

Цитогенетическая характеристика разновозрастных эмбриогенных клеточных линий, полученных через соматический эмбриогенез у *Larix sibirica* Ledeb.

М. Э. ПАК, О. В. ГОРЯЧКИНА, И. Н. ТРЕТЬЯКОВА, Е. Н. МУРАТОВА

Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН –
обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок, 50/28
E-mail: sibtaiga@bk.ru

Статья поступила 27.03.2023

После доработки 05.04.2023

Принята к печати 20.04.2023

АННОТАЦИЯ

Представлены результаты цитогенетического исследования четырех эмбриогенных клеточных линий (КЛ) лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) разной продолжительности культивирования: молодые (две четырехмесячные и 16-месячная КЛ) и длительно-пролиферирующая (11-летняя КЛ). Три клеточные линии являются диплоидными и содержат в кариотипе нормальное для данного вида число хромосом ($2n = 24$). Клеточная линия, которая культивировалась 16 месяцев, способная формировать соматические зародыши, оказалась анеуплоидной ($2n = 25$). Для данной клеточной линии, вероятно, характерна трисомия по одной из пар субметацентрических хромосом. Длительно пролиферирующая КЛ, от которой получены жизнеспособные плодоносящие клоны, в течение 11 лет культивирования сохраняет диплоидное число хромосом и является генетически стабильной. Кариотип хвойных растений характеризуется высокой степенью стабильности и большая часть видов семейства Pinaceae, к которому относится род *Larix* Mill., содержит 24 хромосомы ($2n = 24$). В связи с этим обнаружение цитогенетически устойчивых клеточных линий с измененным хромосомным набором представляет большой интерес для генетики этой группы растений. Выявление стабильно диплоидных клеточных линий актуально для генетико-селекционных работ, направленных на создание высокопродуктивных плантаций с заданными наследственными свойствами.

Ключевые слова: *Larix sibirica*, соматический эмбриогенез, эмбриогенные клеточные линии, число хромосом, кариотип, хромосомные и геномные мутации.

ВВЕДЕНИЕ

Соматический эмбриогенез является наиболее перспективным биотехнологическим направлением в микроклональном размножении хвойных растений. При помощи данного метода можно осуществлять не только массовое тиражирование хвойных видов с селекционно-значимыми признаками, но и проводить фундаментальные исследования в области биоло-

гии развития: морфогенеза и эмбриологии, генетики и гормональной регуляции [Lelu et al., 1994; von Arnold et al., 2002; Park et al., 2014; Третьякова, Пак, 2018; Tret'yakova et al., 2019; Peng et al., 2022; Hou et al., 2023]. Для успешного размножения хвойных растений с помощью соматического эмбриогенеза необходимо проводить регулярный цитогенетический контроль эмбриогенных культур с целью

выявления стабильных клеточных линий. Такие факторы, как условия и продолжительность культивирования, использование регуляторов роста, могут вызывать изменения в кариотипе растений, например приводить к увеличению частоты мутаций [Bairu et al., 2011; Sarmarst, 2016].

Цитогенетические особенности и стабильность эмбрионных культур хвойных растений изучены очень слабо, результаты этих исследований часто противоречат друг другу. Ряд исследователей приводят данные о появлении полиплоидных клеток при соматическом эмбриогенезе у разных видов хвойных, а также о повышении числа мутаций и генетической нестабильности, которые усиливаются при длительном культивировании эмбрионных культур [O'Brien et al., 1996; Fourré et al., 1997; von Aderkas et al., 2003; Burg et al., 2007; Marum et al., 2009; Krutovsky et al., 2014]. В других работах соматическая изменчивость не обнаруживалась при соматическом эмбриогенезе и регенеранты были идентичны исходному экспланту [Mo et al., 1989; Eastman et al., 1991; Gajdošova et al., 1995; Helmersson et al., 2004; Arrillaga et al., 2014; Nunes et al., 2018].

Проведенные нами ранее цитогенетические исследования эмбрионных культур *Larix sibirica* Ledeb. показали, что отдельные клеточные линии сохраняли цитогенетическую стабильность в процессе культивирования [Goryachkina et al., 2018]. Одна из них повторно включена в настоящее исследование с целью проследить динамику цитогенетических изменений при длительном культивировании эмбрионных культур. Кроме того, приводятся результаты цитогенетического исследования трех молодых эмбрионных клеточных линий (КЛ) лиственницы сибирской, продолжительность культивирования которых составила от 4 до 16 месяцев.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для получения данных эмбрионных клеточных линий в культуру были введены зиготические зародыши от дерева-донора *L. sibirica* А4, полученные в результате свободного опыления, а также контролируемого опыления пыльцой *L. sibirica* № 10. Возраст опытных деревьев составляет 50–70 лет, все они

произрастают в дендрарии Института леса им. В. Н. Сукачева СО РАН (г. Красноярск, Академгородок). Контролируемое опыление лиственницы сибирской с целью получения материала (зиготических зародышей) для ввода в культуру *in vitro* проводили в конце третьей декады апреля – в период созревания микростробилов и начала пыления.

Для проведения цитогенетических исследований отобраны четыре разновозрастные пролиферирующие эмбрионные клеточные линии из коллекционного банка эмбрионных культур лиственницы сибирской: гибридная КЛ 22.47.1 (контролируемое опыление дерева-донора эксплантов А4 пыльцой дерева № 10, 4 мес., 2022 г., автор М. Э. Пак), КЛ 22.5.1 (свободное опыление дерева-донора А4, 4 мес., 2022 г., автор М. Э. Пак), КЛ 21.20.1 (свободное опыление дерева-донора А4, 1 год, 2021 г., автор М. Э. Пак), КЛ 6 (свободное опыление дерева-донора А4, 11 лет, 2011., автор М. Э. Пак) [Пак и др., 2016]. Цитогенетическое исследование последней КЛ было проведено повторно [Goryachkina et al., 2018].

Введение в культуру, инициация и пролиферация эмбрионных культур у лиственницы сибирской проводились на среде АИ [Третьякова, 2012]. Среда и все этапы введения в культуру описаны в работах авторов статьи ранее [Третьякова, Барсукова, 2012; Пак и др., 2016]. Для цитогенетического анализа использовали глобулярные соматические зародыши на этапе пролиферации. Для сокращения хромосом и разрушения веретена деления применяли обработку 0,2 % раствором колхицина в течение 18–20 ч при комнатной температуре с последующей фиксацией спиртовой-уксусной смесью (3 : 1) в течение 24 ч. Окрасивание материала проводили в 1 % растворе ацетогематоксилина с добавлением 4 % железоаммонийных квасцов в термостате при 50 °С в течение 10–15 мин. Временные давленные препараты готовили стандартным способом. Просмотр микроскопических образцов осуществляли с помощью микроскопа “МИКМЕД-6” (“ЛОМО”, Россия) и цифровой камеры МС-12 (“ЛОМО”, Россия).

Для подсчета числа хромосом у клеточной линии 6 проанализировано 119 метафазных пластинок. Молодые клеточные линии характеризуются меньшим числом зародышей и, соответственно, меньшим количеством деля-

щихся клеток. В связи с этим число хромосом для клеточных линий 22.47.1, 22.5.1 и 21.20.1 удалось определить в 35-й, 30-й, 68-й метафазных пластинках соответственно. Хромосомы классифицировали по центромерному индексу согласно рекомендациям В. Г. Грифа и Н. Д. Агаповой [1986]. Подбор пар гомологов проводили в соответствии с абсолютной длиной, морфологией хромосом и локализацией вторичных перетяжек.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследованные клеточные линии характеризуются цитогенетической стабильностью, однако различаются по числу хромосом. В норме кариотип лиственницы сибирской, как и рода *Larix* Mill. в целом, содержит 24 хромосомы. Молодые клеточные линии, полученные в 2022 г. (22.47.1, 22.5.1), содержали преимущественно клетки с нормальным для данного вида числом хромосом – $2n = 24$

(рис. 1, а – в). В единичных клетках наблюдали сильно редуцированные числа хромосом ($2n = 13, 16$), также обнаружены клетки, содержащие 22, 23, 25 хромосом. Общая частота встречаемости клеток с аномальными числами хромосом для данных линий составила 10,5 и 6,2 % соответственно. Полиплоидные клетки, содержащие 48 хромосом, также фиксировались на препаратах, их количество варьировало от 6,4 до 9,8 %.

Клеточная линия 21.20.1, культивированная в течение 16 месяцев, оказалась анеуплоидной. В большинстве клеток выявлено 25 хромосом (рис. 1, г). В большинстве доступных для анализа метафазных пластинок наблюдалась дополнительная субметацентрическая хромосома ($2n = 12m + 13sm$). Кроме того, обнаружены единичные клетки, содержащие $2n = 23, 24, 26$ хромосом, их общее количество составило 4,2 %, а также полиплоидные клетки с $2n = 48-5,3$ %.

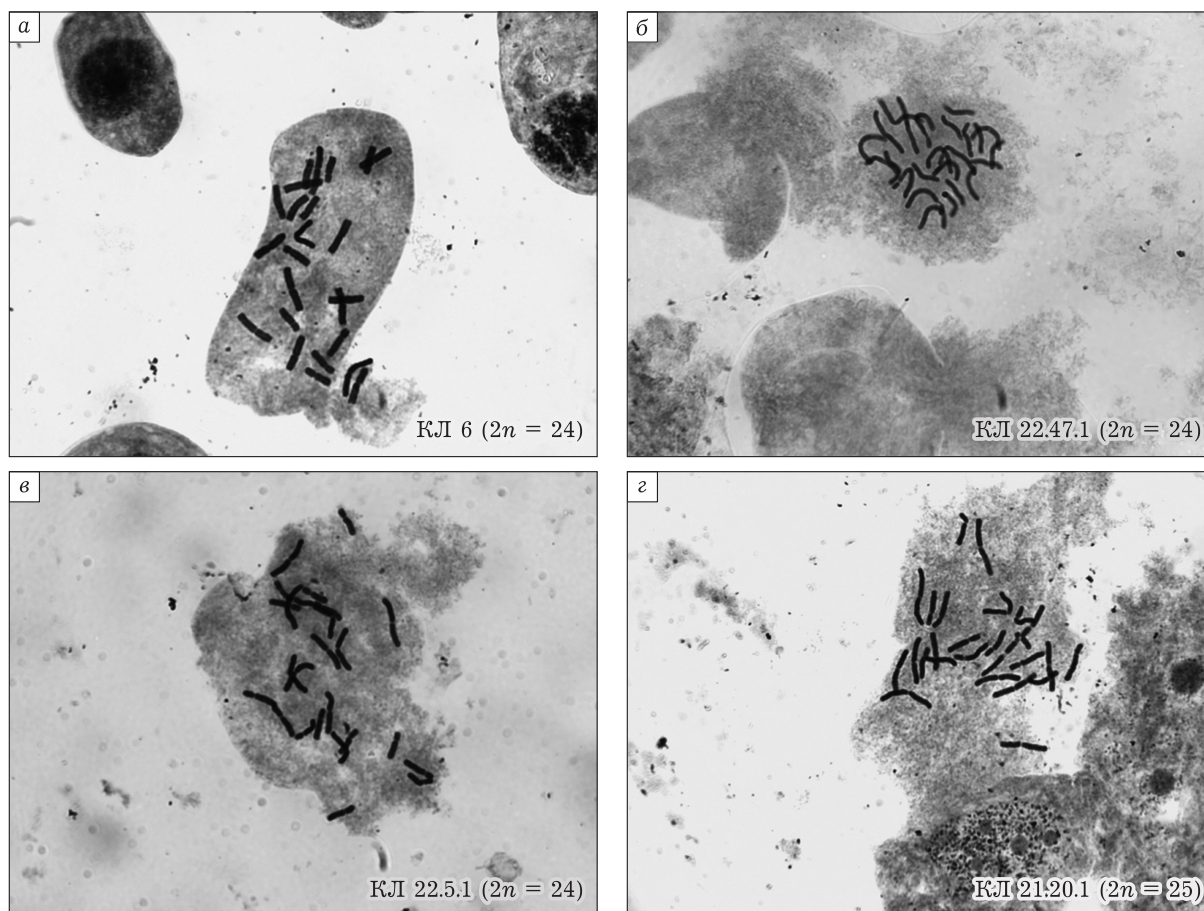


Рис. 1. Метафазные пластинки эмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской с разным числом хромосом: а – в – $2n = 24$; г – $2n = 25$ ($24 + 1$)

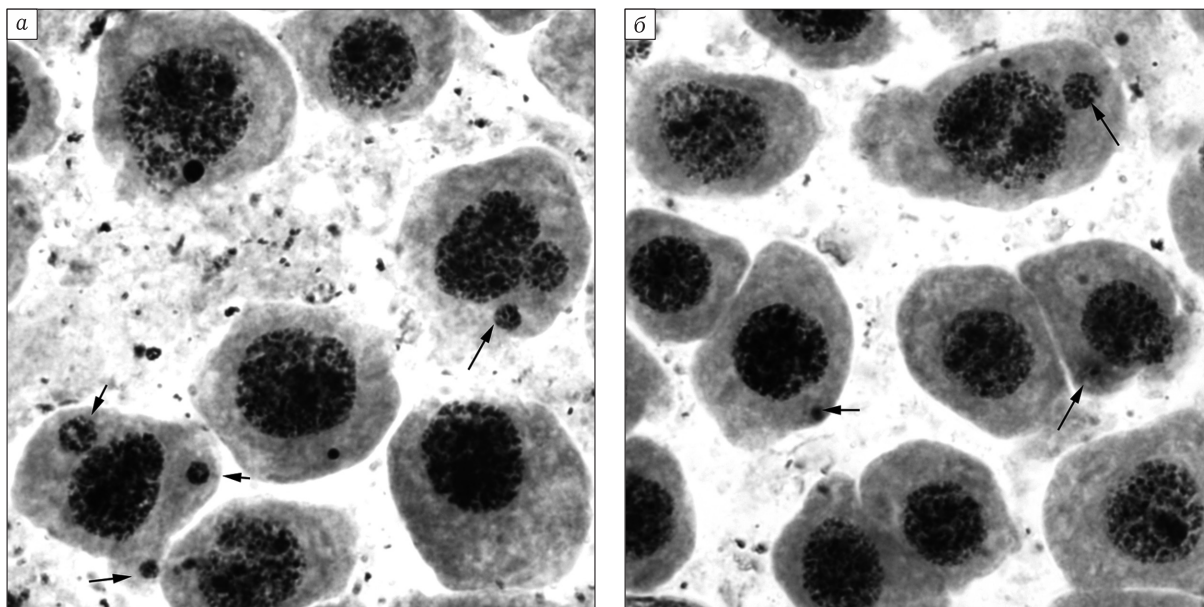


Рис. 2. Клетки с микроядрами (показаны стрелками) на стадии интерфазы у клеточной линии 6

Исследование длительно пролиферирующей КЛ 6 (возраст 11 лет) показало, что большинство клеток по-прежнему является диплоидным и содержит 24 хромосомы. Количество полиплоидных клеток по сравнению с предыдущим экспериментом несколько уменьшилось и составило 8,3 % (в предыдущем эксперименте 9,0 % просмотренных метафазных пластинок содержали удвоенный набор хромосом). Однако появились клетки с отличным от нормального числом хромосом ($2n = 22, 23, 36$), их общее количество составило 9,1 %. Кроме того, наблюдались единичные клетки с микроядрами разной формы и размера (рис. 2).

Для кариологического анализа отобраны метафазные пластинки с хорошим разбросом хромосом. В норме кариотип лиственницы сибирской содержит шесть пар длинных метацентриков, две из которых имеют вторичные перетяжки, и шесть пар коротких субметацентриков [Hizume, 1988; Муратова, 1991; Muratova et al., 2007; Муратова и др., 2010; Goryachkina et al., 2013]. Отдельные пары гомологичных хромосом в кариотипе лиственницы сибирской можно идентифицировать по размеру и морфологическим признакам. Так, хромосомы I пары выделяются по размеру, две пары метацентрических хромосом (III и IV) несут вторичные перетяжки в интеркалярных районах одного из плеч. Хро-

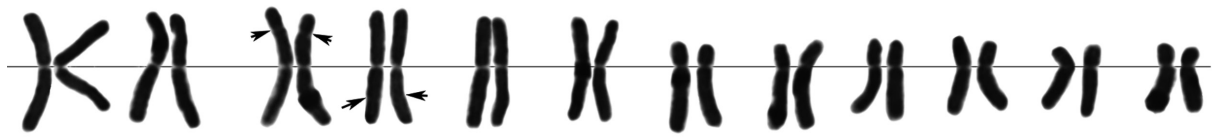
мосомы VI пары можно выделить, поскольку они самые короткие и наиболее асимметричные среди метацентриков. Идентификация субметацентрических хромосом VII–XII пар возможна только в метафазных пластинках с хорошим разбросом и минимальным числом наложений хромосом. Хромосомы VII и VIII пар – субметацентрики, близкие к субакроцентрикам; хромосомы IX и X пар наиболее симметричные среди субметацентриков; хромосомы XI и XII – самые маленькие субметацентрики.

На основании кариологического анализа выявлено, что кариотипы клеточных линий 6, 22.47.1 и 21.20.1 являются типичными для лиственницы сибирской. Для клеточной линии 21.20.1 характерна трисомия предположительно по IX паре субметацентрических хромосом (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Хвойные виды, в том числе и лиственница сибирская, характеризуются высокой степенью стабильности числа хромосом. Геномные мутации наблюдаются редко и представлены главным образом единичными полиплоидными клетками. Частота встречаемости полиплоидных клеток в клеточных линиях лиственницы сибирской была значительно выше (от 5,3 до 9,8 %), чем это обычно отмечается для при-

КЛ 6 ($2n = 24$)



КЛ 22.47.1 ($2n = 24$)



КЛ 21.20.1 ($2n = 25$)

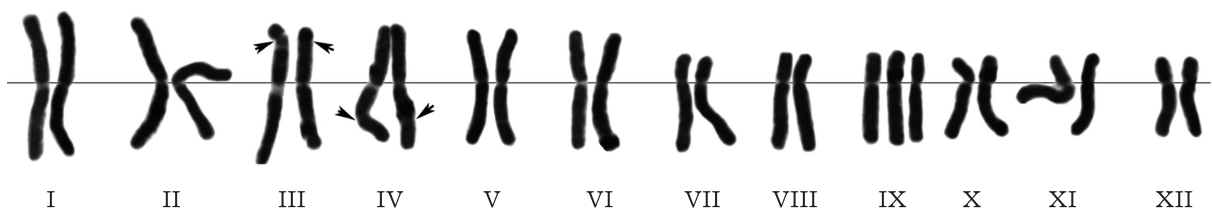


Рис. 3. Метафазные хромосомы лиственницы сибирской, расположенные в порядке уменьшения длины. Хромосомные пары (I–XII) идентифицированы в соответствии с морфологией хромосом и локализацией вторичных перетяжек (показаны стрелками)

родных популяций и городских насаждений хвойных [Муратова и др., 2009, 2010; Горячкина, Сизых, 2012; Седелникова, Пименов, 2021; Игнатенко и др., 2022]. Появление полиплоидных клеток при соматическом эмбриогенезе также было отмечено в культуре мегагаметофитов *Larix decidua* Mill. [von Aderkas et al., 2003].

Миксоплоидию часто связывают с адаптацией растений к условиям произрастания, особенно при воздействии неблагоприятных факторов среды [Кунах, 1995]. Так, одним из последствий частичной полиплоидизации является увеличение уровня клеточного метаболизма. В то же время анеуплоидные клетки, образующиеся в результате нарушения митотического деления, отличаются по генетическому составу, а значит, и по свойствам от исходных родительских. Такие клетки, как правило, не проходят через митоз и погибают.

Из четырех исследованных клеточных линий лиственницы сибирской две молодые (22.47.1 и 22.5.1) и одна длительно-пролиферирующая (КЛ 6) являлись диплоидными и имели нормальный для данного вида набор хромосом ($2n = 24$). Продолжительность культивирования КЛ 22.47.1 и КЛ 22.5.1 со-

ставляла 4 месяца, в то время как КЛ 6 сохраняла цитогенетическую стабильность в течение 11 лет. Полученные данные согласуются с нашими предыдущими исследованиями, где “молодая” клеточная линия с продолжительностью культивирования менее одного года и коллекционная КЛ 6 в возрасте 6 лет являлись диплоидными с числом хромосом $2n = 24$ [Горячкина и др., 2017]. Длительная пролиферативная активность эмбрионных культур была описана ранее в культуре мегагаметофитов *Larix decidua* и культуре зародышей гибридов лиственницы *L. × eurolepis* A. Henry и *L. × marschlinsii* Coaz [von Aderkas et al., 2003; Lelu-Walter, Pâques, 2009], где образование эмбриональной суспензорной массы шло в течение 9–17 лет, однако цитогенетическое исследование этих клеточных линий не проводилось.

Генетическая стабильность КЛ 6 показана ранее с помощью микросателлитного анализа: несоответствие материнскому генотипу по двум аллелям наблюдалось только в одном из одиннадцати локусов [Третьякова и др., 2016]. В возрасте 6–12 месяцев от этой клеточной линии получены клоны лиственницы сибирской, которые успешно произрастают в усло-

виях лесопитомника в экспериментальном хозяйстве “Погорельский бор” Института леса СО РАН [Пак и др., 2016; Третьякова и др., 2022]. Эти клоны, по данным микросателлитного анализа, показали полную идентичность КЛ 6, от которой были получены [Третьякова и др., 2022].

Появление анеуплоидных клеток, а также микроядер в интерфазных клетках может свидетельствовать о снижении цитогенетической стабильности КЛ 6 на 11-й год пролиферации, в то время как ранее, на 6-й год пролиферации, таких нарушений не наблюдали [Горячкина и др., 2017]. Микроядра являются ацентрическими фрагментами, возникшими в результате структурных нарушений хромосом, и, как правило, лишены центромеры [Schmid, 1975]. При измерении содержания ДНК показано, что этот показатель варьируется от 0,5 до 11,1 % от диплоидного и поэтому исключаются из ядер в момент деления клеток [Heddle, Carrano, 1977]. Кроме того, они могут быть образованы целой хромосомой при повреждении веретена деления. В эмбрионной культуре листовницы сибирской клетки с микроядрами обнаружены нами ранее у цитогенетически нестабильных клеточных линий, содержащих разное число хромосом в метафазных пластинках [Goryachkina et al., 2018]. Считается, что механизм постмитотической микронуклеации обеспечивает перевод накопившихся в течение некоторого времени латентных повреждений генома в морфологически идентифицируемые клеточные формы [Ильинских и др., 1986]. Наличие в клетках микроядер является результатом длительного воздействия на организм генотоксических факторов различной природы.

Большой интерес представляют результаты исследования клеточной линии 21.20.1, которая содержит преимущественно клетки с постоянным числом хромосом, хотя и отличным от нормального для данного вида ($2n = 25$). Ранее нами обнаружены другие эмбрионные клеточные линии *L. sibirica*, содержащие в кариотипе 25 и 28 хромосом [Goryachkina et al., 2018]. У *Pinus radiata* D. Don одна из исследованных клеточных линий содержала в кариотипе лишнюю хромосому, что было подтверждено исследованием количества ДНК [O'Brien et al., 1996]. Много анеуплоидных клеток (до 70 %) наблюдалось

в эмбрионной культуре гибрида *L. × eurolepis* [Nkongolo, Klimaszewska, 1995]. Соматическая изменчивость по числу хромосом обнаружена у растений *Picea glauca* (Moench) Voss, *P. mariana* Britton, Sterns et Poggenb. и *P. abies* (L.) H. Karst., полученных с помощью соматического эмбриогенеза [Fourré et al., 1997; Tremblay et al., 1999]. Авторы отмечают у данных видов как анеуплоидию ($2n = 38$), так и несколько вариантов хромосомного мозаицизма ($2n = 24, 27, 36; 2n = 30, 39, 40, 55$). У клона *P. abies*, полученного путем соматического эмбриогенеза, обнаружена химера, в почках которой число хромосом составило $2n = 25$, а в корневой меристеме – нормальное диплоидное, $2n = 24$ [Fourré et al., 1997].

Изменчивость числа хромосом в условиях культуры часто наблюдается у покрытосеменных растений, при этом может утрачиваться способность к регенерации. Причинами изменения числа хромосом, вероятно, являются аномалии митотического цикла, связанные с возможным мутагенным действием гормонов и стимуляторов роста, а также накопление в популяции генетически измененных клеток в результате длительного культивирования [Zorinyants et al., 1995].

Полученные результаты показывают, что эмбрионные клеточные линии листовницы сибирской могут сохранять цитогенетическую стабильность в течение многих лет (КЛ 6); они могут успешно использоваться для плантационного лесовыращивания. Для их выявления (отбора) необходимо проводить цитогенетический контроль клеточных линий коллекционного банка эмбрионных культур. Как показывают наши исследования и литературные данные, цитогенетический анализ является наиболее чувствительным методом для выявления генетической стабильности клеточных линий в зависимости от длительности культивирования, а также для определения качества получаемых растений-регенерантов. Результаты цитогенетических исследований эмбрионных клеточных линий вносят вклад в развитие теоретических аспектов генетики, селекции, репродуктивной биологии и биотехнологии хвойных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показывают, что эмбрионные клеточные линии ли-

ственницы сибирской могут сохранять цитогенетическую стабильность в течение многих лет и успешно использоваться для получения растений-регенерантов и плантационного лесовыращивания. Становится очевидным, что для успешного получения генетически устойчивых клонов хвойных растений с помощью соматического эмбриогенеза необходимо проводить регулярный цитогенетический контроль эмбрионных культур, выявляя стабильные клеточные линии и отбраковывая нестабильные. Поскольку кариотип хвойных растений характеризуется крайне высокой степенью стабильности (большая часть видов содержит 24 хромосомы), обнаружение клеточных линий с измененным хромосомным набором представляет большой интерес для генетики и селекции, а также вносит вклад в развитие теоретических аспектов репродуктивной биологии и биотехнологии хвойных.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-20008, <https://rscf.ru/project/22-14-20008/>, Красноярского краевого фонда науки.

ЛИТЕРАТУРА

- Горячкина О. В., Сизых О. А. Цитогенетические реакции хвойных растений в антропогенно нарушенных районах г. Красноярск и его окрестностей // Хвойные бореальной зоны. 2012. Т. 30, № 1-2. С. 46–51.
- Горячкина О. В., Пак М. Э., Третьякова И. Н. Цитогенетические особенности эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica* Ledeb. в культуре *in vitro* // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2017. № 39. С. 140–153. doi: 10.17223/19988592/39/9
- Гриф В. Г., Агапова Н. Д. К методике описания кариотипов растений // Ботан. журн. 1986. Т. 71, № 4. С. 550–553.
- Игнатенко Р. В., Галибина Н. А., Раевский В. В. Цитогенетическая оценка популяций *Pinus sylvestris* L. на Европейском Севере России (Республика Карелия) // Turczaninowia. 2022. Т. 25, № 1. С. 73–85. doi: 10.14258/turczaninowia.25.1.7
- Ильинских Н. Н., Ильинских И. Н., Бочаров Е. Ф. Цитогенетический гомеостаз и иммунитет. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1986. 256 с.
- Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 2. Изменчивость в природе // Биополимеры и клетка. 1995. Т. 11, № 6. С. 5–40.
- Муратова Е. Н. Кариологическое исследование *Larix sibirica* (Pinaceae) в различных частях ареала // Ботан. журн. 1991. Т. 76, № 11. С. 1586–1595.
- Муратова Е. Н., Карпюк Т. В., Владимиров А. О. С., Сизых О. А., Квитко О. В. Цитологическое изучение лиственницы сибирской в антропогенно нарушенных районах г. Красноярск и его окрестностей // Вестн. экологии, лесоведения и ландшафтоведения. 2009. № 9. Р. 99–108.
- Муратова Е. Н., Седельникова Т. С., Пименов А. В., Карпюк Т. В., Квитко О. В., Сизых О. А. Кариологический полиморфизм лиственниц // Биоразнообразие лиственниц Азиатской России. Новосибирск: ГЕО, 2010. С. 34–49.
- Пак М. Э., Иваницкая А. С., Двойнина Л. М., Третьякова И. Н. Эмбрионный потенциал длительно пролиферирующих клеточных линий *Larix sibirica in vitro* // Сиб. лесн. журн. 2016. № 1. С. 27–38. doi: 10.15372/SJFS20160103
- Седельникова Т. С., Пименов А. В. Изменчивость числа хромосом и хромосомные перестройки у *Pinus sylvestris* (Pinaceae) в засушливых условиях Нижнего Поволжья и Южной Сибири // Ботан. журн. 2021. Т. 106, № 4. С. 353–362. doi: 10.31857/S0006813621040116
- Третьякова И. Н. Способ микроклонального размножения лиственницы сибирской в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез на среде АИ для плантационного лесовыращивания / Пат. РФ RU 2456344 С2. М.: Федеральная служба по интеллектуальной собственности, 2012.
- Третьякова И. Н., Барсукова А. С. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы // Онтогенез. 2012. Т. 43, № 6. С. 425–435 [Tret'yakova I. N., Barsukova A. V. Somatic embryogenesis in *in vitro* culture of three larch species // Rus. J. Develop. Biol. 2012. Vol. 43, N 6. P. 353–361. doi: 10.1134/S1062360412060082].
- Третьякова И. Н., Пак М. Э. Соматический полиэмбриогенез *Larix sibirica* в эмбрионной культуре *in vitro* // Онтогенез. 2018. Т. 49, № 4. С. 251–263. doi: 10.1134/S0475145018010068 [Tret'yakova I. N., Park M. E. Somatic polyembryogenesis of *Larix sibirica* in embryogenesis *in vitro* culture // Rus. J. Develop. Biology. 2018. Vol. 49, N 4. P. 222–233. doi: 10.1134/S1062360418040069].
- Третьякова И. Н., Пак М. Э., Иваницкая А. С., Орешкова Н. В. Особенности соматического эмбриогенеза длительно пролиферирующих эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica in vitro* // Физиология растений. 2016. Т. 63, № 6. С. 812–822. doi: 10.7868/S0015330316050134 [Tret'yakova I. N., Park M. E., Ivanitskaya A. S., Oreshkova N. V. Peculiarities of somatic embryogenesis of long-term proliferating embryogenic cell lines of *Larix sibirica in vitro* // Rus. J. Plant Physiol. 2016. Vol. 63, N 6. P. 800–810. doi: 10.1134/S1021443716050137].
- Третьякова И. Н., Пак М. Э., Орешкова Н. В., Падутов В. Е. Регенерационная способность клеточных линий лиственницы сибирской в культуре *in vitro* // Изв. РАН. Сер. биол. 2022. Т. 49, № 6. С. 585–596 [Tret'yakova I. N., Park M. E., Oreshkova N. V., Padutov V. E. The Regenerative capacity of Siberian larch cell lines *in vitro* // Biol. Bull. 2022. Vol. 49, N 6. P. 609–619. doi: 10.1134/S1062359022050193].
- Arrillaga I., Guevara M. A., Muñoz-Bertomeu J., Lázaro-Gimeno D., Sáez-Laguna E., Díaz L. M., Torralba L., Mendoza-Ponderous I., Segura I., Cervera M. T. Selection of haploid cell lines from megagametophyte cultures of maritime pine as a DNA source for massive sequencing of the species // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2014. Vol. 118, N 1. P. 147–155. doi: 10.1007/s11240-014-0470-z
- Bairu M. W., Aremu A. O., van Staden J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods // Plant

- Growth Regulation. 2011. Vol. 63, N 2. P. 147–173. doi: 10.1007/s10725-010-9554-x.
- Burg K., Helmersson A., Bozhkov P., von Arnold S. Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine // J. Exp. Bot. 2007. Vol. 58, N 3. P. 687–698. doi: 10.1093/jxb/erl241
- Eastman P., Webster F. B., Pitel J. A., Roberts D. R. Evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) using culture morphology and isozyme analysis // Plant Cell Rep. 1991. Vol. 10, N 8. P. 425–430. doi: 10.1007/BF00232617
- Fourré J. L., Berger P., Niquet L., Andre P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches // Theoret. Appl. Genet. 1997. Vol. 94, N 2. P. 159–169. doi: 10.1007/s001220050395
- Gajdošová A., Vooková B., Kormuťák A., Libiaková G., Doležel J. Induction, protein composition and DNA ploidy level of embryogenic calli of silver fir and its hybrids // Biol. Plant. 1995. Vol. 37, N 2. P. 169–176. doi: 10.1007/bf02913205
- Goryachkina O. V., Badaeva E. D., Muratova E. N., Zeleznina A. V. Molecular cytogenetic analysis of Siberian *Larix* species by fluorescence in situ hybridization // Plant Systemat. and Evolut. 2013. Vol. 299, N 2. P. 471–479. doi: 10.1007/s00606-012-0737-y
- Goryachkina O. V., Park M. E., Tretyakova I. N., Badaeva E. D., Muratova E. N. Cytogenetic stability of young and long-term embryogenic cultures of *Larix sibirica* // Cytologia. 2018. Vol. 83, N 3. P. 323–329. doi: 10.1508/cytologia.83.323
- Heddle J. A., Carrano A. V. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by γ -irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments // Mutat. Res. – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagen. 1977. Vol. 44, N 1. P. 63–69. doi: 10.1016/0027-5107(77)90115-4
- Helmersson A., von Arnold S., Burg K., Bozhkov P. V. High stability of nuclear microsatellite loci during the early stages of somatic embryogenesis in Norway spruce // Tree Physiol. 2004. Vol. 24, N 10. P. 1181–1186. doi: 10.1093/treephys/24.10.1181
- Hizume M. Karyomorphological studies in the family Pinaceae // Memoirs of the Faculty of Education, Ehime University. Ser. III: Nat. Sci. 1988. Vol. 8, N 2. P. 1–108.
- Hou J., Wang X., Liu W., Jiang X., Gai Y. Large-Scale Quantitative proteomic analysis during different stages of somatic embryogenesis in *Larix olgensis* // Curr. Issues in Mol. Biol. 2023. Vol. 45, N 3. P. 2021–2034. doi: 10.3390/cimb45030130
- Krutovsky K. V., Tretyakova I. N., Oreshkova N. V., Pak M. E., Kvitko O. V., Vaganov E. A. Somaclonal variation of haploid in vitro tissue culture obtained from Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) megagametophytes for whole genome de novo sequencing // In Vitro Cell. and Develop. Biol. – Plant. 2014. Vol. 50, N 5. P. 655–664. doi: 10.1007/s11627-014-9619-z
- Lelu M. A., Bastien C., Klimaszewska K., Ward C., Charest P. J. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*): Part 1. Somatic embryo maturation // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1994. Vol. 36, N 1. P. 107–115. doi: 10.1007/BF00048321
- Lelu-Walter M.-A., Pâques L. E. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix × eurolepis* and *Larix × marschlinii*). Perspectives for breeding // Ann. Forest Sci. 2009. Vol. 66, N 104. P. 1–10. doi: 10.1051/forest/2008079
- Marum L., Rocheta M., Maroco J., Oliveira M., Miguel C. Analysis of genetic stability at SSR loci during somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*) // Plant Cell Rep. 2009. Vol. 28, N 4. P. 673–682. doi:10.1007/s00299-008-0668-9.
- Mo L. M., von Arnold S., Lagererantz U. Morphogenic and genetic stability in long-term embryogenic cultures and somatic embryos of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] // Plant Cell Reports. 1989. Vol. 8, N 7. P. 375–378. doi: 10.1007/BF00270072
- Muratova E. N., Sedelnikova T. S., Pimenov A. V., Karpjuk T. V., Sizikh O. A., Kvitko O. V. Karyological analysis of larch species from Siberia and the Far East of Russia // Forest Sci. Technol. 2007. Vol. 3, N 2. P. 89–94.
- Nkongolo K. K., Klimaszewska K. Cytological and molecular relationships between *Larix decidua*, *L. leptolepis* and *Larix × eurolepis*: identification of species-specific chromosomes and synchronization of mitotic cell // Theoret. and Appl. Genet. 1995. Vol. 90, N 6. P. 827–834. doi: 10.1007/BF00222018
- Nunes S., Marum L., Farinha N., Pereira V. T., Almeida T., Sousa D., Mano N., Figueiredo J., Dias M. C., Santos C. Somatic embryogenesis of hybrid *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *P. caribaea* var. *hondurensis* and ploidy assessment of somatic plants // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2018. Vol. 132, N 1. P. 71–84. doi:10.1007/s11240-017-1311-7
- O'Brien I. E. W., Smith D. R., Gardner R. C., Murray B. C. Flow cytometric determination of genome size in *Pinus* // Plant Sci. 1996. Vol. 115, N 1. P. 91–99. doi: 10.1016/0168-9452(96)04356-7
- Park Y. S. Conifer somatic embryogenesis and multi-varietal forestry // Challenges and Opportunities for the World's Forests in the 21st Century. Dordrecht: Springer, 2014. Forestry Sciences, Vol. 81. P. 425–439. doi: 10.1007/978-94-007-7076-8
- Peng Ch., Gao F., Wang H., Tretyakova I. N., Nosov A. N., Shen H., Yang L. Morphological and physiological indicators for screening cell lines with high potential for somatic embryo maturation at an early stage of somatic embryogenesis in *Pinus koraiensis* // Plants. 2022. Vol. 11, N 14. Article 1867. doi: 10.3390/plants11141867
- Sarmast M. K. Genetic transformation and somaclonal variation in conifers // Plant Biotechnol. Rep. 2016. Vol. 10, N 6. P. 309–325. doi: 10.1007/s11816-016-0416-5
- Schmid W. The micronucleus test // Mutation Research – Genet. Toxicol. and Environ. Mutagen. 1975. Vol. 31, N 1. P. 9–15. doi: 10.1016/0165-1161(75)90058-8.
- Tremblay L., Levasseur C., Tremblay F. M. Frequency of somaclonal variation in plants of Black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and White spruce (*P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability // Am. J. Bot. 1999. Vol. 86, N 10. P. 1373–1381.
- Tret'yakova I. N., Kudoyarova G. R., Park M. E., Kazachenko A. S., Shuklina A. S., Akhmyarova G. R., Korobova A. V., Veselov S. U. Content and immunohistochemical localization of hormones during *in vitro* somatic embryogenesis in long-term proliferating *Larix sibirica*

- cultures // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2019. Vol. 136, N 3. P. 511–522. doi: 10.1007/s11240-018-01533-y
- von Aderkas P., Pattanavibool R., Hristoforoglu K., Ma Y. Embryogenesis and genetic stability in long term megagametophyte-derived cultures of larch // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2003. Vol. 75, N 1. P. 27–34. doi: 10.1023/A:1024614209524
- von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J., Filonova L. Developmental pathways of somatic embryogenesis // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2002. Vol. 69, N 3. P. 233–249. doi: 10.1023/A:1015673200621
- Zorinyants S. E., Nosov A. V., Badaeva E. D., Smolenskaya I. N., Badaev N. S. Cytogenetic analysis of a long-term *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. cell suspension culture // Plant Breeding. 1995. Vol. 114, N 3. P. 219–225. doi: 10.1111/j.1439-0523.1995.tb00797.x

Cytogenetic characteristics of embryogenic cell lines of different ages obtained via somatic embryogenesis in *Larix sibirica* Ledeb.

M. E. PARK, O. V. GORYACHKINA, I. N. TRETYAKOVA, E. N. MURATOVA

*V. N. Sukachev Institute of Forest SB RAS
Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”
660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/28
E-mail: sibtaiga@bk.ru*

The results of cytogenetic analysis of four embryogenic cell lines of Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) of different ages: young (two four-month and 16-month CLs) and long-proliferating (11-year CL) are presented. Three cell lines are diploid and contain in the karyotype the normal number of chromosomes for this species ($2n = 24$). A 16-month-old CL capable of forming somatic embryos was aneuploid ($2n = 25$). This cell line is probably characterized by trisomy on one of the pairs of submetacentric chromosomes. The long-term proliferating CL, from which regenerants and clones were obtained, retains a diploid number of chromosomes during 11 years of cultivation and remains genetically stable. The karyotype of conifers is characterized by high degree of stability and most of the species contain 24 chromosomes ($2n = 24$). Therefore, the detection of cytogenetically stable cell lines is of great interest for genetic work of this group of plants and creation of highly productive plantations with specified hereditary properties.

Key words: *Larix sibirica*, somatic embryogenesis, embryogenic cell lines, number of chromosomes, karyotype, chromosomal and genomic mutations.