

УДК 630*165+630*181.5:58.085

ЭМБРИОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ДЛИТЕЛЬНО ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ *Larix sibirica in vitro*

М. Э. Пак¹, А. С. Иваницкая¹, Л. М. Двойнина², И. Н. Третьякова¹

¹ Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок, 50/28

² Сибирский федеральный университет
660041, Красноярск, просп. Свободный, 79

E-mail: mtavi@bk.ru, ivanitskaya@ksc.krasn.ru, slav.lyana@yandex.ru, culture@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 24.08.2015 г.

Исследовали эмбриогенный потенциал клеточных культур *Larix sibirica*, полученных при использовании в качестве эксплантов зиготических зародышей деревьев, устойчивых к листовенничной почковой галлице. Изолированные незрелые зародыши листовенницы культивировали на среде АИ по методике И. Н. Третьяковой (2012). В результате эксперимента получили 15 пролиферирующих эмбриогенных клеточных линий (Кл) *Larix sibirica* из эмбриокультуры. Кл листовенницы отличались разной эмбриогенной продуктивностью, содержанием и размером соматических зародышей, их способностью созревать и прорасти, а также образовывать жизнеспособные регенеранты. Число глобулярных соматических зародышей в молодых Кл (до одного года) в 1 г сырой эмбрионально-суспензорной массе (ЭСМ) в среднем колебалось от 2040 до 11 103. Проллиферативная активность Кл сохранялась в течение 2–6 лет. При добавлении в питательную среду АИ абсцизовой кислоты (АБК) происходили морфогенез и созревание соматических зародышей в течение 45 сут. Число созревших соматических зародышей у разных Кл колебалось от 12 до 1221 шт. на 1 г сырой ЭСМ. Мелкие соматические зародыши гибридной Кл5 не созревали на среде с АБК. Наблюдались разные аномалии в морфогенезе соматических зародышей в процессе созревания: отклонения в развитии доменов зародыша и цитокинезе. Наименьшее число аномальных зародышей отмечено у Кл4. У данной линии жизнеспособные зародыши составили $(83.31 \pm 3.00) \%$. Проращение соматических зародышей происходило на безгормональной среде АИ и начиналось с растяжения гипокотилия и удлинения корешка. Соматические сеянцы переносили в почвенный субстрат в условия ростовой камеры, а затем высаживали в теплицу Института леса СО РАН (2013 г.). Так была создана коллекция эмбриогенных клеточных линий *L. sibirica*, которая будет использоваться для плантационного лесовыращивания листовенницы в Сибири.

Ключевые слова: *Larix sibirica*, соматический эмбриогенез, эмбриогенные культуры, продуктивность, длительная пролиферация.

DOI: 10.15372/SJFS20160103

ВВЕДЕНИЕ

Для успешной реализации плантационного лесовыращивания в России необходимо создание высокопродуктивных сортов, отличающихся высокой пластичностью и устойчивостью к стрессовым факторам. Результативность данной работы может быть обусловлена использованием методов традиционной селекции в сочетании с современными биотехнологическими

приемами, такими как соматический эмбриогенез (Lelu-Walter et al., 2013; Park et al., 2014). Преимущество соматического эмбриогенеза хвойных видов перед другими способами полового и вегетативного размножения заключается в сохранении пролиферативной активности ЭСМ в течение длительного времени благодаря регулярным пересадкам на среды с цитокининами и ауксинами и ее криоконсервации (Lelu-Walter, Pâques, 2009; Klimaszewska et al., 2009).

В длительно пролиферирующих эмбрионных культурах гибридов *Larix × eurolepis* и *Larix × marschlinsii* эмбрионный потенциал сохраняется в течение 9 лет, что выражается в массовом образовании соматических зародышей с последующим их созреванием на среде с АБК (Lelu-Walter, Râques, 2009). В эмбрионных культурах, полученных из мегагаметофитов *Larix decidua*, образование соматических зародышей может происходить в течение 17 лет и более (von Aderkas et al., 2003). Однако в таких культурах происходит увеличение пloidности и накапливаются мутации. У других видов хвойных продолжительность пролиферации ограничена. Так, для *Pinus pinaster* пролиферация эмбрионных культур составила только 18 мес (Klimaszewska et al., 2009).

Биотехнология соматического эмбриогенеза для лиственниц, произрастающих на территории Сибири, разработана нами в 2011 г. для лиственницы сибирской (Третьякова, 2012) и в 2012 г. для лиственницы Сукачева (Третьякова, Барсукова, 2012). В полученных эмбрионных клеточных линиях *Larix sibirica* и *Larix sukaczewii* происходило массовое образование соматических зародышей (Третьякова, Барсукова, 2012; Третьякова, 2013; Третьякова и др., 2015). После переноса соматических зародышей на среду с АБК происходит их созревание. Однако в процессе созревания отмечена соматическая изменчивость по фенотипу соматических зародышей, которая наиболее сильно проявлялась у линий с низкой эмбрионной продуктивностью (Третьякова и др., 2015).

В данной работе представлены результаты изучения эмбрионной продуктивности полученных культур *Larix sibirica in vitro* при культивировании в течение 2–6 лет.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали деревья лиственницы сибирской *Larix sibirica*, произрастающие в дендрарии Института леса им. В. Н. Сукачева СО РАН, экспериментальном хозяйстве «Погорельский бор» и лиственничниках Республики Хакасия (пос. «Черное озеро»). Возраст деревьев 50–70 лет. Из 200 деревьев лиственницы экспланты (зиготические зародыши) в разные годы только трех деревьев-доноров формировали ЭСМ.

До введения в культуру семена опытных деревьев стерилизовали 10%-м раствором перекиси водорода, затем материал промывали двукратно в стерильной дистиллированной воде.

После стерилизации в условиях ламинар-бокса из мегагаметофитов извлекали зародыши и помещали на питательную среду. Общее число эксплантов с одного дерева 40–100 шт.

Индукция эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ). Для инициации соматического эмбриогенеза из зиготических зародышей лиственницы использовали базовую среду АИ (Третьякова, 2012). В качестве регуляторов роста применяли 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) ($2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) и 6-бензиламинопурин (6-БАП) ($1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$). Водородный показатель среды приводили к 5.8 до автоклавирования. В каждой чашке Петри культивировали по 10 зародышей на 20 мл индукционной среды в темноте при $(24 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$.

Пролиферация эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ). Для пролиферации полученной ЭСМ применяли базовую среду АИ, содержащую 2,4-Д ($2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$), 6-БАП ($0.5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) и сахарозу ($20 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$). Культуры инкубировали в темноте при температуре $(24 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$. Пересадку на свежую питательную среду проводили каждые 14 дней.

Предсозревание соматических зародышей. Через семь дней после субкультивирования на пролиферационной среде кусочки активно растущей ЭСМ массой 100–300 мг переносили на безгормональную базовую (АИ) среду с активированным углем ($10 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) и повышенным содержанием сахарозы ($34 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) для остановки пролиферации и перехода соматических зародышей к созреванию.

Созревание соматических зародышей. Эксперименты по созреванию соматических зародышей лиственницы сибирской выполняли на базовой среде АИ, содержащей сахарозу ($40 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$), абсцизовую кислоту (АБК) ($32 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$), индолилмасляную кислоту (ИМК) ($0.2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) и полиэтиленгликоль (ПЭГ) (10 %). В качестве желирующего агента использовали Gelrite ($4 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$). Культивировали на свету малой интенсивности ($20 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) при 16-часовом фотопериоде и температуре $(24 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$. Растительные регуляторы роста (АБК и ИМК), а также L-глутамин и аскорбиновую кислоту стерилизовали фильтрованием и добавляли в охлажденную питательную среду после автоклавирования.

Прорастание соматических зародышей. Для прорастания соматических зародышей использовали базовую питательную среду АИ, свободную от растительных регуляторов роста. Соматические зародыши считали проросшими

при появлении корешка. Проростки (после пятидневного периода прорастания) переносили в стеклянные сосуды, содержащие стерильный почвенный субстрат (песок : вермикулит : торф = 1:1:1), увлажненный 25%-м маточным раствором солей (среда АИ с 25%-м содержанием макро-, микросолей и железа). Культивирование осуществляли на свету при температуре 24 °С в условиях климатокамеры.

Гистологический анализ. Для проведения гистологического анализа использовали давленные препараты. Экспланты помещали на предметное стекло, 1–2 мин выдерживали в красителе (сафранин) (Паушева, 1988), добавляли глицерин и накрывали препарат покровным стеклом.

Продуктивность эмбриогенных клеточных линий оценивали, подсчитывая число соматических зародышей в 1 г сырой пролиферирующей ЭСМ через неделю после пересадки.

Просмотр микроскопических образцов осуществляли на микроскопе «МИКМЕД-6». В каждом образце измеряли 100–150 соматических зародышей. Их фенотипы определяли при помощи бинокюляра. Учитывали степень развития доменов зародыша (корня, гипокотила, апикальной меристемы, семядолей).

Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам (Лакин, 1973; Рокицкий, 1973; Шмидт, 1984) при помощи программ Microsoft Excel и Statistica 6.0. Для оценки достоверности полученных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эмбриогенный потенциал. 15 пролиферирующих эмбриогенных клеточных линий (Кл) получены в разные годы от трех деревьев-доноров лиственницы сибирской (табл. 1).

Первая пролиферирующая эмбриогенная клеточная линия получена в 2008 г. от генотипа А4 (Третьякова, Барсукова, 2012). В последующие годы (2009–2013) от этого же генотипа получено еще 10 Кл: 9 – в результате свободного опыления и одна (гибридная, Кл5) – в результате контролируемого опыления генотипа А4 пыльцой лиственницы Сукачева (дерево № 15). Кроме того, в 2013 г. получено 3 Кл от генотипа № 10 и одна Кл – от генотипа Ч2 (свободное опыление).

13 Кл разного возраста были представлены белыми и рыхлыми жизнеспособными эмбриогенными клеточными линиями, которые активно пролиферировали и образовывали ЭСМ (рис. 1).

Таблица 1. Коллекция пролиферирующих эмбриогенных клеточных линий, полученных в разные годы от трех деревьев-доноров лиственницы сибирской

Генотип-донор	№ клеточной линии	Год получения	Продолжительность культивирования (по июль 2015 г.), лет
А4	1	2008	3,5
	2	2009	6
	3	2009	1
	4	2009	6
	5	2009	6
	6	2011	4
	7	2011	4
	9	2012	3
	10	2012	3
	106	2013	2
10	107	2013	2
	101	2013	2
	102	2013	2
Ч2	103	2013	2
	104	2013	2

Некрозу была подвержена лишь Кл1 в возрасте трех с половиной лет и Кл3 в возрасте одного года. Выявлено, что Кл разного возраста (двух–шести лет) отличались друг от друга жизнеспособностью, пролиферативной активностью, числом соматических зародышей, их размерами, способностью созревать и прорастать. Каждая Кл представляла собой эмбрионально-суспензорную массу, состоящую из глобулярных зародышей (эмбрионов) и суспензоров и получившую название ЭСМ (рис. 2).

В ЭСМ образуются полиэмбриональные комплексы (рис. 3, а), состоящие из нескольких эмбрионов, других клеток в ней не наблюдалось. В результате кливажа последних происходит образование новых соматических зародышей. Вместе с тем в клетках суспензоров также образуются соматические зародыши (рис. 3, б). Таким образом, мультипликация соматических зародышей идет в результате кливажа эмбрионов и пролиферации клеток суспензора.

В однолетних Кл число соматических зародышей в 1 г сырой ЭСМ в среднем колебалось от 2040 (Кл6) до 11 103 (Кл10) (рис. 4). В течение более двух–шести лет наблюдений число соматических зародышей в 1 г сырой ЭСМ не сократилось. Так, например, у Кл4 после 1 года культивирования число соматических зародышей составило 3700 шт., а на 6-й год – 3773 шт. (рис. 5).

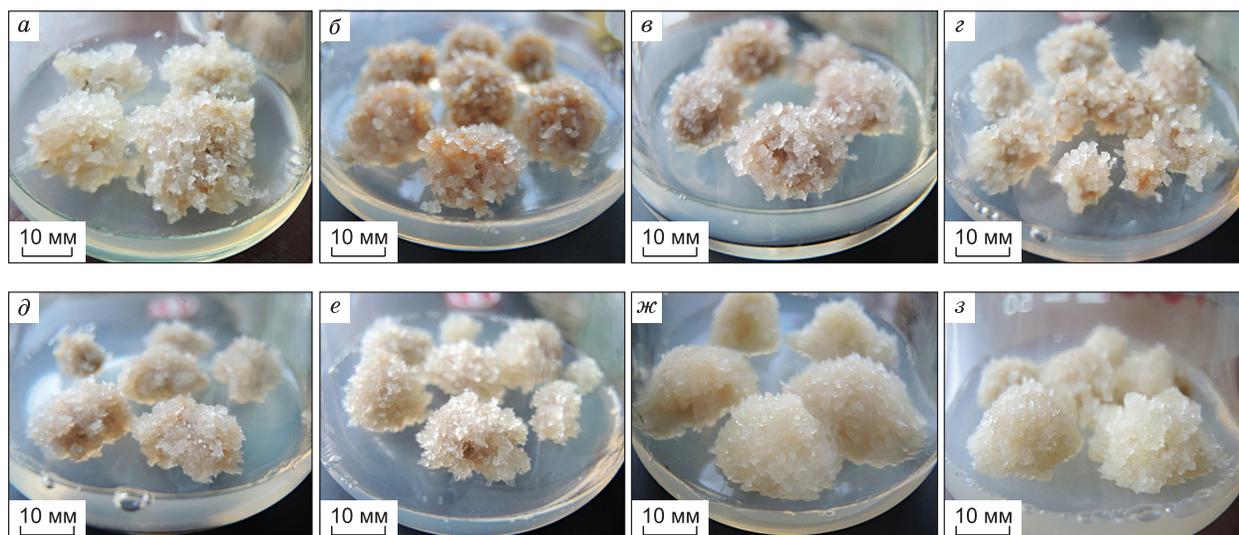


Рис. 1. Коллекция длительно пролиферирующих эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica*: а – Кл2, б – Кл4, в – Кл6, г – Кл7, д – Кл9, е – Кл10, ж – Кл5, з – Кл10б.

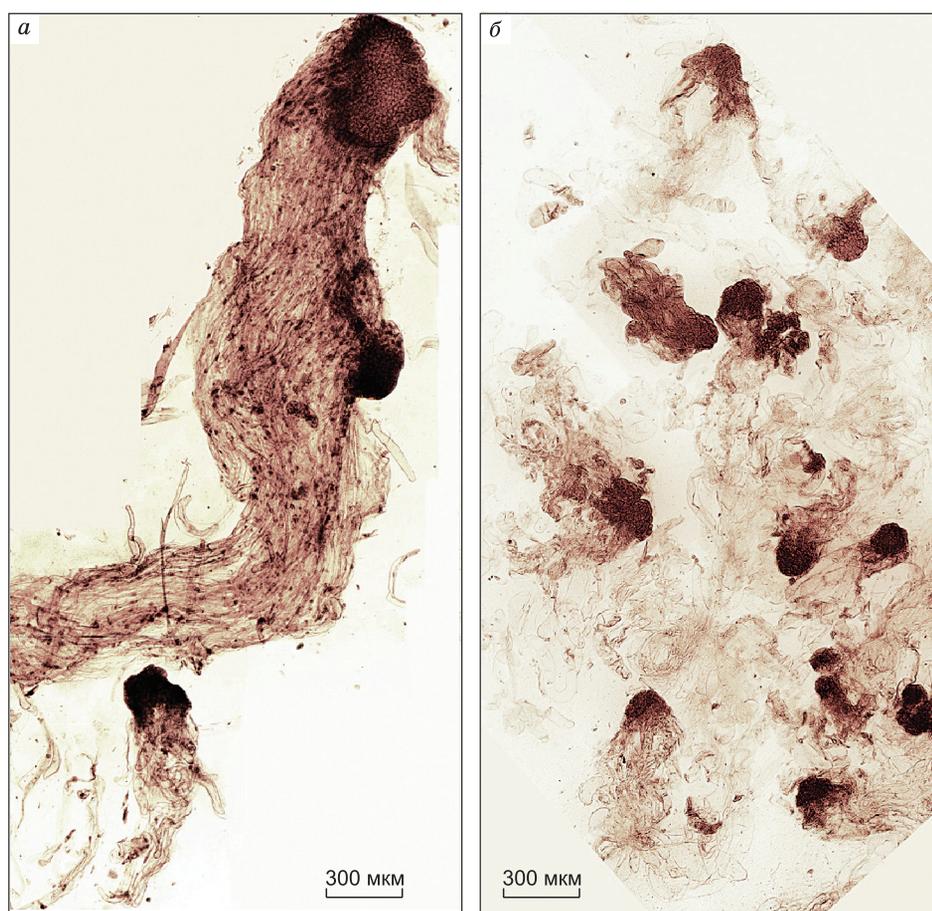


Рис. 2. Соматические зародыши коллекционных клеточных линий *Larix sibirica*: а – Кл104, б – Кл5.

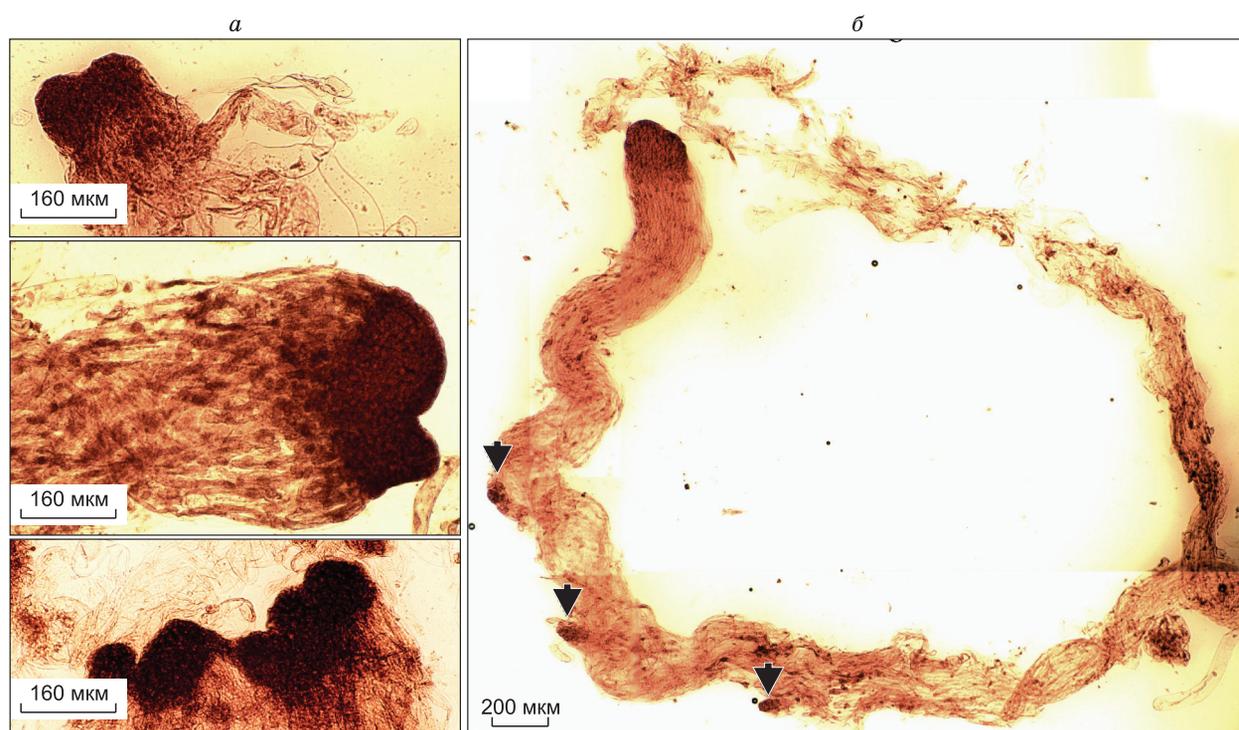


Рис. 3. Мультипликация соматических зародышей: а – кливаж глобулы; б – формирующиеся глобулы на суспензоре (показаны стрелками).

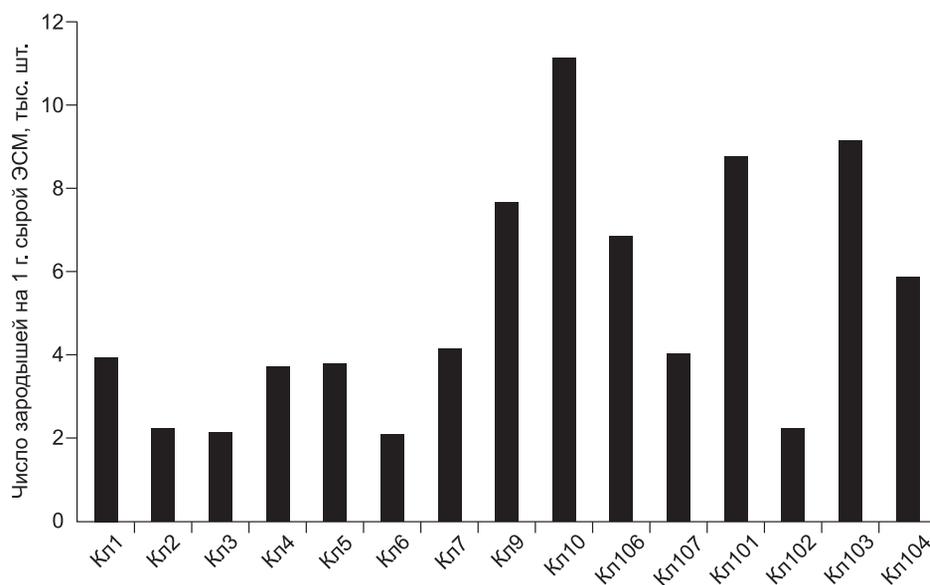


Рис. 4. Продуктивность однолетних эмбриогенных клеточных линий.

Размеры соматических зародышей в пролиферирующих Кл также значительно варьировали. Наиболее мелкие отмечены у гибридной Кл5 (диаметр глобулы 90.6 мкм, суспензор 126.4 мкм), наиболее крупные – у Кл6 (глобула 282.00 мкм, суспензор 1124.05 мкм) и Кл104 (глобула 247.69 мкм, суспензор 2964.94 мкм) (рис. 6). Выявлено, что различия по диаметру

глобулы зародыша Кл5 с Кл2, Кл6, Кл7, Кл101, Кл102, Кл103, Кл104, Кл106, Кл107 оказались достоверными ($P < 0.05$). У соматических зародышей Кл5 формировался очень короткий суспензор. По данному признаку Кл5 достоверно отличалась от других Кл ($P < 0.05$). Однако длина суспензора оказалась очень вариабельной величиной у многих клеточных линий. Эта ва-

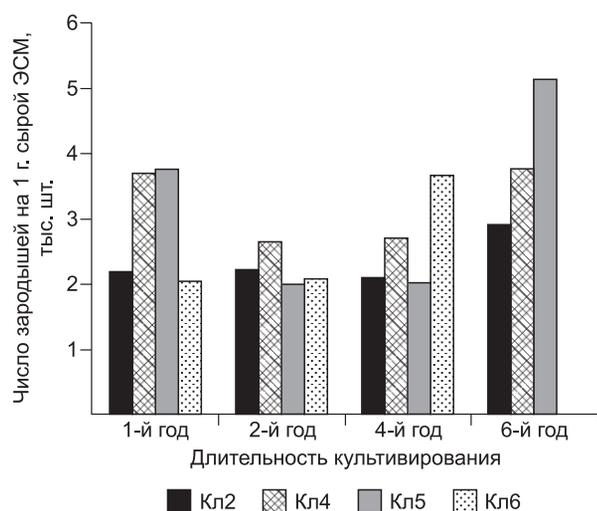


Рис. 5. Продуктивность эмбриогенных клеточных линий в течение 4–6 лет.

риабельность обусловлена тем, что образование соматических зародышей шло и в клетках суспензора, и у зародышей, возникших *de novo*, у которых очень трудно выделить суспензор из клеток основного суспензора.

Созревание и прорастание соматических зародышей. Опыты по созреванию соматических зародышей проведены у шести клеточных линий. Процесс их созревания (гистодифференцировка, формирование оси зародыша, апикальных меристем, семядолей) проходил на среде АИ с АБК в течение 45 сут. Число созревших соматических зародышей значительно уменьшилось

по сравнению с глобулярными. У Кл6 созревало только 12 шт. соматических зародышей на 1 г ЭСМ, в то время как у других Кл этот показатель был намного выше. Наибольшее число созревших соматических зародышей наблюдалось у Кл4 (1221 шт.). У Кл5 мелкие соматические зародыши с короткими суспензорами на среде с АБК вообще не созревали.

В процессе созревания наблюдались разного рода нарушения в морфогенезе зародыша. Развитые соматические зародыши отмечены у Кл4, у которой (83.31 ± 3.00) % формировались без отклонений фенотипа (табл. 2, рис. 7, а).

У других Кл наблюдались многочисленные отклонения в морфогенезе разных доменов зародыша. Некоторые зародыши утолщались и даже образовывали каллус в области семядольного кольца, центрального или базального доменов, кроме того, базальная часть зародышей была коричневой (рис. 7, б). Их размеры (длина до 3.5 мм, толщина до 2 мм) превышали норму у зрелых зиготических зародышей (длина 1.5–2 мм, толщина до 0.8 мм). У Кл4 зрелые соматические зародыши по фенотипу были схожи со зрелыми зиготическими зародышами (рис. 7, в).

Прорастание соматических зародышей происходило через 7–10 дней на безгормональной среде АИ и начиналось с растяжения гипокотыля и удлинения корешка. Появление эпикотыля происходило через 2–3 нед культивирования. Аномальные зародыши не регенерировали в

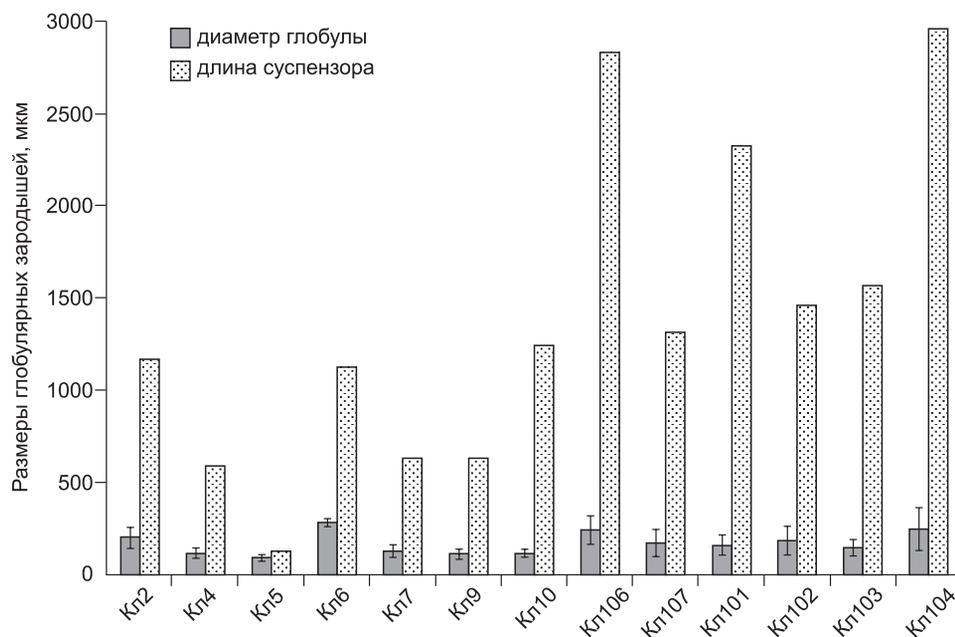


Рис. 6. Размерные характеристики соматических зародышей лиственницы сибирской (диаметр глобулы и длина суспензора), содержащихся в пролиферирующей ЭСМ.

Таблица 2. Нарушения в процессе развития соматических зародышей *Larix sibirica*

Клеточная линия	Общее число соматических зародышей в эксперименте, шт.	Доля нормальных соматических зародышей, %	Доля соматических зародышей, %			
			с нарушениями в развитии отдельного домена			с нарушениями в развитии всех доменов зародыша (с аномалиями по цитокинезу)
			апикального	центрального	базального	
Кл2	125	51.30±4.00	0.90±1.00	9.80±3.00	30.30±3.00	7.50±2.00
Кл4	188	83.31±3.00	0	0	16.69±2.00	0
Кл6	32	37.50±9.00	0	6.25±4.00	34.38±7.00	21.88±7.00
Кл7	45	55.56±7.00	0	6.67±4.00	28.89±5.00	8.89±4.00
Кл10	68	19.70±5.00	1.20±1.00	12.4±4.00	39.70±5.00	26.8±5.00

**Рис. 7.** Зрелые соматические зародыши лиственницы сибирской на 40-е сут культивирования на среде с АБК: а – нормально развитые; б – с нарушениями в развитии; в – Кл4.

полноценные проростки. Наибольшее число полноценных регенерантов отмечено у Кл4 (80.9 %). У других клеточных линий прораствание соматических зародышей колебалось от 11.1 (Кл7) до 26.6 % (Кл2) (рис. 8).

Регенеранты переносили в почвенный субстрат в условия ростовой камеры на время формирования хорошо развитой корневой системы (до 3 мес), а затем высаживали в теплицу экспериментального хозяйства «Погорельский бор» (рис. 9, а), где саженцы активно росли в течение трех лет. Высота саженцев на третий год вегетации в условиях теплицы составила (83.7±9.41) см (рис. 9, б).

В наших исследованиях в длительно пролиферирующих клеточных линиях *Larix sibirica* (от двух до шести лет) эмбриогенный потенциал сохранялся на том же уровне, что и в молодых культурах (до одного года).

Показано, что в 1 г сырой ЭСМ у *Picea abies* содержится 1–2 тыс. соматических зароды-

шей (Pâques et al., 1995; Lelu-Walter et al., 2013). В ЭСМ большинства клеточных линий *Larix sibirica* число соматических зародышей оказалось значительно выше, чем у ели (свыше 11 тыс. шт. на 1 г сырой ЭСМ).

Культивированные клеточные линии изначально различались по своей эмбриогенной продуктивности. При одинаковых условиях культивирования в одних клеточных линиях происходило более активное образование соматических зародышей, чем в других. Мелкие соматические зародыши с коротким суспензором у гибридной Кл5 вообще не созревали. Развитие их останавливалось на уровне глобулы. Можно предположить, что критерием для созревания соматических зародышей *Larix sibirica* является длина суспензора. Возможно, при достижении соматическим зародышем определенного размера, например диаметра глобулы более 100 мкм и длины суспензора 500 мкм, происходит переход его к созреванию.

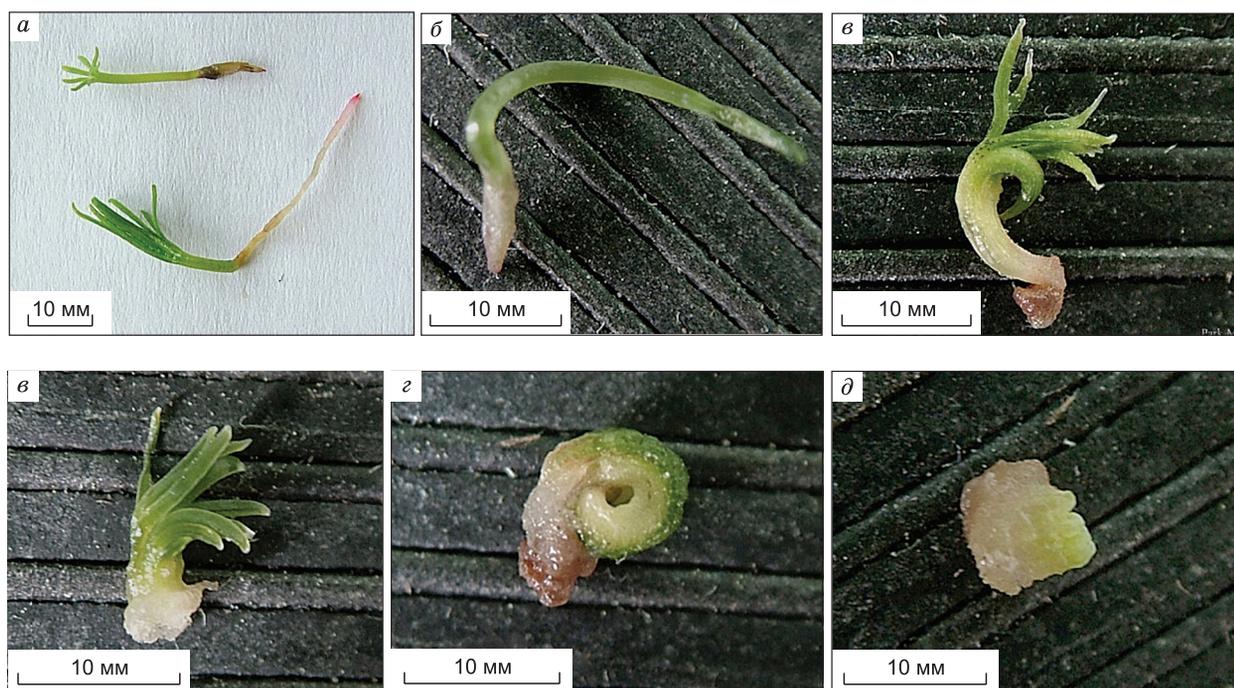


Рис. 8. Соматические проростки *Larix sibirica*: а – нормальные растения-регенеранты; б–е – проростки с нарушением развития доменов зародыша: б – апикального; в – базального, з – центрального и базального, д – апикального, центрального и базального, е – с аномалиями по цитокинезу.



Рис. 9. Соматические саженцы *Larix sibirica* в теплице экспериментального хозяйства «Погорельский бор»: а – второй год вегетации, б – третий год вегетации.

В эмбриогенных культурах лиственницы сибирской на пролиферационной среде шла активная мультипликация соматических зародышей на глобулярной стадии развития. При этом наблюдалось скопление глобул соматических зародышей, к которым тесно прилегали суспензоры. Такое скопление глобул соматических зародышей и суспензоров было названо полиэмбриональным комплексом (Vondrakova et al., 2011). Соматический полиэмбриогенез (somatic polyembryogenesis) описан в 1986 г. у *Pinus taeda* (Gupta, Dursan, 1986) и позднее получил название «repetitive cleavage process» (Becwar et al., 1990). Соматический полиэмбриогенез рассматривался как повторяющийся кливажный процесс, заложенный в зиготе (Gupta, Dursan, 1986). Можно предположить, что в растительных клетках лиственницы сибирской, как и у других хвойных видов, архивировано наличие кливажа, который реализуется в культуре *in vitro* в пролиферирующей ЭСМ путем активного деления и растяжения глобул соматического зародыша. Кроме того, образование соматических зародышей у лиственницы наблюдалось и в изолированных клетках суспензора, на что указывалось ранее у *Larix decidua* (Bonga et al., 1995). Коллекционные клеточные линии *Larix sibirica* приобретают статус стволости.

В литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что длительно пролиферирующие эмбриогенные Кл характеризуются генетической нестабильностью по сравнению с донорскими растениями. Так у *Pinus pinaster* после 6, 12, 22 мес культивирования у отдельных клеточных линий обнаружены мутации по семи локусам в микросателлитных последовательностях (Marum et al., 2009; Miguel, Marum, 2011). Высокая скорость мутаций по микросателлитным последовательностям выявлена в эмбриогенных клеточных линиях у *Pinus sylvestris* (Burg et al., 2007). Соматический эмбриогенез приводил к появлению тетраплоидных клеток у *Picea abies* (Lelu, 1987), полиплоидии у *Pinus nigra* (Salajova, Salaj, 1992), трисомии у *Larix marschlinii* (Nkongolo, Klimaszewska, 1995), *Pinus radiata* (O'Brien et al., 1996). Выявлена изменчивость в эмбриогенных культурах разного возраста у *Pinus pinaster* по содержанию эндогенных гормонов, полиаминов, метилированию ДНК (Klimaszewska et al., 2009). Способность к соматическому эмбриогенезу с возрастом культуры значительно снижалась, и у 18-месячных культур *Pinus pinaster* созревание соматических зародышей вообще не происходило. Вероятно,

чем дольше выдерживается культура *in vitro*, тем больше в ней происходит изменений на генетическом уровне. Не исключено, что внутри каллуса возникают гетерогенные клетки с генотипами, совершенно отличными от материнского дерева, что и наблюдалось в клеточных линиях, полученных из мегагаметофитов лиственницы сибирской (Krutovsky et al., 2014).

Вместе с тем ряд авторов (Fourre et al., 1997; Tremblay et al., 1999; Harvenget et al., 2001; Helmersson et al., 2004) указывают на то, что в культуре *in vitro* у представителей голосеменных растений (*Picea abies*, *P. glauca*, *P. mariana* × *P. glauca*, *Pinus pinaster*) и ряда покрытосеменных древесных растений (*Quercus robur* (Hornero et al., 2001), *Quercus suber* (Gallego et al., 1997), *Populus deltoides* и *P. tremuloides* (Rahman, Pajora, 2001)) соматическая изменчивость в процессе соматического эмбриогенеза не обнаруживается (Mo et al., 1989; Eastman et al., 1991). Отмечено отсутствие четкой корреляции между проявлением мутаций в клетках эмбриогенных Кл и аномальными фенотипами семян у *Pinus pinaster* (Marum et al., 2009). Предполагается, что мутирующие клетки в эмбриогенных культурах не выживают. Вероятно, при высокой мультипликации глобулярных соматических зародышей в пролиферирующих эмбриогенных культурах у лиственницы сибирской не все эмбрионы способны созреть и прорасти. Мутирующие соматические зародыши с нарушенными фенотипами отмирают.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные пролиферирующие эмбриогенные клеточные линии *Larix sibirica* характеризовались высокой эмбриогенной продуктивностью в течение 6 лет и более. Они отличались содержанием и размером соматических зародышей, их способностью созреть и прорасти. Наблюдалась высокая степень соматической изменчивости соматических зародышей *Larix sibirica* по фенотипу в процессе созревания на среде АИ с АБК. Нарушения наиболее часто возникали в базальном домене зародыша. Аномальные по фенотипу зародыши не способны образовывать регенеранты, поэтому число проросших зародышей лиственницы сибирской оказалось значительно меньше общего числа глобулярных зародышей. Отмечены высокопродуктивные клеточные линии (Кл4 и Кл6), у которых получены жизнеспособные регенеранты. Клонированные соматические сеянцы данных

линий успешно растут в условиях теплицы, отличаются быстрым ростом и устойчивостью к листовничной почковой галлице.

Пролиферирующие эмбрионные клеточные линии составят коллекционный банк, который будет успешно использоваться для плантационного лесовыращивания в Сибири.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-01427 и гранта Президента РФ для поддержки ведущих научных школ РФ (Министерство образования и науки РФ, Департамент науки и технологий) № НШ-5282.2014.4 «Разработка теории репродукции растений с позиции проблемы целостности и надежности биосистем».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высш. школа, 1973. 343 с.
- Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988. 271 с.
- Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. М.: Высш. школа, 1973. 320 с.
- Третьякова И. Н. Способ микроклонального размножения лиственницы сибирской в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез на среде АИ для плантационного лесовыращивания. Патент РФ RU 2456344 С2. М.: Федеральная служба по интеллектуальной собственности, 2012. <http://www.freepatent.ru/images/patents/5/2456344/patent-2456344.pdf>
- Третьякова И. Н. Эмбрионные клеточные линии и соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* у лиственницы сибирской // ДАН. 2013. Т. 450. № 1. С. 122.
- Третьякова И. Н., Барсукова А. С. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы // Онтогенез. 2012. Т. 43. № 6. С. 425–435.
- Третьякова И. Н., Иваницкая А. С., Пак М. Э. Продуктивность эмбрионных клеточных линий и их соматическая изменчивость у лиственницы сибирской *in vitro* // Лесоведение. 2015. № 1. С. 27–35.
- Шмидт В. М. Математические методы в ботанике. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1984. 288 с.
- Весвар М. R., Nagmani R., Wann S. R. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*) // Can. J. For. Sci. 1990. V. 20. N. 6. P. 810–817.
- Bonga J. M., Klimaszewska K., Lelu M. A., von Aedeke P. Somatic embryogenesis in *Larix* // S. M. Jain, P. K. Gupta, and R. J. Newton (Eds.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants. V. 3. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995. P. 315–339.
- Burg K., Helmersson A., Bozhkov P., von Arnold S. Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine // J. Bot. 2007. V. 58. P. 687–698.
- Eastman P., Webster F. B., Pitel J. A., Roberts D. R. Evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* compl.) using culture morphology and isozyme analysis // Plant Cell Rep. 1991. V. 10. P. 425–430.
- Fourre J. L., Berger P., Niquet L., André P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches // Theor. Appl. Genet. 1997. V. 94. P. 159–169.
- Gallego F. J., Martinez I., Celestino C., Toribio M. Testing somaclonal variation using RAPDs in *Quercus suber* L. somatic embryos // Int. J. Plant Sci. 1997. V. 158. P. 563–567.
- Gupta R. K., Dursan D. J. Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos // Biotech. 1986. V. 4. N. 5. P. 643–645.
- Harvengt L., Trontin J. F., Reymond I., Canlet F., Pâques M. Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis // Planta. 2001. V. 213. P. 828–832.
- 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. V. 24. P. 1181–1186.
- Hornero J., Martinez I., Celestino C., Gallego F. J., Torres V., Toribio M. Early checking of genetic stability of cork oak somatic embryos by AFLP analysis // Int. J. Plant Sci. 2001. V. 162. P. 827–833.
- Klimaszewska K., Noceda C., Pelletier G., Label P., Rodriguez R., Lelu-Walter M.-A. Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.) // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2009. V. 45. P. 20–33.
- 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 Dev. Biol. Plant. 2014. V. 50. P. 655–664.
- Lelu M. A. Variations morphologiques et génétiques chez *Picea abies* obtenues après embryogénèse somatique // Annales de Recherches Sylvicoles, AFOCEL. 1987. P. 35–47.

- Lelu-Walter M.- A., Thompson D., Harvengt L., Sanchez L., Toribio M., Pâques L. E. Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction // *Tree Genet. Genomes*. 2013. V. 9. P. 883–899.
- Lelu-Walter M.-A., Pâques L. E. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix × eurolepis* and *Larix × marschlinsii*). Perspectives for breeding // *Ann. For. Sci.* 2009. V. 66. N. 104. P. 1–10.
- 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. V. 28. P. 673–682.
- Miguel C., Marum L. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. N. 11. P. 3713–3725.
- 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 Rep.* 1989. V. 8. P. 375–378.
- 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 // *Theor. Appl. Genet.* 1995. V. 90. P. 827–834.
- O'Brien E. W., Smith D. R., Gardner R. C., Murray B. G. Flow cytometric determination of genome size in *Pinus* // *Plant Sci.* 1996. V. 115. P. 91–99.
- Pâques M., Bercetche J., Palada M. Prospects and limitations of somatic embryogenesis of *Picea abies* // Jain S., Gupta P., Newton R. (Eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. V. 1. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995. P. 399–414.
- Park Y.-S., Bonga J., McCartney A., Adams G. Integration of tree biotechnologies into multi-varietal forestry // *Proc. Third Int. Conf. IUFRO Unit 2.09.02 on Woody Plant Production Integrating Genetic and Vegetative Propagation Technologies*, Vitoria-Gasteiz, Spain, 2014. P. 95–97.
- Rahman M., Rajora O. Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*) // *Plant Cell Rep.* 2001. V. 20. P. 531–536.
- Salajova T., Salaj J. Somatic embryogenesis in European black pine (*Pinus nigra* Arn.) // *Biol. Plant.* 1992. V. 4. P. 213–218.
- 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. V. 86. P. 1373–1381.
- 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. V. 74. P. 27–34.
- Vondrakova Z., Eliasova K., Fischerova L., Vagner M. The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba* // *Cent. Eur. J. Biol.* 2011. V. 6. N. 4. P. 587–5965.

THE EMBRYOGENIC POTENTIAL OF LONG-TERM PROLIFERATION CELL LINES OF *Larix sibirica* *in vitro*

M. E. Pak¹, A. S. Ivanitskaya¹, L. M. Dvoynina², I. N. Tretyakova¹

¹ V. N. Sukachev Institute of Forest, Russian Academy of Science, Siberian Branch
Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

² Siberian Federal University
Prospekt Svobodnyi, 79, Krasnoyarsk, 660041 Russian Federation

E-mail: mtavi@bk.ru, ivanitskaya@ksc.krasn.ru, slav.lyana@yandex.ru, culture@ksc.krasn.ru

The study of embryogenic potential of *Larix sibirica* was conducted using zygotic embryos of trees resistant to larch bud midge as explants. Immature isolated zygotic embryos and megagametophytes of *Larix sibirica* were experimentally cultured on AI medium (Tretyakova, 2012). As a result of experiments, 15 proliferative cell lines (Cl) of *L. sibirica* were obtained from embryo culture. Cls differed in somatic embryo production, more specifically, in embryo quantity, size, and capability to mature, to germinate, and to form viable plantlets. The number of somatic embryos ranged from 2040 to 11103 per 1 gram of fresh weight of embryogenic callus (EC) in young (age up to one year) Cls. The proliferate activity of Cls are maintained during two–six years. Morphogenesis and maturation of somatic embryos are observed 45 days on the medium AI added by ABA. The number of mature somatic embryos ranged from 12 to 1220 per 1 gram of EC. Small somatic embryos of hybrid Cl5 did not mature on AI medium. Different anomalies are observed in the morphogenesis of somatic embryos: destruction of embryo domain development and cytokinesis. The minimum embryo anomalies were observed in Cl4. In this Cl *viable* embryos are 83.31±3.00 %. The germination of somatic embryo occurred on medium AI hormones and due to elongation of hypocotyls and roots. Somatic seedlings were transferred to soil substrate at the condition of growth-chamber and then to soil at the greenhouse of V. N. Sukachev Institute of Forest SB RAS in 2013. Thus, the collection of embryogenic cell lines of *L. sibirica* was created. This collection will be used in a plantation forest growing larch in Siberia.

Keywords: *Larix sibirica*, somatic embryogenesis, embryogenic cultures, productivity, long-term proliferation.

How to cite: Pak M. E., Ivanitskaya A. S., Dvoynina L. M., Tretyakova I. N. The embryogenic potential of long-term proliferation cell lines of *Larix sibirica* *in vitro* // *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* (Siberian Journal of Forest Science). 2016. N. 1: 27–38 (in Russian with English abstract).