

УДК 582.475.2:581.3:58.085

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ *in vitro* ТРЕХ ВИДОВ ЛИСТВЕННИЦЫ

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

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, 660036 Красноярск, Академгородок, стр. 50

E-mail: culture@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 21.04.11 г.

Окончательный вариант получен 30.01.12 г.

Формирование эмбрионного каллуса у видов лиственницы, произрастающих в Сибири (*Larix sibirica*, *L. gmelinii*, *L. sukaczewii*) происходило на среде MSGm под действием регуляторов роста (2.4Д и БАП) по одной схеме: вытягивание соматических клеток, их асинхронное деление с образованием инициали эмбрио и клетки трубки. Клетки инициали претерпевали последовательные деления и формировали эмбриональные глобулы, ведущие к формированию соматических зародышей. При добавлении в среду АБК и ПЭГ происходило вызревание соматических зародышей и затем последующее их прорастание. У лиственницы Сукачева и ее гибрида с лиственницей сибирской получены длительно пролиферирующие эмбрионные клеточные линии и растения регенеранты. Успех соматического эмбриогенеза зависел от генотипа дерева донора.

Ключевые слова: соматический эмбриогенез, культура *in vitro*, лиственница сибирская, лиственница Гмелина, лиственница Сукачева.

Важной жизненной стратегией растительных организмов является тотипотентность их клеток. Реализация этой стратегии ярко проявляется в культуре *in vitro* и особенно через соматический эмбриогенез.

Соматический эмбриогенез – асексуальный способ размножения у голосеменных растений – был открыт 26 лет назад у *Picea abies* (Chalupa, 1985; Nakman et al., 1985). В настоящее время с помощью соматического эмбриогенеза осуществляется изучение морфогенетических программ, таких как детерминация, дифференцировка, дедифференцировка и компетентность, а также проводится массовое тиражирование высокопродуктивных, устойчивых к фитопатогенам генетически улучшенных форм хвойных растений (Lelu et al., 1994; Lelu-Walter et al., 2008; Park, 2002, 2006; Klimaszewska et al., 2001).

Среди хвойных, представители рода *Larix* являются наиболее распространенными лесообразующими древесными видами на территории России. Они различаются по морфологическим признакам, лесоводственным характеристикам, ритмам сезонного развития и морфогенеза вегетативных и генеративных органов, а так же характеризуются быстрым ростом, энергичной ассимиляцией, транспирацией и высокой продуктив-

ностью (Дылис, 1947; Рожков и др., 1991; Ирошников, 2004).

Занимая обширный ареал, виды рода *Larix* обладают чрезвычайно высокой пластичностью, отличающей ее от других представителей семейства *Pinaceae* (Третьякова и др., 2006). Этот признак связан с периодическим сбрасыванием хвои, переключением брахибластов на генеративный путь развития и, наоборот, генеративных структур на спорофитный путь развития, наличием толстой оболочки, окружающей пыльцевое зерно, не позволяющей пыльце прорасти при неблагоприятных условиях, отсутствием органического покоя у генеративных и вегетативных органов в зимний период, и, в целом, большим морфогенетическим потенциалом, позволяющим видам лиственницы адаптироваться к неблагоприятным экологическим факторам (Третьякова и др., 2006).

Вместе с тем, виды лиственницы характеризуются неравномерностью урожаев в многолетнем цикле и низким качеством семян. Наиболее сильно этот феномен проявляется у лиственницы сибирской, у которой урожаи семян значительно ниже (а в отдельные годы вообще отсутствуют) по сравнению с другими представителями рода *Larix* (Тренин, 1986; Милютин, 2003; Ирошников, 2004). Кроме того, деревья лиственницы сибирской очень сильно поражаются лиственничной почковой галлицей, оказывающей сильное негативное влияние на урожай лиственничных лесов.

Сокращения: 2.4-Д – дихлорфеноуксусная кислота, БАП – 6-бензил аминопурин, АБК – абсцизовая кислота, ПЭГ – полиэтиленгликоль, ИМК – инолилмасляная кислота, Gelrite – желирующий агент, ЭМ – эмбриональная масса.

Для решения проблемы лесовосстановления видов лиственниц за рубежом разрабатываются программы с использованием современных биотехнологий микрклонального размножения, таких как соматический эмбриогенез (Park, 2002, 2006).

Для рода *Larix* соматический эмбриогенез был получен у *L. decidua* (von Aderkas et al., 1990), *L. kaempferi* (Lelu-Walter, Pagues, 2009) и гибридов *L. x occidentalis* (Thompson, von Aderkas, 1992), *L. x eurolepis* (*L. decidua* x *L. kaempferi*) (Klimaszwska, 1989; von Aderkas et al., 1990; Lelu, 1994), *L. x marscinlinsii* (*L. kaempferi* x *L. decidua*) (Lelu et al., 1994; Lelu-Walter, Pagues, 2009). Первая работа по инициации соматического эмбриогенеза у лиственницы сибирской была опубликована нами в 2008 году (Белоруссова, Третьякова, 2008). В ней впервые было показано становление соматических клеток зародыша под влиянием гормонов на путь эмбриогенеза при инициации и пролиферации морфогенного каллуса.

Однако, несмотря на активные исследования по соматическому эмбриогенезу у лиственницы сибирской, регенерация растений путем соматического эмбриогенеза все еще остается не решенной для данного вида. Критическим моментом явился процесс вызревания соматических зародышей, на котором эмбриональное развитие у лиственницы сибирской останавливалось.

Цель настоящей работы заключалась в разработке биотехнологии соматического эмбриогенеза у видов лиственницы, произрастающих на территории Сибири, с подбором минеральных сред, концентраций гормонов и желирующих агентов на процессы образования и вызревания соматических зародышей и получения растений регенерантов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследований служили 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 (г. Красноярск). Возраст деревьев 35–40 лет. На дереве (генотип С_{нп1}) лиственницы Сукачева проводилось контролируемое опыление макростробилов пыльцой лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина.

В качестве материала для индукции соматического эмбриогенеза были взяты изолированные зиготические зародыши на стадии глобулярного зародыша, инициации и развития семядолей. Сбор посадочного материала осуществляли с июля по август в 2007–2010 гг. Семена очищали от покровных чешуй, поверхностно стерилизовали

5% спиртовым раствором йода в течение 3 минут. После 3-кратной промывки в стерильной дистиллированной воде, мегагаметофиты обрабатывали перекисью водорода в течение 5–10 минут. Зародыши извлекали из мегагаметофитов в стерильных условиях, помещали на увлажненную фильтровальную бумагу в чашках Петри и затем переносили на питательную среду.

Индукция каллуса. Для индукции каллуса у видов лиственницы использовали минеральные основы базовых сред: 1/2 MS (Murashige, Skoog, 1962), MSG (Vecvar et al., 1990) и модифицированную нами среду MSGm с увеличенным содержанием некоторых микроэлементов по сравнению с исходной прописью MSG и изменным составом макроэлементов (из среды исключен KCl) (табл. 1). В качестве регуляторов роста использовали 2.4-Д (2 мг/л) и БАП (1 мг/л). В среду добавляли агар – 7 г/л; pH среды приводили к 5.8 до автоклавирования, которое проводили при 121°C в течение 20 мин. В охлажденную питательную среду после автоклавирования добавляли L-глутамин. В каждой чашке Петри культивировали 5 зародышей на 20 мл индукционной среды в темноте при 25°C ± 1°C.

Пролиферация эмбриональной массы. Для пролиферации каллуса и образования эмбриональной массы (ЭМ) применяли указанные базовые среды, содержащие 2.4-Д (2 мг/л), БАП (0.5 мг/л) и сахарозу (20 г/л). Режим культивирования такой же как при индукции каллуса. Пересадки на свежую питательную среду проводили каждые 2 нед. За 7 дней до перевода каллусов на безгормональную среду (предвызревание соматических зародышей) их помещали в жидкую питательную среду MSGm (без агара) и подвергали встряхиванию на круговой качалке.

Предозревание соматических зародышей. Кусочки активно растущей эмбриональной массы, весом 100–300 мг переносили на безгормональную базовую (MSGm) среду с активированным углем (10 г/л) и повышенным содержанием сахарозы (34 г/л), для остановки пролиферации и перехода соматических зародышей к вызреванию. Экспланты культивировали в течение одной недели на свету малой интенсивности (10 мкмоль м⁻² с⁻¹) при 16-часовом фотопериоде.

Созревание соматических зародышей Эксперименты по созреванию соматических зародышей трех видов лиственницы выполняли на базовой среде MSGm, содержащей сахарозу (40–60 г/л), АБК (16–32 мг/л), ИМК (0.2 мг/л) и ПЭГ (5–10%) в различных вариациях (табл. 2). В качестве желирующего агента использовали Gelrite (3–4 г/л). Культивирование осуществляли на свету малой интенсивности (20 мкмоль м⁻² с⁻¹) при 16-часовом фотопериоде, при 24°C ± 1°C. Регуляторы роста растений (АБК и ИМК) и L-глутамин

Таблица 1. Состав базовых питательных сред MS, MSG, MSGm, используемых в экспериментах по культуре *in vitro* у листовницы

Компоненты среды	Концентрация компонентов в среде, мг/л		
	MS	MSGm	MSG
Макроэлементы:			
NH ₄ NO ₃	1650	—	—
KNO ₃	1900	100	100
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	440	440
MgSO ₄ · H ₂ O	370	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170	170
KCl	—	—	745
Микроэлементы:			
KI	0.83	0.83	0.83
H ₃ BO ₃	0.62	3.15	0.62
MnSO ₄ · H ₂ O	22.3	22.3	22.3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	8.6	8.6
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.375	0.25
CuSO ₄ · 6H ₂ O	0.025	0.125	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.050	0.025
Железо:			
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	27.8	27.8
Na ₂ · ЭДТА	37.3	37.3	37.3
Витамины и органические вещества:			
Мезоинозит	100	500	100
Тиамин	0.1	0.1	0.1
Глицин	2.0	—	—
Пиридоксин	0.5	0.5	0.5
Никотиновая кислота	0.5	0.5	0.5
Глутамин	500	500	500
Гидролизат казеин	1000	1000	1000
pH	5.8	5.8	5.8

стерилизовали фильтрованием и добавляли в охлажденную питательную среду после автоклавирования.

Проращивание соматических зародышей. Для проращивания соматических зародышей листовницы использовали базовую питательную среду MSGm свободную от растительных регуляторов роста, дополненную активированным углем (1 г/л). Соматические зародыши считали проросшими, как только наблюдалось появление корешка. Полученные растения-регенеранты помещали в увлажненную эпокочву (песок : вермикулит : торф = 1 : 1 : 1).

Цитологический анализ. Для проведения цитологического анализа использовали давленные препараты. Для приготовления давленных препаратов экспланты помещали на предметное стек-

ло и 1–2 мин выдерживали в красителе (сафранин с добавлением метиленового синего). Далее добавляли глицерин, и накрывали препарат покровным стеклом.

Просмотр микроскопических образцов осуществляли на микроскопе МБИ-6. Замеры клеток и эмбриональных структур проводили при помощи окуляр-микрометра с последующим переводом полученных единиц в мкм. Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам при помощи Microsoft Excel. Для оценки достоверности полученных данных использовался однофакторный дисперсионный анализ. Морфологические изменения фиксировались цифровой камерой Fujifilm FinePix S7000 (Япония).

Таблица 2. Созревание соматических зародышей лиственницы Сукачева на питательной среде MSGm

Вариант среды	АБК, мг/л	ПЭГ, %	Сахароза, г/л	Gelrite, г/л	ИМК, мг/л	Зрелые соматические зародыши, шт./500 мг ЭМ
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 ± 3.6
10	32	0	60	8	0.2	0
11	16	10	40	4	0	1
12	16	0	60	7	0	0

РЕЗУЛЬТАТЫ

Индукция каллуса

Формирование каллуса у видов лиственницы, произрастающих на территории Сибири, зависело от стадии развития экспланта при введении его в культуру *in vitro*. Наилучший отклик был получен на стадии инициации семядолей (III стадия развития). На индукцию каллусообразования большое влияние оказал состав питательной среды. Более активная стимуляция образования каллуса наблюдалась при использовании среды MSGm (рис. 1). При этом образование каллуса у лиственницы Сукачева происходило на всех используемых питательных средах с высоким процентом отклика эксплантов — 98%, у лиственницы сибирской 53–93%, у лиственницы Гмелина 50–81%.

Морфологические наблюдения за формированием каллуса показали, что его индукция происходила на 8–14-е сутки культивирования. Образование каллуса шло по всей поверхности экспланта или было сосредоточено в области между корешком и гипокотилем. Каллус имел белый цвет и рыхлую или либо твердую структуру.

Пролиферация эмбриональной массы (ЭМ). Образование эмбриональной массы в каллусе происходило на 25–35 сутки культивирования у всех видов лиственницы на среде MSGm с уменьшенным содержанием цитокининов (БАП 0.5 мг/л). Однако, через три-пять месяцев культивирования развитие каллуса останавливалось и дальнейшее формирование эмбриональной массы шло только у лиственницы Сукачева на среде MSGm в 18% случаев (неокрашенный столбик, рис. 1B).

Высокая пролиферационная активность ЭМ была отмечена у генотипа С_{нп1} лиственницы Сука-

чева, у которого было получено пять клеточных линий — четыре в результате свободного опыления, а пятая в результате контролируемого опыления с лиственницей сибирской. Ниже приводим описание клеточных линий:

клеточная линия 1 (08-03-00-01) — получена в 2008 году на среде MSGm; экспланты от свободного опыления лиственницы Сукачева (С_{нп1});

клеточные линии 2 (09-03-00-02), 3 (09-03-00-03) и 4 (09-03-00-04) — получены в 2009 году на среде MSGm; экспланты от свободного опыления лиственницы Сукачева (С_{нп1});

клеточная линия 5 получена в 2009 г. на среде MSGm; экспланты от опыления лиственницы Сукачева пыльцой лиственницы сибирской.

Полученные в результате индукции клеточные линии лиственницы Сукачева отличались между собой по пролиферационной активности, а также по количеству незрелых соматических зародышей внутри эмбриональной массы. Рост эмбриональной массы был отмечен через 2 недели культивирования на пролиферационной среде в конце пассажа (рис. 2A). За шесть недель культивирования суммарный вес ЭМ от одного экспланта у разных клеточных линий лиственницы Сукачева составил от 24 до 80 г, а у лиственницы Гмелина только 0.316 ± 0.05 г; у лиственницы сибирской 0.467 ± 0.06 г, (данные не приведены). За 10 недель культивирования вес эмбриональной массы у клеточной линии 5 (гибрид лиственницы Сукачева и лиственницы сибирской) составил 570 г (на рис. 2A), у клеточных линий 1–4 он составил меньшую величину — 130–300 г. Спада пролиферационной активности ЭМ у клеточных линий лиственницы Сукачева в течение двух-

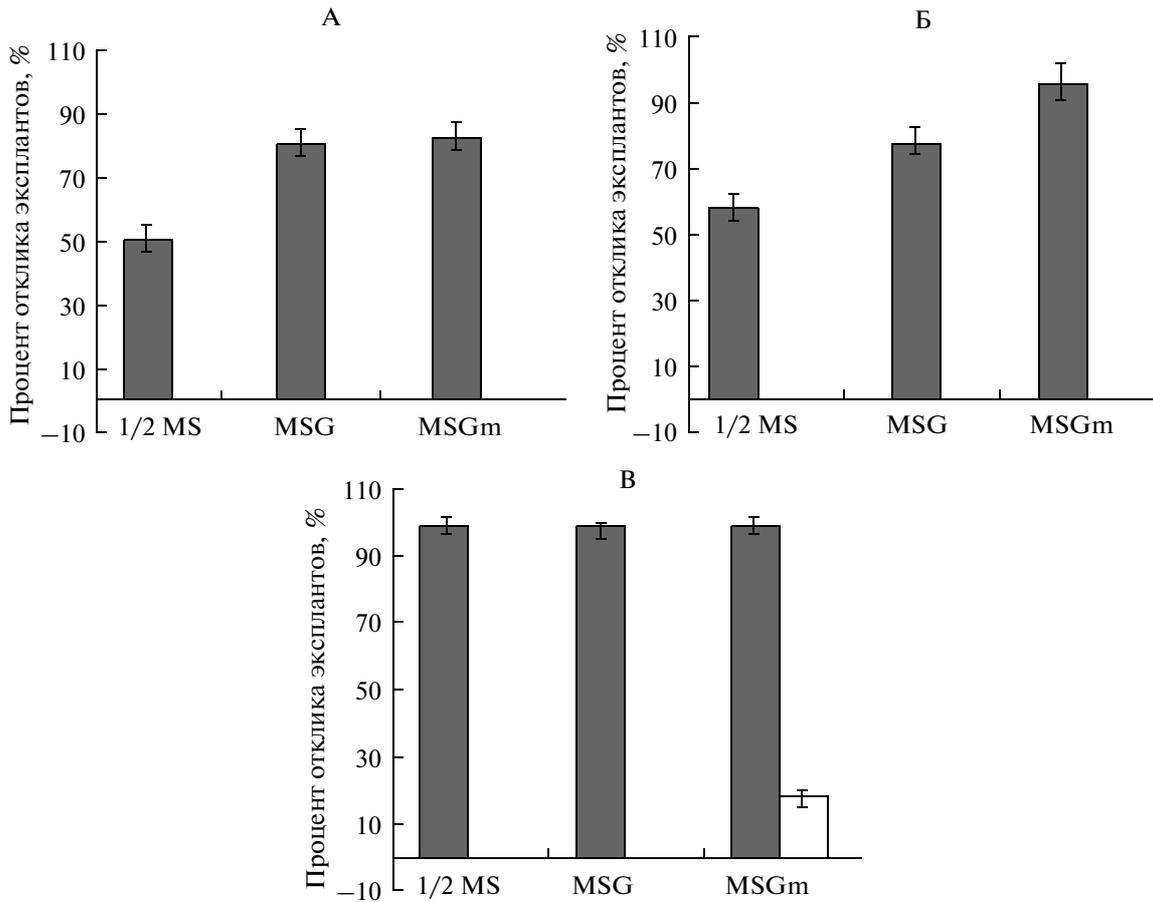


Рис. 1. Индукция каллуса и пролиферация эмбриональной массы у лиственницы Гмелина (А), лиственницы сибирской (Б) и лиственницы Сукачева (В) в зависимости от состава питательной среды (2 мес. культивирования). Неокрашенный столбик – уровень пролиферации для лиственницы Сукачева.

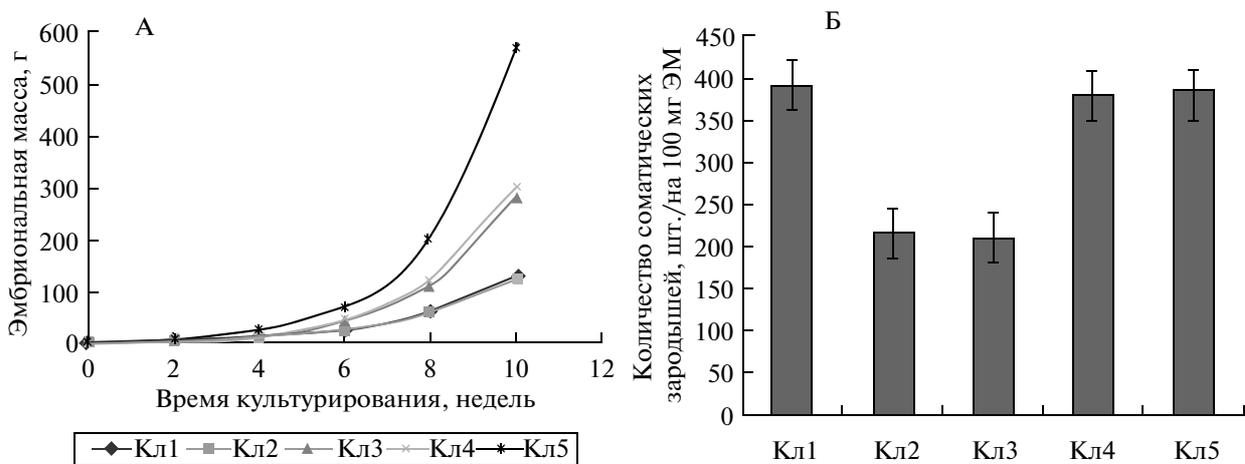


Рис. 2. Пролиферация эмбриональной массы лиственницы Сукачева (А) и число соматических зародышей в 500 мг пролиферирующей ЭМ (Б) у разных клеточных линий (Кл) лиственницы Сукачева.

трех лет культивирования не происходило. Опыты продолжаются.

Число соматических зародышей в пролиферирующей ЭМ у лиственницы Сукачева варьировало от 210 шт. в 100 мг ЭМ (Кл3) до 390 шт. в 100 мг ЭМ (Кл1) (рис. 2Б). Количество соматических зародышей в эмбриональной массе у лиственницы сибирской было значительно ниже (в 4–5 раз; 75 ± 5.6 г), чем у лиственницы Сукачева что совпадает с предыдущими исследованиями данного вида (Белорусова, Третьякова, 2008). Для лиственницы Гмелина этот показатель оказался ниже в 185 раз (1.6 ± 0.6 г).

Цитоэмбриологический контроль соматического эмбриогенеза

Цитоэмбриологический контроль соматического эмбриогенеза показал, что формирование ЭМ, у всех исследуемых видов лиственницы идет одинаково и начинается с удлинения клеток экспланта и их неравного деления, аналогично описанному для лиственницы сибирской (Белорусова, Третьякова, 2008; Третьякова и др., 2007). Именно неравное деление клеток является ключевым моментом, запускающим весь процесс соматического эмбриогенеза. В результате, происходит образование эмбриональных трубок с прилегающей на другом конце эмбриональной инициальной. Подобно зиготическому эмбриогенезу, эмбриональная инициальная претерпевала последовательные деления в обеих плоскостях, в результате чего происходило формирование 8-клеточной и затем 16-клеточной структуры зародыша. Такой зародыш состоит из эмбриональных (меристематических клеток округлой формы) и суспензорных (сильно вытянутых) клеток. Через 30–40 дней в ЭМ каллусов исследуемых видов лиственницы Гмелина, лиственницы сибирской и лиственницы Сукачева обнаруживались соматические зародыши на ранних стадиях эмбрионального развития (глобулярные зародыши) (рис. 3А–Г). Торпедообразные соматические зародыши (следующая стадия развития) были получены только у лиственницы Сукачева на среде MSGm (рис. 3 Д, Е).

Созревание соматических зародышей

Введение каллусов с ЭМ лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина на питательные среды для созревания соматических зародышей не привело к формированию зрелых зародышей. Использование среды с небольшой концентрацией

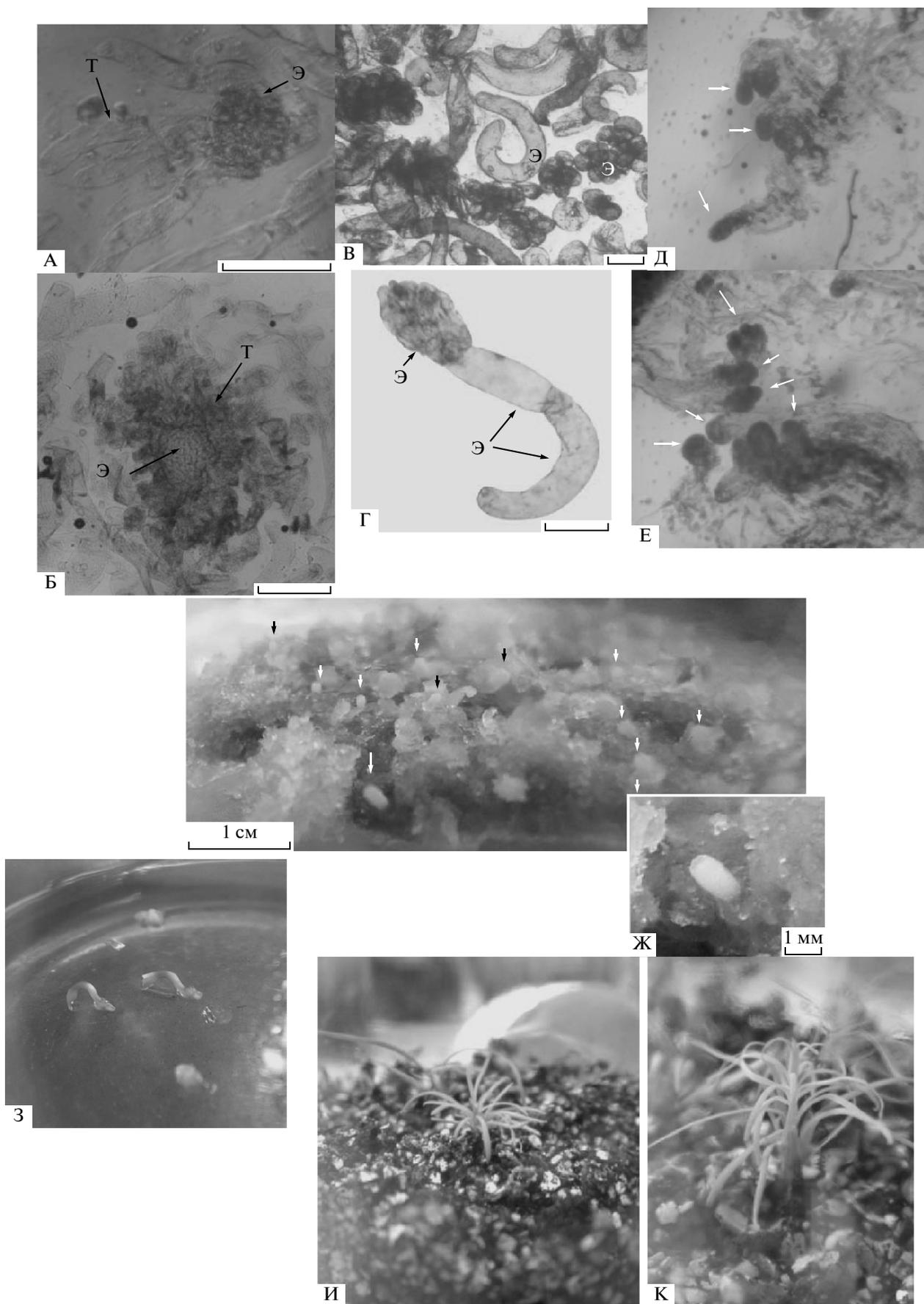
АБК (5.3 мг/л), способствовало потере эмбриогенной активности и каллусы приобретали зеленую окраску. На питательных средах с более высокими концентрациями АБК (15–24 мг/л), созревания соматических зародышей так же не происходило. Каллусы через две недели культивирования имели коричневую окраску, соматические зародыши внутри ЭМ распались на отдельные клетки.

Таким образом, формирования зрелых соматических зародышей, способных к развитию растений у лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина на используемых средах, рекомендуемых зарубежными авторами для созревания соматических зародышей лиственницы европейской и ее гибридов (Lelu-Walter et al., 2006, 2008), не происходило.

Созревание соматических зародышей лиственницы Сукачева проводили на среде MSGm с использованием различных концентраций АБК, ПЭГ, Gelrite и сахарозы. При этом на среде, содержащей АБК (24 мг/л), повышенное содержание сахарозы (60 г/л) и желирующего агента (7 г/л Gelrite), развитие соматических зародышей не происходило (табл. 2). Наблюдалось иссушение ЭМ, соматические зародыши не переходили к созреванию и погибали. Применение в качестве осмотического агента ПЭГ, оказалось более продуктивным. Однако низкие его концентрации (5–7.5%) все же были мало пригодными для достижения 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 мг/л АБК, 10% ПЭГ, 40 г/л сахарозы и 4 г/л Gelrite (табл. 2). На данной среде уже через три-четыре недели культивирования происходило формирование семядольных соматических зародышей. Эмбриональная масса к этому времени уже состояла из глобулярных зародышей, а также зародышей на стадии торпедо, длина которых достигала 400 мкм (рис. 3Д, Е). Через две недели культивирования соматические зародыши увеличивались в размерах. Длина их составила 0.7, ширина 0.4 мм. Происходили закладка и формирование семядольного кольца. На 50 сутки культивирования на среде для созревания соматические зародыши достигали размера 1.1–1.5 мм, имели хорошо выраженную биполярную структуру тела зародыша и полностью сформированные семядоли.

Рис. 3. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* у видов лиственниц, произрастающих в Сибири: А, Б – эмбриональные глобулы и эмбриональные трубки у лиственницы Гмелина; В, Г – эмбриональные глобулы и эмбриональные трубки лиственницы сибирской; Д, Е – торпедообразные соматические зародыши лиственницы Сукачева; Ж – вызревание соматических зародышей лиственницы Сукачева; З – прорастание соматических зародышей лиственницы Сукачева; И, К – соматические проростки лиственницы Сукачева в почвенной культуре.



Для перехода соматических зародышей клеточных линий лиственницы Сукачева к созреванию использовали предобработку ЭМ в жидкой питательной среде. После такой обработки даже спустя 14–30 месяцев активной пролиферации у Кл1 удалось получить зрелые соматические зародыши. При данной технологии также происходило более массовое формирование зрелых соматических зародышей. Созревание соматических зародышей клеточных линий лиственницы Сукачева проходило в течении 40–60 дней.

Проращение соматических зародышей

Соматические зародыши с хорошо развитыми семядолями переносили на среду для проращения (MSGm базового состава, без растительных регуляторов роста, с добавлением активированного угля (10 мг/л)). Через 7–10 дней культивирования происходило удлинение гипокотилия и развитие семядолей (рис. 33). 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 регенеранты были нежизнеспособными и погибали.

Снижение концентрации макро-, микроэлементов и железа (в два раза), а также исключение источников органического азота и витаминов из среды положительно сказывались на проращении соматических зародышей — в 70% происходило нормальное развитие соматических зародышей в проростки. На пятые–седьмые сутки культивирования отмечены удлинение гипокотилия и появление корешка. Появление эпикотилия происходило через две–три недели культивирования на среде для проращения. Соматические зародыши с хорошо развитым корешком и эпикотилем мы считали полноценными растениями и переносили в экопочву (рис. 3И, К).

Таким образом, впервые были получены четыре клеточные эмбриогенные линии лиственницы Сукачева и одна клеточная линия гибрида лиственницы Сукачева и лиственницы сибирской, способные продуцировать массовые соматические зародыши и растения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Образование эмбриогенного каллуса и развитие соматических зародышей у видов лиственницы в основном идет по схеме, описанной для других видов хвойных (von Arnold, Hakman, 1988; Lelu et al., 1994; Klimaszewska et al., 2001; Stasolla, Yeung, 2003; Lelu-Walter, Pagues, 2009). Соматические зародыши проходят фазу инициации, пролиферации, созревания и проращения.

Необходимым условием для запуска соматического эмбриогенеза видов лиственницы, также как и у 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) (von Arnold, Hakman, 1988; Stasolla et al., 2003; Белорусова, Третьякова, 2008). Точно такое же асимметричное деление лежит в основе зиготического эмбриогенеза всех видов растений (Батыгина, 1999). Асимметричное деление заложено уже в первом делении зиготы, которое приводит к образованию двух неравных клеток: маленькой терминальной, которая дает начало зародышу и большой базальной клетке, дающей начало гипофизу и суспензору. При этом полярность, заложенная в зиготе, в результате ее деления поддерживается и передается дочерним клеткам. Таким образом, асимметричное деление и полярность являются, по-видимому, одними из основных критериев, определяющих переход клеток на путь эмбриогенеза: соматического или зиготического.

При зиготическом эмбриогенезе первое и, следом за ним идущее, второе деление зиготы происходит в центре архегония с образованием четырех одинаковых свободных ядер проэмбрио, которые двигаются к основанию архегония, где формируются шестнадцатиклеточное проэмбрио, состоящее из одинаковых клеток, расположенных в четыре этажа (по четыре клетки в каждом). Через 7–10 дней после оплодотворения четыре клетки предпоследнего ряда начинают интенсивно растягиваться до 200–300 мкм и выталкивать клетки нижнего этажа в коррозионную полость женского гаметофита (эндосперма). Таким образом, формируется четыре первичных суспензора и четыре инициали эмбрио. Растяжение клеток суспензора идет с неодинаковой скоростью и инициальные клетки разобщаются. Происходит кливаж (Третьякова, 1990). Именно с данной стадии зиготического эмбриогенеза начинается соматический эмбриогенез, при котором выпадает стадия оплодотворения и образования проэмбрио.

При соматическом эмбриогенезе у лиственниц происходит растягивание соматических клеток зародыша по всей длине гипокотилия до 200–300 мкм и затем их асимметричное деление с образованием эмбриональных трубок — первичного суспензора и инициалей эмбрио (Белорусова, Третьякова, 2008). Процесс соматического эмбриогенеза, наблюдаемый нами у лиственницы Сукачева, идет однообразно, также как и у других видов хвойных: формируется глобула зародыша, затем образуется ось зародыша (стадия торпедо) — идет активный гистогенез тканей зародыша и его вызревание с последующим проращением (von Arnold, Hakman, 1988; Lelu et al., 1994; Klimaszewska et al., 2001; Stasolla, Yeung, 2003; Lelu-Walter, Pagues, 2009). Развитие соматических зародышей происходит внутри

эмбриональной массы, состоящей из зародышево-подобных структур и эмбриональных трубок, выполняющих функцию суспензора. Эмбриональная масса может пролиферировать длительный период времени (2 года и более) и подвергаться криоконсервации (Lelu-Walter et al., 2006), а также может быть использована в экспериментах, направленных на вызревание соматических зародышей. В эмбриональной массе ряд ученых выделяют несколько этапов развития глобулярных зародышей (РЕМ I, РЕМ II и РЕМ III), от завершения которых зависит важный этап соматического эмбриогенеза — созревание соматических зародышей (Filonova et al., 2000; Stasolla, Yeung, 2003; Lelu-Walter et al., 2008). Применительно к сибирским видам лиственниц было отмечено, что эмбриогенный каллус лиственницы Гмелина и лиственницы сибирской соответствовал начальным стадиям развития — РЕМ I и РЕМ II, перехода к стадии РЕМ III не происходило, в то время как для лиственницы Сукачева данный этап развития эмбриональной массы наблюдался.

Морфогенетическая программа развития зародыша регулируется фитогормонами. Запуск асимметричного деления идет под действием ауксина и цитокинина в определенных концентрациях и разном их соотношении друг с другом. При формировании глобулярных зародышей концентрация цитокининов уменьшается в 2 раза. Переход к стадии дифференциации и запрограммированной клеточной смерти суспензора идет на безгормональной среде (Filonova et al., 2000). Переход соматических зародышей хвойных в стадию созревания зависит от присутствия АБК в питательной среде, а также снижения осмотического потенциала питательной среды, которое обычно достигается путем повышения концентрации сахарозы или желирующего агента, или применением полиэтиленгликоля (Stasolla, Yeung, 2003; Stasolla et al., 2003). АБК играет большую роль в формировании биполярной структуры зиготического зародыша. У зиготических зародышей основным источником АБК являются мегагаметофиты (Kong et al., 1999). Поэтому, для созревания и роста соматических зародышей, АБК добавляется в питательную среду в определенной концентрации в зависимости от вида растения (Stasolla et al., 2002; Vales et al., 2006). Оптимальная концентрация АБК для европейских видов *Larix* 40–60 μM (Lelu-Walter et al., 2006), *Pinus* — 60–120 μM (Klimaszewska et al., 2001), *Picea* — 12–60 μM (Stasolla, Yeung, 2003). Для созревания соматических зародышей видов лиственницы, произрастающих на территории Сибири нами были использованы более высокие концентрации АБК (120 μM), что соответствует 32 мг/л.

Кроме того, важным моментом в созревании соматических зародышей является создание осмотического стресса. Выявлено, что с увеличением концентрации Gelrite (до 8 г/л) и сахарозы (до

60 г/л) количество соматических зародышей у видов сосны, ели и лиственницы и последующее их прорастание увеличивается (von Arnold, Hakman, 1988; Lelu et al., 1994, 2006; Klimaszewska et al., 2001; Lelu-Walter et al., 2006; Lelu-Walter, Paques, 2009). 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 полиэтиленгликоль. 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 (Stasolla et al., 2002, 2003).

Хорошо известно, что генотип растения донора оказывает большое влияние на рост эмбриональной массы и образование соматических зародышей. Только определенные генотипы деревьев, обнаруженные у ряда видов хвойных, продуцировали соматические зародыши. Высокая частота индукции эмбриогенного каллуса (до 65%) была описана у гибрида *L. eurolepis* (Lelu-Walter, Paques, 2009), у которого почти все введенные в культуру экспланты (94%) формировали ЭМ. Под строгим генетическим контролем шла инициация эмбриогенного каллуса у *Picea glauca* (Stasolla, Yeung, 2003), *Pinus strobus* (Klimaszewska et al., 2001), *Pinus taeda* (MacKay et al., 2006; Vales et al., 2007), *Pinus sylvestris* (Niskanen et al., 2004), *Pinus pinea* (Carneros et al., 2009). Показано, что при контролируемом опылении наиболее перспективным является использование материнских деревьев доноров, экспланты которых способны формировать эмбриогенный каллус и соматические зародыши (MacKay et al., 2006). Часто отмечается также, что не все генотипы, активно формирующие эмбриональную массу, способны к пролиферации эмбриогенных культур и созреванию соматических зародышей. Так, из эксплантов генотипов, образующих каллусы с ЭМ, только в единичных случаях формируется активно пролиферирующая ЭМ (von Arnold, Hakman, 1988; Klimaszewska, Cyr, 2002; Stasolla, Yeung, 2003; Carneros et al., 2009).

В проведенных нами исследованиях способностью к формированию ЭМ обладали 3% генотипов лиственницы Сукачева. Влияние генотипа также наблюдалось при переходе к созреванию соматических зародышей. В наших экспериментах у полученных клеточных линий лиственницы Сукачева и ее гибрида с лиственницей сибирской соматические зародыши активно созревали, формируя полноценные растения. Таким образом, эмбриогенные культуры можно получить только с ограниченного числа деревьев.

Таким образом, в России нами впервые был получен соматический эмбриогенез у лиственницы

сибирской (Белорусова, Третьякова, 2008) и пролиферирующие клеточные линии и растения-регенеранты у лиственницы Сукачева и ее гибрида с лиственницей сибирской. Процесс созревания соматических зародышей успешно шел у лиственницы Сукачева на среде MSGm дополненной АБК, ИМК, ПЭГ и Gelrite.

Работа выполнена при поддержке гранта: РФФИ (грант №11-04-00281) и интеграционным проектом № 53 "Генофонд хвойных..."

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батыгина Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 6. С. 884–898.
- Белорусова А.С., Третьякова И.Н. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 2. С. 1–10.
- Дылис Н.В. Лиственница сибирская. Материалы к систематике, географии и истории. М.: МОИП, 1947. 137 с.
- Ирошников А.И. Лиственницы России. Биоразнообразие и селекция. М.: ВНИИЛМ, 2004. 182 с.
- Милютин Л.И. Биоразнообразие лиственниц России // Хвойные бореальной зоны. 2003. Вып. 1. С. 6–9.
- Рождков А.С., Хлиманкова Е.С., Степанчук Е.С. Восстановительные процессы у хвойных при дефолиации. Новосибирск.: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. 88 с.
- Тренин В.В. Цитоэмбриология лиственницы. Л.: Наука, 1986. 88 с.
- Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных: физиологические аспекты. Новосибирск: Наука, 1990. 157 с.
- Третьякова И.Н., Баранчиков Н., Буглова Л.В., Белорусова А.С., Романова Л.И. Особенности формирования генеративных органов лиственницы сибирской и их морфогенетический потенциал // Успехи современной биологии 2006. Т. 126. № 5. С. 472–480.
- Becwar 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Filonova L.H., Bozhkov P.V., Brukhin V.B., Daniel G., Zhivotovsky B., von Arnold S. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce // Cell Sci. 2000. V. 113. P. 4399–4411.
- Klimaszewska K. Plantlet development from immature zygotic embryos of hybrid larch through somatic embryogenesis // Plant Sci. 1989. V. 63. P. 95–103.
- Klimaszewska K., Cyr D.R. Conifer somatic embryogenesis: I. Development // Dendrobiology. 2002. V. 48. P. 31–39.
- 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.
- 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 // In: Jain S.M., Gupta P.K., Newton R.J., eds. Somatic embryogenesis in woody plants. V. 4. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1999. P. 1–28.
- 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.
- Lelu-Walter M.-A., Bernier-Cardon M., Klimaszewska K. Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* // Plant Cell Rep. 2006. V. 25. P. 767–776.
- 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.
- Lelu-Walter M.-A., Pâques 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. 104–114.
- MacKay J.J., Becwar M.E., Park Y.-S., Corderro L.P., Pullman G.S. // Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding // Tree Genet. Genomes. 2006. V. 2. P. 1–9.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. № 4. P. 473–497.
- Niskanen A.-M., Lu J., Seitz S., Keinonen K., Von Weisenberg K., Pappinen A. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*) // Tree Physiology. 2004. V. 24. P. 1259–1265.
- 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.
- Park Y.S., Lelu-Walter M.A., Harvengt L., Trontin J.F., MacEacheron I., Klimaszewska K., Bonga J.M. 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.
- 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.

- 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.
- Stasolla C., van Zyl L., Egertsdotter D.W., Sederoff R.* The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos // *Plant physiology.* 2003. V. 131. P. 49–60.
- Vales T., Feng X., Ge L., Xu N., Cairney J., Pullman G., Peter G.* Improved somatic embryo maturation in loblolly pine by monitoring ABA-responsive gene expression // *Plant Cell Rep.* 2007. V. 26. P. 133–143.
- Von Arnold S., Hakman I.* Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA) // *Plant Physiol.* 1988. V. 132. P. 164–169.

Somatic Embryogenesis in *in vitro* Culture of Three Larch Species

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

Sukachev Institute of Forestry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia
e-mail: culture@ksc.krasn.ru

Abstract—Embryogenic callus formation in different larch species from Siberia (*Larix sibirica*, *L. gmelinii*, and *L. sukaczewii*) was carried out on MSGm medium supplemented with growth regulators (2,4-D and BAP) and followed one and the same scheme: elongation of somatic cells and their asymmetric division with formation of initial and tube cells. The cells of embryo initial underwent sequential divisions and formed embryonic globules which caused the formation of somatic embryos. Somatic embryos became mature and germinated by addition of ABA and PEG into the medium. Long-term proliferating cell lines and regenerant plants were obtained in Sukachev larch and its hybrid with Siberian larch. The success of somatic embryogenesis depended on the genotype of the donor tree.

Keywords: somatic embryogenesis, *in vitro* culture, Siberian larch, Dahurian larch, Sukachev larch.