую среду (АИ) с активированным углем ( $10 \text{ г л}^{-1}$ ) и повышенным содержанием сахарозы ( $34 \text{ г л}^{-1}$ ) для остановки пролиферации и перехода соматических зародышей к вызреванию. Экспланты культивировали в течение 1 недели на свету малой интенсивности ( $10 \text{ мк моль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ ) при 16-часовом фотопериоде.

*Созревание соматических зародышей.* Эксперименты по созреванию соматических зародышей лиственницы выполняли на базовой среде АИ, содержащей сахарозу ( $40-60 \text{ г л}^{-1}$ ), АБК ( $40-60 \text{ мк моль}$ ), ИМК ( $1 \text{ мкмоль}$ ) и ПЭГ ( $5-10\%$ ) в различных вариациях (табл. 1). В качестве желирующего агента использовали Gelrite ( $3-4 \text{ г л}^{-1}$ ). Культивирование осуществляли на свету малой интенсивности ( $20 \text{ мк моль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ ) при 16-часовом фотопериоде, при  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Регуляторы роста растений (АБК и ИМК) и L-глутамин стерилизовали фильтрованием и добавляли в охлажденную питательную среду после автоклавирования.

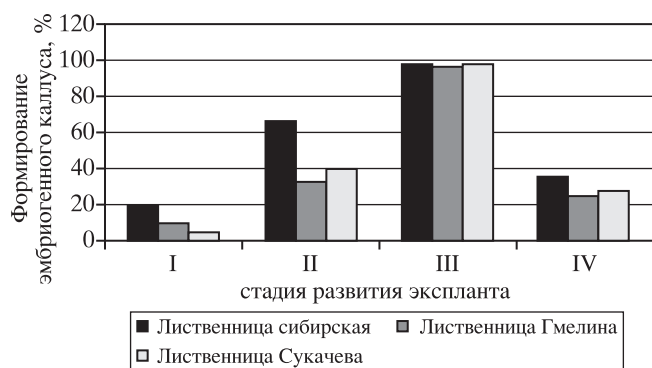
*Прорастание соматических зародышей.* Для прорастания соматических зародышей лиственницы использовали базовую питательную среду АИ, свободную от растительных регуляторов роста, дополненную активированным углем ( $10 \text{ г л}^{-1}$ ) и сахарозой ( $34 \text{ г л}^{-1}$ ). Соматические зародыши считали проросшими, как только наблюдалось появление корешка. Полученные растения-регенеранты помещали в увлажненную экопочву (песок : вермикулит : торф в соотношении 1:1:1).

*Цитологический анализ.* Для проведения цитологического анализа использовали давленные препараты. Для их приготовления экспланты помещали на предметное стекло и 1–2 мин выдерживали в красителе (сафранин с добавлением метиленового синего). Далее добавляли глицерин, и накрывали препарат покровным стеклом.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Соматический эмбриогенез видов лиственницы

*Индукция ЭК и пролиферация ЭМ.* При введении в культуру *in vitro* эксплантов зародышей семян видов лиственницы (на глобулярной стадии



**Рис. 1.** Формирование каллуса из зиготических зародышей видов лиственницы на различных стадиях развития: стадия I – глобулярный зародыш, стадия II – инициация семядолей, стадия III – развитое семядольное кольцо, IV – зрелый зародыш

развития, их нициации, развитых семядолей и зрелых зародышей) наиболее интенсивно образование ЭК происходило на предпоследней стадии (96–98%) (рис. 1). Активная пролиферация ЭК была обнаружена только у лиственницы Сукачева генотипа С<sub>1</sub> на среде АИ – у 18% эксплантов.

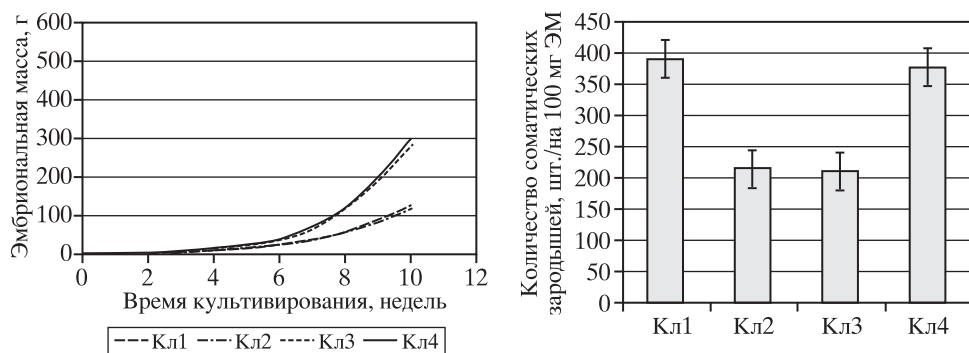
Морфологические наблюдения за формированием ЭК показали, что его индукция происходила на 8–14-е сутки культивирования. Образование ЭК происходило равномерно по всей поверхности зародыша или в области зародышевого корешка. Полученный каллус имел белый цвет, рыхлую бугристую структуру.

У генотипа С<sub>1</sub> лиственницы Сукачева были получены четыре клеточных линий (Кл) на среде АИ из зародышей семян от свободного опыления, в которых шло активное образование соматических зародышей: Кл 1 (08-03-00-01) получена в 2008 г., Кл 2 (09-03-00-02), Кл 3 (09-03-00-03) и Кл 4 (09-03-00-04) – в 2009 г.

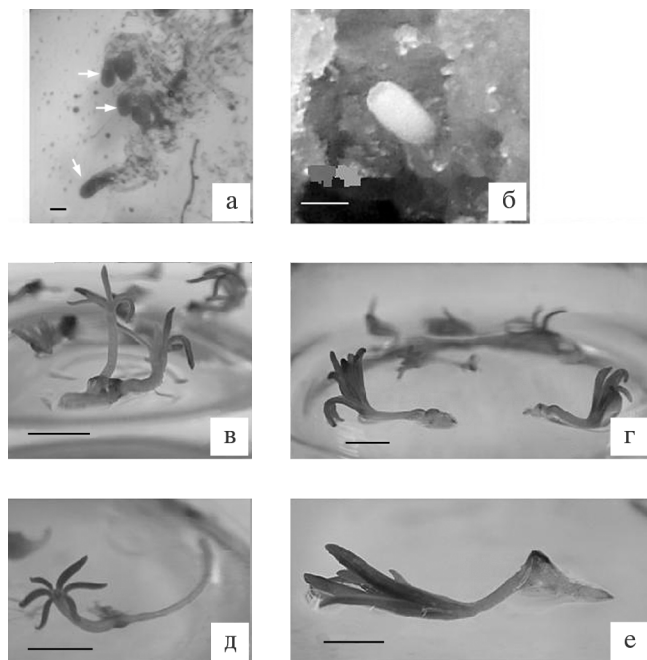
Кл отличались по пролиферационной активности. Вес ЭМ у лиственницы Сукачева от одного экспланта Кл 1 через 4 недели пролиферации достиг 12.2 г, у Кл 3 – 16.5 г (рис. 2). Интенсивность прироста ЭК лиственниц сибирской и Гмелина была значительно ниже: у лиственницы Гмелина от  $0.165 \pm 0.005$  до  $0.467 \pm 0.005$  у разных деревьев, у лиственницы сибирской от  $0,150 \pm 0,005$  до  $0,350 \pm 0,005$ . Через шесть недель культивирования вес ЭМ лиственницы Сукачева превышал массу ЭК лиственницы Гмелина более чем в 77 раз. Спада пролиферационной активности за 18 месяцев культивирования у лиственницы Сукачева не наблюдалось. Число соматических зародышей в 100 мг пролиферирующей ЭМ лиственницы Сукачева варьировало (рис. 2) от 210 (Кл 3) до 390 шт (Кл 1). Число соматических зародышей в эмбрионных каллусах у лиственниц сибирской и Гмелина было значительно ниже: в 185 раз ( $1 \pm 0.6$ ) и в 5 раз ( $75 \pm 5.6$ ) соответственно.

*Цитозембриологический контроль соматического эмбриогенеза.* Исследования показали, что формирование каллуса у всех видов лиственницы идет одинаково и начинается с удлинения клеток экспланта и их неравного деления. Именно неравное деление клеток является ключевым моментом, запускающим весь процесс соматического эмбриогенеза. В результате такого деления происходит образование длинной эмбриональной трубки, длиной 200 мкм и прилегающей к ней на одном из концов эмбриональной инициали. Подобно зиготическому эмбриогенезу клетки эмбриональной инициали активно делятся и формируют глобулярную структуру зародыша (рис. 3).

*Созревание соматических зародышей.* Введение ЭК лиственниц сибирской и Гмелина на питательные среды для созревания соматических зародышей не привело к формированию зрелых



**Рис. 2.** Проллиферация эмбриональной массы (ЭМ) клеточных линий Кл 1- Кл 4 *Larix sukaczewii* (А) и содержание соматических зародышей в пролиферирующей ЭМ (Б).



**Рис. 3.** Соматический эмбриогенез у *Larix sukaczewi*: а – соматические зародыши на глобулярной стадии; б – зрелый соматический зародыш через пять недель культивирования; в, г – соматические проростки через 2 недели на среде без гормонов; д – эпикотиль через 3 недели культивирования на среде без гормонов; е – соматические проростки через 2 месяца культивирования. Масштаб: 5 мм.

зародышей. Использование среды с небольшой концентрацией АБК ( $5 \text{ мг л}^{-1}$ ) вызвало потерю эмбриогенной способности и переход ЭК к автотрофному типу питания – культуры приобретали зеленую окраску. На питательных средах с более высокими концентрациями АБК ( $15\text{--}24 \text{ мг л}^{-1}$ ) созревания соматических зародышей также не происходило.

Таким образом, формирования зрелых соматических зародышей у лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина на используемых средах, рекомендуемых зарубежными авторами для созревания соматических зародышей лиственницы европейской и ее гибридов [13], не отмечено.

Созревание соматических зародышей лиственницы Сукачева проводили на среде АИ с использованием различных концентраций АБК, ПЭГ, Gelrite и сахарозы. При этом на среде, содержащей АБК ( $16 \text{ мг л}^{-1}$ ), повышенную концентрацию сахарозы ( $60 \text{ г л}^{-1}$ ) и Gelrite ( $7 \text{ г л}^{-1}$ ), развитие соматических зародышей не происходило (таблица). Наблюдалось иссушение ЭМ, соматические зародыши не переходили к созреванию и погибали. Применение в качестве осмотического агента ПЭГ оказалось более продуктивным. Однако низ-

кие его концентрации ( $5\text{--}7.5\%$ ) все же были мало пригодными для созревания соматических зародышей: в этом случае наблюдались обводнение и деградация ЭМ, соматические зародыши распались на отдельные клетки.

Оптимальной для развития соматических зародышей оказалась среда, содержащая  $32 \text{ мг л}^{-1}$  АБК,  $0.2 \text{ мг л}^{-1}$  ИМК,  $10\%$  ПЭГ,  $40 \text{ г л}^{-1}$  сахарозы и  $4 \text{ г л}^{-1}$  Gelrite. На данной среде уже через 3–4 недели культивирования происходило формирование семядольных соматических зародышей. ЭМ к этому времени уже состояла из глобулярных зародышей, а также зародышей на стадии торпеды, длина которых достигала  $400 \text{ мкм}$ . Через две недели культивирования соматические зародыши увеличивались в размерах до  $0.4\text{--}0.7 \text{ мм}$ , происходили закладка и формирование семядольного кольца. На 50 сутки культивирования на среде для созревания соматические зародыши достигали размера в длину  $1.1\text{--}1.5 \text{ мм}$ , имели хорошо выраженную биполярную структуру тела и полностью сформированные семядоли (рис. 3).

Для перехода соматических зародышей клеточных линий лиственницы к созреванию использовали предобработку ЭМ в жидкой питательной среде. После такой обработки даже спустя 14 месяцев активной пролиферации у Кл 1 удалось повторно получить зрелые соматические зародыши. При данной технике культивирования ЭМ также происходило более массовое формирование зрелых соматических зародышей.

Сроки появления зрелых соматических зародышей сильно варьировали в зависимости от экспланта. Так, для созревания соматических зародышей у Кл 1 требовалось 38–41 день, для Кл 2 – 48–55 дней и для Кл 3 – 60 и более дней. У Кл 4 созревания соматических зародышей даже спустя три месяца культивирования на среде АИ не происходило.

*Прорастание соматических зародышей.* Соматические зародыши с хорошо развитыми семядолями переносили на среду для прорастания (АИ базового состава, без растительных регуляторов роста с добавлением активированного угля ( $10 \text{ мг л}^{-1}$ )). Через 7–10 дней культивирования происходило удлинение гипокотеля и развитие семядолей. Еще через несколько дней наблюдалось развитие корешка (на свету гипокотиль и корешок приобретали красный оттенок). Однако в  $90\%$  случаев нормального развития растений не происходило – гипокотиль изгибался или утолщался, а вместо корня формировался каллус. Такие проростки были нежизнеспособными и погибали.

**Таблица.** Число соматических зародышей лиственницы Сукачева на различных вариантах состава питательной среды

Эксперимент	АБК,	ПЭГ,	Сахароза,	Gelrite	ИМК,	Число зародышей на 500мг ЭМ
	мг л <sup>-1</sup>	%	г л <sup>-1</sup>	г л <sup>-1</sup>	мг л <sup>-1</sup>	
1	16	5	40	4	0.2	0
2	16	7.5	40	4	0.2	0
3	16	10	40	4	0.2	1
4	24	5	40	4	0.2	0
5	24	7.5	40	4	0.2	0
6	24	10	40	4	0.2	2
7	32	5	40	4	0.2	0
8	32	7,5	40	4	0.2	4
9	32	10	40	4	0.2	30
10	32	0	60	8	0.2	0
11	16	10	40	4	0	1
12	16	0	60	7	0	0

Снижение концентрации макро-, микроэлементов и железа (в два раза), а также исключение источников органического азота и витаминов положительно сказывались на прорастании соматических зародышей – в 70% происходило нормальное развитие соматических зародышей в проростки. На данной среде на пятые-седьмые сутки культивирования отмечены удлинение гипокотыля и появление корешка (рис. 3).

Появление эпикотыля происходило через две-три недели культивирования на среде для прорастания (рис. 3). Соматические зародыши с хорошо развитым корешком и эпикотилем считали полноценными растениями и переносили в экочуву.

Таким образом, впервые были получены пять клеточных эмбриогенных линий лиственницы Сукачева, способных продуцировать массовые соматические зародыши.

#### Соматический эмбриогенез сосны сибирской

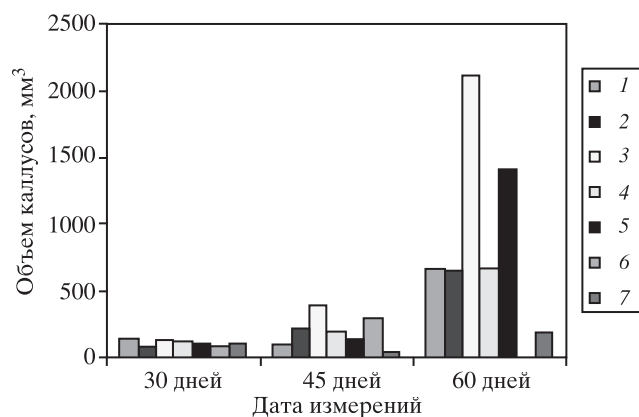
При введении в культуру незрелых изолированных зародышей сосны сибирской на глобулярной стадии развития наблюдалось образование ЭК только в 7–10% случаев. Наиболее активное формирование ЭК (75–80%), также как у видов лиственницы, шло на предсемядольной и более поздних стадиях развития, когда длина зиготического зародыша составляла 3–4 мм, то есть зародыш занимал половину длины коррозийной полости (конец июля – начало августа).

Показано, что состав питательной среды не оказывает влияния на индукцию соматического эмбриогенеза у сосны сибирской. Однако на второй недели пролиферации (45-й день) рост каллусов, культивируемых на среде 1/2LV, усилился и

на 60-й день пролиферации объем ЭК на данной среде был значительно больше каллусов, культивируемых на других типах сред (рис. 4).

На среде LV процессы инициации и пролиферации ЭК у зародышей семян деревьев сосны сибирской усиливаются. Через 1 месяц пролиферации вес ЭК у большинства опытных образцов сосны сибирской составил от 0.3 г до 0.76 г.

Цитологический контроль формирующегося каллуса сосны сибирской показал, что на 7–10 сутки культивирования происходило удлинение соматических клеток, их асимметричное деление и образование глобул соматических зародышей. Также как у видов лиственницы, у сосны сибирской на среде LV был получен каллус, однако дальнейшее развитие эмбриогенных структур не происходило.



**Рис. 4.** Динамика роста каллусов из зародышей семян сосны сибирской на различных типах питательных сред. 1 – MS, 2 – 1/2MS, 3 – LV, 4 – 1/2LV, 5 – DCR, 6 – АИ, 7 – WPM.

Образование ЭК и развитие соматических зародышей у видов лиственницы и сосны сибирской в основном идет по схеме, описанной для других видов хвойных [10, 12, 13, 20]. Соматические зародыши проходят фазу инициации, пролиферации, созревания и прорастания.

Необходимым условием для запуска соматического эмбриогенеза видов лиственницы и сосны сибирской, также как и других видов хвойных, является растяжение соматических клеток зиготического зародыша и их асимметричное деление, которое идет под действием ауксина (2,4-Д) и цитокинина (6-БАП) [2, 20, 22]. Точно такое же асимметричное деление лежит в основе зиготического эмбриогенеза всех видов растений [1]. Природа такого феномена остается не выясненной. Можно предположить, что в растягивающихся клетках – “клетках-трубках” идет избыточное накопление ДНК, на которое указывал Д. Мэзия [3]. По мнению этого ученого, при накоплении достаточного количества ДНК в клетках (эндополиплоидные клетки) они могут подвергаться многократным делениям. Не исключено, что такой процесс лежит в основе образования глобул соматических зародышей, которые со всех сторон окружены эмбриональными трубками, выполняющих функцию суспензора [2]. Формируется эмбрионально-суспензорная масса, которая может пролиферировать длительный период времени (2 года и более). Пролиферирующую ЭМ у хвойных подвергают криоконсервации [18] или используют в экспериментах, направленных на вызревание соматических зародышей.

При переходе соматических зародышей хвойных к стадии созревания особое значение имеет присутствие АБК в питательной среде, а также снижение осмотического потенциала питательной среды, которое обычно достигается путем повышения концентрации сахарозы илижелирующего агента, либо применением ПЭГ [18]. АБК играет большую роль в формировании биполярной структуры зиготического зародыша. При этом мегагаметофиты являются основным источником АБК [11]. Поэтому для созревания и роста соматических зародышей АБК добавляется в питательную среду в определенной концентрации в зависимости от вида растения [20, 21]. Оптимальная концентрация АБК для европейских видов *Larix* – 40–60 мк моль [20], *Pinus* – 60–120 мк моль [6], *Picea* 12–60 мк моль [19]. Для созревания соматических зародышей видов лиственницы, произрастающих в Сибири, нами были использованы более высокие концентрации АБК (32 мг л<sup>-1</sup>, что соответствует 120 мк моль).

Кроме того, важным моментом в созревании соматических зародышей является создание осмотического стресса. Выявлено, что с увеличением концентрации Gelrite (до 8 г л<sup>-1</sup>) и сахарозы (до 60 г л<sup>-1</sup>) число соматических зародышей у видов сосны, ели и лиственницы, последующее их прорастание увеличиваются [4, 10, 12, 22]. Однако у лиственницы Сукачева с увеличением концентрации Gelrite и сахарозы происходило обезвоживание среды и гибель соматических зародышей. Положительное влияние на созревание соматических зародышей лиственницы Сукачева оказал ПЭГ. Ранее аналогичные результаты были получены у соматических зародышей *Picea glauca*, у которых применение ПЭГ в комбинации с АБК ускоряло процесс созревания зародышей, вызывая у них длительный водный стресс [20].

Хорошо известно, что генотип растения – донора оказывает большое влияние на рост ЭМ и образование соматических зародышей. Только определенные генотипы деревьев, обнаруженные у ряда видов хвойных, продуцировали соматические зародыши [5]. Высокая частота индукции ЭК (до 65%) была описана у гибрида *Larix x eurolepis* [14], у которого почти все введенные в культуру экспланты (94%) формировали ЭМ. Под строгим генетическим контролем шла инициация эмбрионного каллуса у *Picea glauca* [19] и *Pinus taeda* [21]. Часто отмечается также, что не все генотипы, активно формирующие ЭМ, способны к пролиферации эмбрионных культур и созреванию соматических зародышей. Число таких генотипов резко сокращается с 50–60 до 1–2% [9, 19, 22].

В проведенных нами исследованиях способностью к формированию ЭМ обладали 3% генотипов лиственницы Сукачева. Таким образом, эмбрионные культуры можно получить только с ограниченного числа деревьев [9, 19]. При переходе к созреванию соматических зародышей также наблюдалось влияние генотипа.

Таким образом, в России впервые был получен соматический эмбриогенез у видов лиственницы. Процесс созревания соматических зародышей успешно шел у лиственницы Сукачева на среде АИ, дополненной АБК (32 мг л<sup>-1</sup>), ИМК (0.2 мг л<sup>-1</sup>), сахарозой (40 г л<sup>-1</sup>), ПЭГ (10%) и Gelrite (4 г л<sup>-1</sup>).

**Заключение.** Культивирование незрелых зиготических зародышей у *Larix sibirica*, *L. gmelinii*, *L. sukaczewii* и *Pinus sibirica* было проведено на средах MS, MSG, LV, DCR и АИ с разной концентрацией гормонов и в разном соотношении их друг с другом. Эксперименты показали, что для индукции эмбрионного каллуса каждый вид нуждался в оптимизации определенной среды и

дополнении ее глутамином, гидрализатом казеина и аскорбиновой кислотой. Активная пролиферация эмбриональной массы шла на тех же средах с уменьшенной концентрацией цитокининов. Соматические зародыши вызревали на базальной среде с АБК и ПЭГ. Несмотря на видовую специфику, морфогенез эмбриогенных структур шел по одной схеме: растяжение соматических клеток и их асимметричное деление, образование глобулярных и торпедообразных зародышей, формирование биполярной структуры зародыша. Экспланты только единичных донорских растений формировали эмбриогенный каллус. Были получены селективные клеточные линии у лиственницы Сукачева. Успех соматического эмбриогенеза зависел от стадии развития экспланта, компонентов среды, гормональной регуляции и генотипа дерева.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батыгина Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 6. С. 884–898.
2. Белоруссова А.С., Третьякова И.Н. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 2. С. 1–10.
3. Мэзия Д. Митоз и физиология клеточного деления. М.: Иностранная литература, . 1963. 427 с.
4. Vecwar M.R., Nagmani R., Wann S.R. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*) // Can. J. For. Res. 1990. V. 20. P. 810–817.
5. Cairney J., Pullman G. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis // New phytologist. 2007. V. 176. P. 511–536.
6. Carneros E., Celestino C., Klimaszewska K., Park Y.-S., Toribio M., Bonga J.M. Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2009. V. 98. P. 165–178.
7. Chalupa W. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) // Karst. Com. Inst. For. Cech. 1985. V. 14. P. 57–63.
8. Hakman I., Fowke L.C., von Arnold S. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce) // Plant Sci. 1985. V. 38. P. 53–59.
9. Klimaszewska K., Cyr D.R. Conifer somatic embryogenesis: I. Development // Dendrobiology. 2002. V. 48. P. 31–39.
10. Klimaszewska K., Park Y.-S., Overton C., MacEacheron I., Bonga J. M. Optimized somatic embryogenesis in *Pinus Strobus* L. // In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 2001. V. 37 P. 392–399.
11. Kong L., Attree S.M., Evans D.E., Binarova P., Yeung E.C., Fowke L.C. Somatic embryogenesis in white spruce: studies of embryo development and cell biology // Somatic embryogenesis in woody plants./ Eds. Jain S.M., Gupta P.K., Newton R.J. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishersm 1999. V. 4. P. 1–28.
12. Lelu M.A., Klimaszewska K., Charest P.J. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix* // Can. J. For. Res. 1994. V. 24. № 1. P. 100–106.
13. Lelu-Walter M-A., Paques L.E. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x marschlinsii*). Perspectives for breeding // Ann. For. Sci. 2009. V. 66. P. 104.
14. Lelu-Walter M-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2008. V. 92. P. 31–45.
15. Malabadi R.B., Van Staden J. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula* // Tree Physiology. 2005. V. 25. P. 11–16.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. N 4. P. 473–497.
17. Park Y.-S. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations // Ann. For. Sci. 2002. V. 59. P. 651–656.
18. Klimaszewska K., Bonga J.M., Park Y.S., Lelu-Walter M.-A., Harvengt L., Trontin J.F., MacEacheron I. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2006. V. 86. P. 87–101.
19. Stasolla C., Yeung E. C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2003. V. 74. P. 15–35.
20. Stasolla C., Kong L., Yeung E.C., Thorpe T.A. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2002 V. 38. P. 93–105.
21. Vales T., Feng X., Ge L., Xu N., Cairney J., Pullman G.S., Peter G.F. Improved somatic embryo maturation in loblolly pine by monitoring ABA-responsive gene expression // Plant Cell Rep. 2007. V. 26. P. 133–143.
22. Von Arnold S., Hakman I. Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA) // J. Plant Physiol. 1988. V. 132. P. 164–169.

## Somatic Embryogenesis of Larch and Siberian Pine in Siberia

I. N. Tret'yakova, A. V. Barsukova

Experiments of cultivating the immature zygotic embryos of Siberian coniferous species (*Larix sibirica*, *L. gmelinii*, *L. sukaczewii*, and *Pinus sibirica*) were performed on the MS, MSG, LV, DCR and AI media with different concentrations of hormones and their proportions. For the induction of embryogenic callus, every species needed the optimized medium supplemented with L-glutamine, casein hydrolyzate, ascorbic acid, and hormones. The active proliferation of the embryonal mass was observed on the same medium with reduced concentration of cytokinins. The somatic embryos initiated from EM matured on the basal medium with ABA and PEG. In spite of the species specificity, the morphogenesis of embryogenic structures had the same scheme: elongation of somatic cells and its asymmetric division and development of globular, torpedo and bipolar somatic embryos. Not all donor-plants of coniferous species could form morphogenic callus and somatic embryos. Four cell lines were found in *Larix sukaczewii*. The success of the somatic embryogenesis was related to the developmental stage of explant, medium components, hormonal regulation, and tree genotypes.

*Somatic embryogenesis, nutrient medium, hormones, Larix sibirica, L. gmelinii, L. sukaczewii, and Pinus sibirica.*