

УДК 581.3:576.5:582.475.4

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ *PINUS PUMILA* И ПРОДУКТИВНОСТЬ ЭМБРИОГЕННЫХ ЛИНИЙ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO*

© 2015 г. И. Н. Третьякова, Д. Н. Шуваев

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН
660036 Красноярск, Академгородок 50, стр. 28
E-mail: culture@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 07.05.2014 г.
Окончательный вариант получен 27.04.2015 г.

Зиготические зародыши и мегагаметофиты *Pinus pumila* вводили в культуру *in vitro* на среду 1/2 LV, дополненную регуляторами роста 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) и бензиламинопурином (6-БАП) с целью индукции соматического эмбриогенеза. Получено четыре длительно пролиферирующие клеточные линии от двух генотипов. Клеточные линии отличались по числу глобулярных соматических зародышей и массе эмбриогенных каллусов. Мультипликация клеточных линий происходила в результате соматического полиэмбриогенеза через кливаж. На питательной среде для вызревания были получены зрелые соматические зародыши кедрового стланика. Однако соматические зародыши не всех эмбриогенных клеточных линий достигали стадии вызревания. Впервые в культуре *in vitro* получены регенеранты кедрового стланика.

Ключевые слова: *Pinus pumila*, зиготические зародыши, мегагаметофиты, соматические зародыши, пролиферирующие эмбриогенные линии, *in vitro*.

DOI: 10.7868/S0475145015050092

ВВЕДЕНИЕ

Кедровый стланик (*Pinus pumila* (Pall.) Regel), относящийся к пятихвойным соснам, произрастает на северо-востоке Сибири и занимает обширный ареал от северного Прибайкалья до полуострова Камчатка. Данный вид имеет большое экологическое и хозяйственное значение. Его заросли играют важную фитоценотическую и ландшафтную роль. Семена кедрового стланика являются важным пищевым ресурсом для животных. Однако на большей части своего ареала вид подвергается серьезной угрозе из-за длительных лесных пожаров, мешающих его естественному восстановлению.

Проблемы восстановления популяции кедрового стланика и сохранения его генофонда могут быть решены при помощи метода микроклонального размножения через соматический эмбриогенез. При помощи данного метода можно осуществлять массовое тиражирование данного вида с селекционно-значимыми признаками, проводить отбор в культуре *in vitro* с применением ДНК-микрочипов, производить трансформацию, а также подвергать полученные эмбриогенные линии криоконсервации для создания банка ценных генотипов. Феномен соматического эм-

бриогенеза кедрового стланика может служить не только практическим целям, но и является модельной системой для изучения закономерностей клеточной дифференцировки и реализации морфогенетической программы развития в раннем онтогенезе (Lelu, 1994; Von Arnold et al., 2002; Park et al., 2006).

К настоящему времени эмбриогенный каллус и соматические зародыши получены у 28 видов рода *Pinus* (Laine, David, 1990; Salajova et al., 1995; Garin et al., 1998; Lelu et al., 1999; Arya et al., 2000; Klimaszewska, Cyr, 2002; Pullman, Bucalo, 2010; Третьякова и др., 2014), и для более чем половины из них проведена оптимизация условий культивирования, обеспечивающих регенерацию из соматических зародышей растений. Частота инициации эмбриогенного каллуса у большинства изученных видов рода *Pinus* оказалась невысокой. У *P. taeda* она колебалась от 2% до 25% (MacKay et al., 2006), у *P. strobus* от 52.9% (Finer et al., 1989) до 76% (Klimaszewska et al., 2001), у *P. pinea* от 0.5 до 7.2% (Carneros et al., 2009), у *P. pinaster* в пределах 15% (Borcetche, Raques, 1995). Среди пятихвойных сосен индукция соматического эмбриогенеза была описана у *Pinus koraiensis* (Bozhkov et al., 1997), *P. sibirica* (Третьякова и др., 2014; Третьякова, Ворошилова, 2014), *P. pumila* (Носкова



Рис. 1. Кедровый стланик в естественных условиях окрестностей поселка Новая Чара (фото Н.Е. Носковой).

и др., 2012; Tretiakova et al., 2012). Частота инициации эмбрионного каллуса у *P. sibirica* и *P. pumila* была очень низкой и не превышала 0.2–0.5% (Носкова и др., 2012, Третьякова и др., 2014).

В данной статье приводятся результаты биотехнологии получения пролиферирующих эмбрионных клеточных линий кедрового стланика и регенерантов, а также анализ продуктивности полученных эмбрионных культур в процессе длительного культивирования *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследования служили семена 80–100-летних деревьев кедрового стланика, произрастающих в естественных условиях в окрестностях поселка Новая Чара (отроги Удоканского хребта, юго-восточная экспозиция, 56°46' с.ш. и 118°16' в.д., 807 м над уровнем моря), в окрестностях озера Леприндо (56°37' с.ш. и 117°33' в.д., 986 м над уровнем моря) и в Якутии, Алданский район (Алданское нагорье, 58°37' с.ш. и 125°24' в.д.) (рис. 1).

Семена кедрового стланика у 25 деревьев из окрестностей Новой Чары и 10 деревьев озера Леприндо были собраны в 2010 году (первая декада июля) и у 20 деревьев из Якутии в 2012 году (третья декада июля).

Индукция эмбрионного каллуса

В качестве эксплантов для индукции эмбрионного каллуса использовали зиготические зародыши на стадии развития семядолей и мегагаметофиты вместе с зиготическими зародышами на стадии глобулы. Стерилизацию посадочного материала проводили в два этапа. Первый этап заключался в поверхностной обработке семян раствором перманганата калия (0.3%) в течение 5 мин с последующей промывкой водопроводной водой, затем следовало извлечение мегагаметофитов с зародышами из семенной кожуры. Мегагаметофиты с зародышами стерилизовали в 3%-м спиртовом растворе йода в течение 5 мин с последующей 3-х кратной промывкой в стерильной дистиллированной воде. Для культуры зародышей из тканей мегагаметофитов семян стерильными инструментами извлекали зародыши. Зиготические зародыши и мегагаметофиты высаживали на поверхность агаризованной питательной среды для инициации 1/2LV₁ (Litvae et al., 1985), которая отличалась от базовой питательной среды LV сниженным в два раза содержанием макроэлементов. В питательную среду добавляли сахарозу (30 г/л), глутамин (500 мг/л), аскорбиновую кислоту (500 мг/л), агар (7 г/л), регуляторы роста: 2,4-Д (2 мг/л) и 6-БАП (1 мг/л). Работы проводили в стерильных условиях лами-

Типы модификации питательной среды 1/2LV₄, использованных для вызревания соматических зародышей

Концентрация АБК в среде, мкмоль/л							
30		60		120		200	
Полиэтиленгликоль, г/л							
50	100	50	100	50	100	50	100
Сахароза, г/л							
60							

нар-бокса. Культивирование осуществляли в темноте в условиях термостата при температуре 23–25°C.

Пролиферация эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ)

Для пролиферации ЭСМ использовали среду 1/2LV₂, которая отличалась от базовой индукционной среды 1/2LV₁ сниженным содержанием гормональных регуляторов роста (в 2 раза), сахарозы (20 г/л) и аскорбиновой кислоты (300 мг/л). Культивирование проводили в темноте в условиях термостата при температуре 23–25°C. Пересадки на свежие питательные среды осуществляли каждые 2 недели.

Оценку прироста каллусной массы на питательной среде для пролиферации проводили путем измерения объема каллуса по формуле $V = 2/3\pi SLh$, где V – объем каллуса, мм³; π – 3.14; S – ширина каллуса, мм; L – длина каллуса, мм; h – высота каллуса, мм (Белоруссова, Третьякова, 2008).

Предобработка ЭСМ на жидкой и агаризованной безгормональной питательной среде

Предобработку на жидкой питательной среде без гормонов (суспензионная культура) 1/2LV_{3L} осуществляли путем перенесения фиксированного количества ЭСМ в колбы с 50 мл питательной среды. Культивирование суспензионных культур проводили на круговой качалке (60 об./мин.) в темноте в течение 4-х сут при температуре 23–25°C.

Предобработку ЭСМ на твердой (агаризованной) питательной среде 1/2LV_{3S} проводили путем переноса ЭСМ в чашки Петри с последующим распределением ЭСМ по поверхности среды стерильным шпателем. Эта процедура обеспечивала большую поверхность контакта эмбриональных тканей со средой, создавая, тем самым, условия для лучшей очистки культуры от гормональных регуляторов роста. Культивирование ЭСМ на твердой безгормональной питательной среде проводили в темноте в течение 14 сут при температуре 23–25°C.

Вызревание соматических зародышей

Эксперименты по вызреванию соматических зародышей проводили на агаризованных питательных средах 1/2LV₄ с добавлением осмотических агентов (полиэтиленгликоль, сахароза) и различных концентраций АБК (таблица).

Из жидкой безгормональной питательной среды пересадку на среду для вызревания осуществляли при помощи фильтрации суспензии через стерильные фильтры, которые помещали в воронку Бюхнера, соответствующего диаметра. Наливали в воронку 25 мл суспензии и откачивали жидкую фракцию с помощью отсасывателя медицинского ОМ-1. После фильтрации, фильтровальную бумагу с осадком ЭСМ переносили на поверхность питательной среды для вызревания.

Последовательность действий при пересадке ЭСМ из твердой безгормональной среды на среду для вызревания была такой же, как и при субкультивировании из среды для пролиферации на твердую безгормональную питательную среду.

Прорастание соматических зародышей и высадка регенерантов в почвенную смесь

Для прорастания соматических зародышей кедрового стланика использовали агаризованную питательную среду 1/4LV₅. Из питательной среды 1/2LV₁ были исключены: гидролизат казеина, L-глутамин, витамины (тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота), сахароза и гормональные регуляторы роста. Прорастание соматических зародышей проводили при 16-ти часовом фотопериоде при 23–25°C. Соматические проростки, которые образовывали корни, считали проросшими и высаживали в почвенную смесь (вермикулит и торф в соотношении 1 : 1).

Цитологический анализ

Для проведения цитологического анализа использовали давленные препараты. Экспланты весом 50 мг помещали на предметное стекло и 1–2 мин выдерживали в красителе (сафранин и гематоксилин). Далее добавляли глицерин, и накрывали препарат покровным стеклом. Опреде-

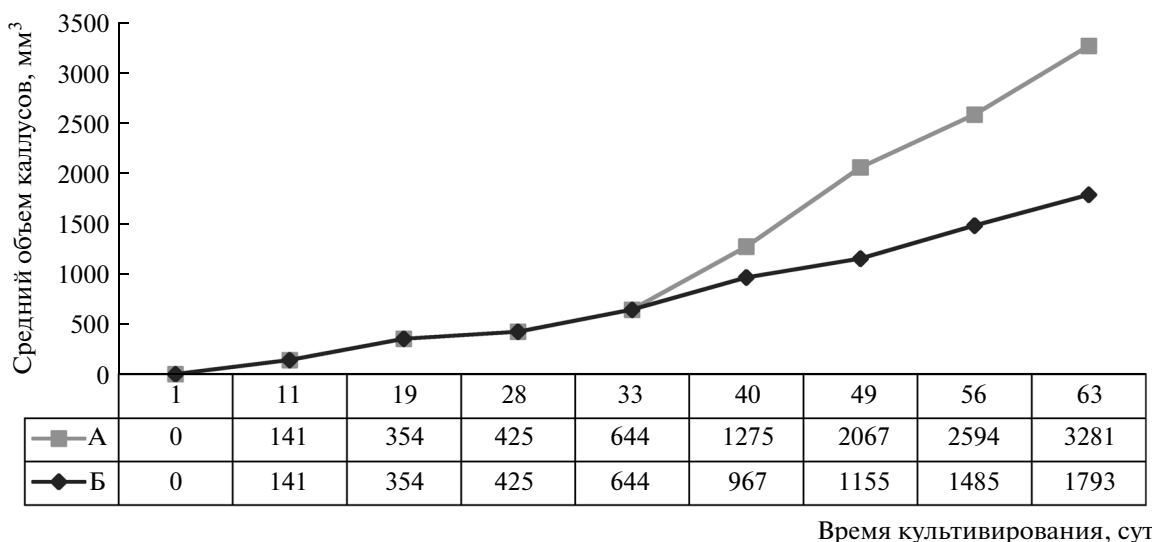


Рис. 2. Рост каллусных культур кедрового стланика А – в жидкой среде, Б – на твердой среде (культура зародышей).

ляли число соматических зародышей, содержащихся в 1 г ЭСМ.

Препараты просматривали на микроскопе Carl Zeiss Axio Star Plus и микроскопе МИКМЕД-6 ЛОМО со встроенной цифровой камерой DSM510 при увеличениях 4×, 10×.

Статистическую обработку материала проводили по стандартным методикам (Рокицкий, 1973) с использованием программы Microsoft Office Excel 2003. Графическую обработку материала проводили с использованием программы Adobe Photoshop CS5.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Культура зародышей

При введении в культуру зиготических зародышей на стадии семядольного кольца на питательную среду 1/2LV₁ у 90% образцов на 4–7 сутки культивирования наблюдались морфологические изменения. Образование каллусов шло в районе зародышевого корешка, затем, через 3–4 недели охватывало весь гипокотиль. Через 1 мес. культивирования при достижении объема каллуса 750 мм³ полученные клеточные линии были переведены на жидкие и твердые среды для пролиферации (1/2LV₂). Через 1.5 мес. культивирования число каллусов с признаками пролиферации сократилось в 2 раза (48%). При этом рост каллусов на жидкой среде (суспензионная культура) шел в 2 раза быстрее, чем на твердой среде (рис. 2). Через 6–10 мес. культивирования на пролиферационной среде каллусы приобретали плотную структуру и каллусы отмирали.

Цитологический анализ показал, что в процессе культивирования на 7–10 день происходило

вытягивание клеток экспланта в длину до 300–400 мкм. В клетках просматривалось ядро, которое смещалось к одному из полюсов. Через 2.5 недели культивирования на пролиферационной среде (1.5 мес. культивирования) в вытянутых клетках наблюдалось асимметричное деление с образованием эмбриональных трубок, несущих на одном из концов эмбриональные инициалы. Эмбрионный каллус был представлен эмбрионально-суспензорной массой (ЭСМ), которая состояла из эмбриональных трубок, один из концов которых соединялся с инициальной клеткой или группой эмбриональных клеток – глобул разных размеров (рис. 3). Однако при последующем культивировании на пролиферационной среде эмбриональные структуры превращались в обычные клетки неэмбрионного каллуса.

Культура мегагаметофитов

При введении в культуру мегагаметофитов вместе с зародышами на стадии глобулы (две три недели после оплодотворения, начало июля) через 3 недели культивирования на среде 1/2LV₁ в микропиллярной части мегагаметофита наблюдалась экструзия каллуса. Из 1050 образцов, введенных в культуру через 1.5 мес. культивирования на пролиферационной среде 1/2LV₂ были получены 4 эмбрионные клеточные линии (Кл) от двух деревьев (№ 21 и № 22): 21'.4, 21'.11, 21'.12, 22'.9 (рис. 4). Таким образом только 0.4% эксплантов формировали эмбрионные культуры. Лучшим вариантом питательной среды для пролиферации ЭСМ явилась среда с 2,4-Д (2 мг/л) и 6-БАП (0.5 мг/л), и с аскорбиновой кислотой в концентрации 300 мг/л.

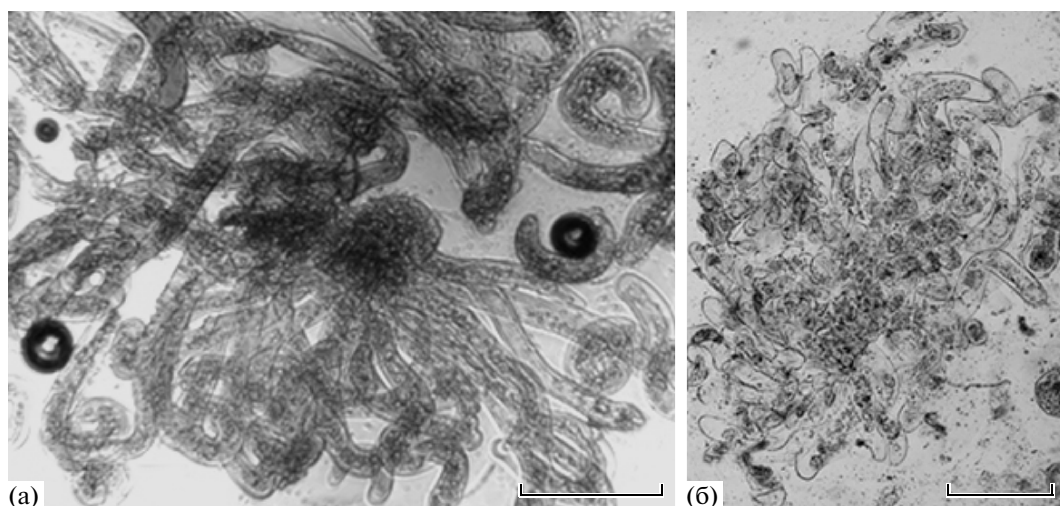


Рис. 3. Эмбрионально-сuspензорные структуры в культурах изолированных зародышей кедрового стланика. Шкала 200 мкм. а – трубки и глобулы в процессе инициации соматического эмбриогенеза, б – эмбриональные глобулы: пролиферация на твердой среде.

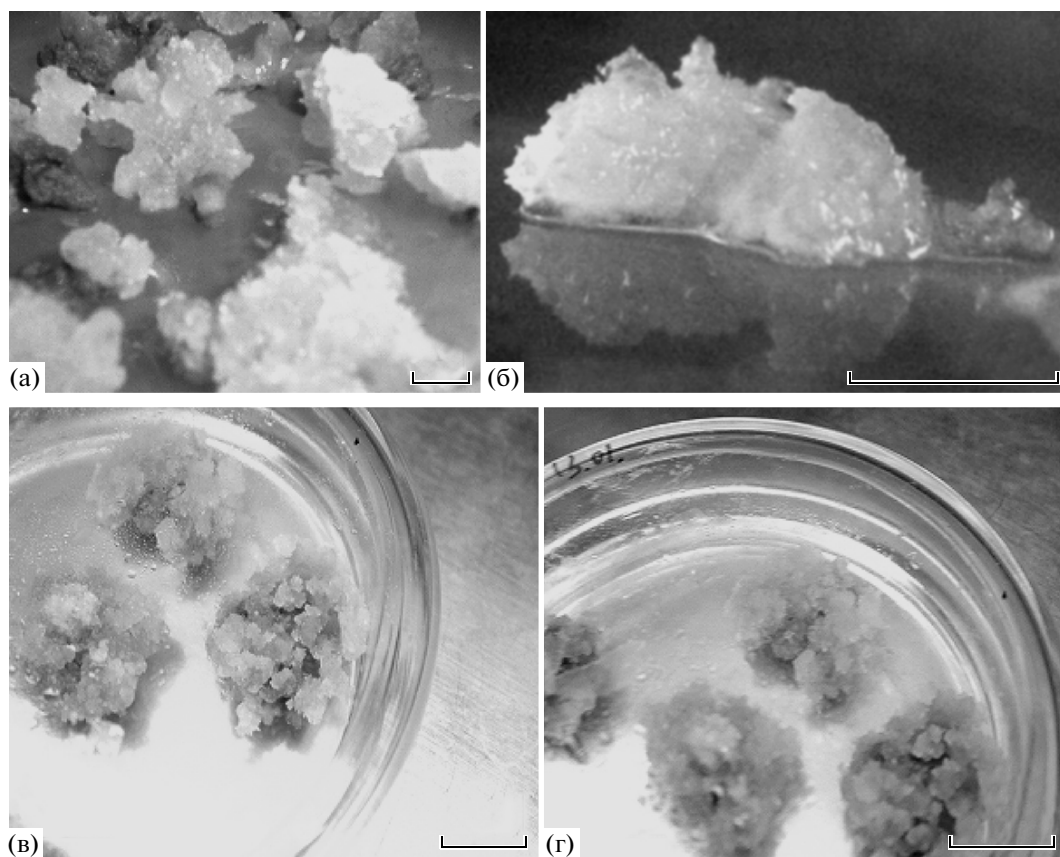


Рис. 4. Эмбриогенный каллус кедрового стланика на питательной среде 1/2LV₁: а – Кл 21'.4, б – Кл 21'.11, в – Кл 21'.12, г – Кл 22'. 9. Шкала 1 см.

Цитологические исследования показали, что через 1 мес. культивирования на среде инициации эмбриогенный каллус состоял из ЭМС, кото-

рая включала глобулы соматических зародышей и клетки суспензора. Через две недели культивирования на пролиферационной среде число сомати-

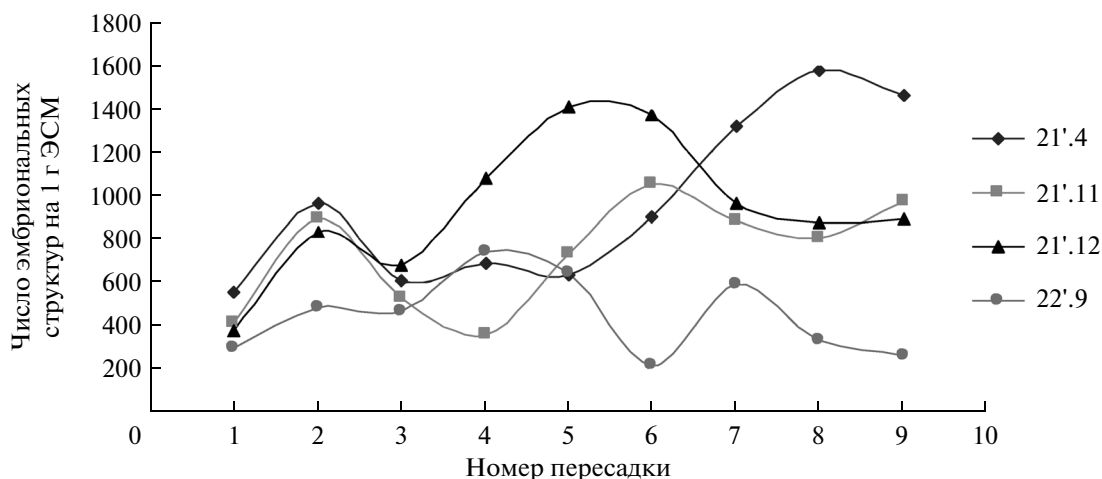


Рис. 5. Число соматических зародышей, продуцируемых эмбрионными клеточными линиями (промежуток между пересадками 14 дней).

ческих зародышей в 1 г ЭСМ разных клеточных линий колебалось от 444 у Кл 22'.9 до 967 у Кл 21'.4. В течение четырех месяцев культивирования на пролиферационной среде (9 пересадок) в клеточной линии 21'.4 наблюдали увеличение числа соматических зародышей до 1290 на 1 г ЭСМ, в клеточных линиях 21'.11 и 21'.12 это число составило 970 и 840 соответственно. Кл 22'.9 напротив, характеризовалась спадом в продукции соматических зародышей до 230. Наибольшее число соматических зародышей у данной клеточной линии было отмечено при четвертой пересадке (680) (рис. 5). Через 1.5 года культивирования на пролиферационной среде число соматических зародышей на 1 г эмбрионного каллуса оставалось высоким: для Кл 21'.4 – 1230 ± 32.1 , Кл 21'.11 – 900 ± 22.7 , Кл 21'.12 – 800 ± 28.2 , Кл 22'.9 – 203 ± 17.8 .

Глобулы соматических зародышей располагались на поверхности каллуса и образовывали скопления, а их суспензоры тесно примыкали друг к другу (рис. 6а–6д). У глобулярных соматических зародышей шел активный кливаж (рис. 6е).

Предобработка ЭСМ клеточных линий на безгормональных питательных средах 1/2LV_{3L} и 1/2LV_{3S} перед вызреванием соматических зародышей

Тип питательной среды (жидкой или твердой) оказал большое влияние на развитие соматических зародышей при переводе их на среду с АБК. После 4-дневной обработки ЭСМ на жидкой безгормональной среде и перевода ЭСМ на питательную среду с АБК на поверхности каллуса было отмечено массовое появление соматических зародышей, число которых составило 15–20 штук на 1 г каллуса.

При пересадке ЭСМ с твердой безгормональной питательной среды на питательную среду с АБК число соматических зародышей оказалось очень низким (1–3 штуки на 1 г каллуса). Следовательно, для получения большого количества зрелых соматических зародышей целесообразно применение предобработки с использованием жидкой безгормональной питательной среды.

Вызревание соматических зародышей

Вызревание соматических зародышей происходило на среде 1/2LV₄ с добавлением АБК в концентрации 120–200 мкмоль/л, сахарозы в концентрации 60 г/л и 10% ПЭГ. Соматические зародыши кедрового стланика становились видимыми невооруженным глазом на третью неделю культивирования (рис. 7). На средах с меньшей концентрацией АБК (30 и 60 мкмоль/л) и 5% ПЭГ вызревание соматических зародышей не происходило.

Эмбрионные Кл формировали зрелые соматические зародыши через 40 дней культивирования на питательной среде для вызревания. В Кл 21'.4 было сформировано всего 3 зрелых соматических зародыша на 1 г ЭСМ (0.4%). В Кл 21'.11 и 21'.12 – 36 (4%) и 63 (18%), соответственно. В ЭСМ Кл 22'.9 формирования зрелых соматических зародышей не происходило.

Прорастание соматических зародышей и высадка в почвенную смесь полученных регенерантов кедрового стланика

Из 102 соматических зародышей, полученных на питательной среде для вызревания, при выращивании их на среде для прорастания 1/4LV₅ только у 9 происходило образование корней. Соматические зародыши из клеточной линии 21'.11

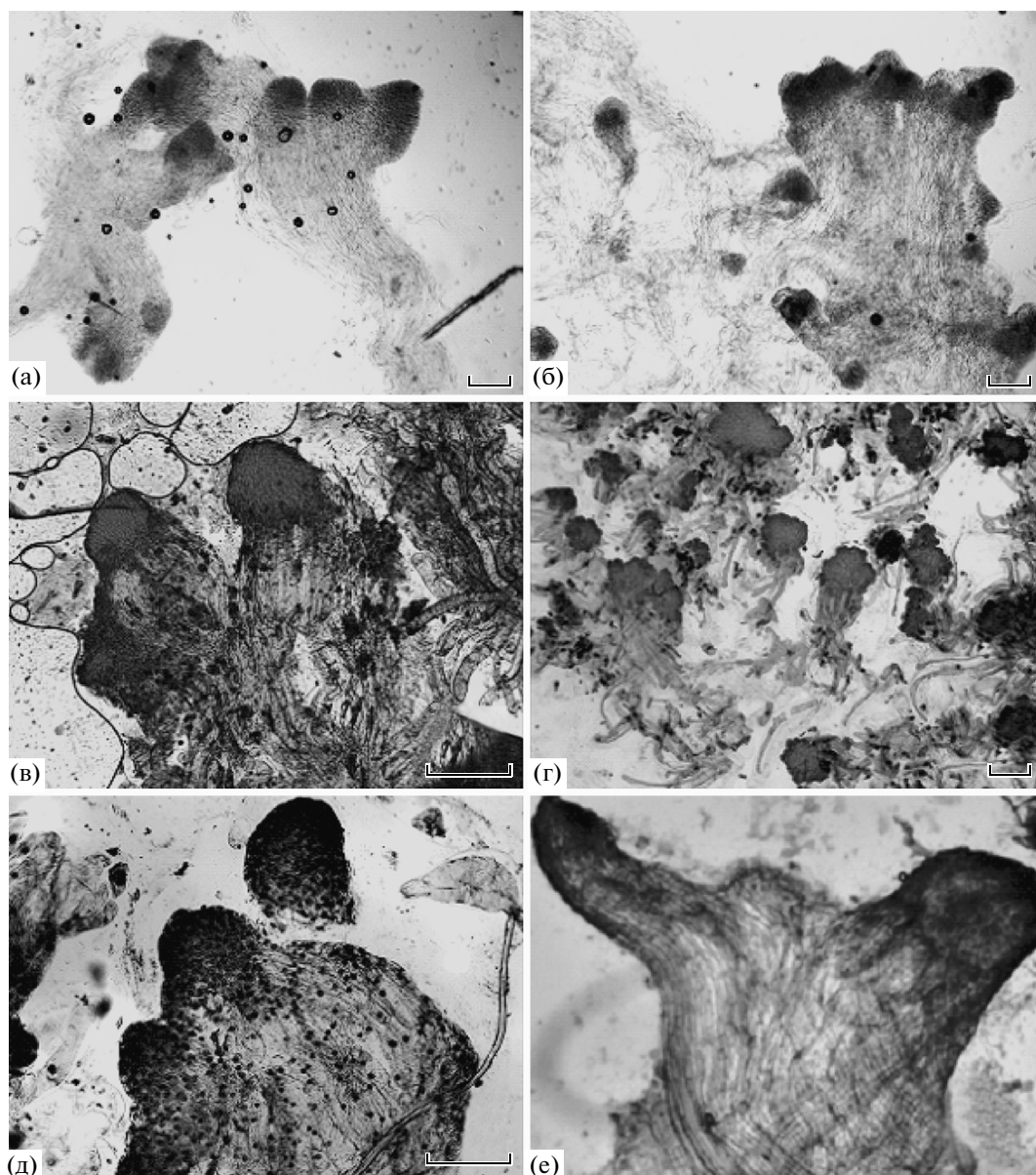


Рис. 6. Полиэмбриогенез соматических зародышей кедрового стланика. а–д – Скопление соматических зародышей. е – Кливаж соматических зародышей. Шкала 200 мкм.

сформировали 3 регенеранта, из клеточной линии 21'.12 – 6 регенерантов.

Соматические растения с хорошо развитым корнем и эпикотилем были высажены в почвенную смесь состава вермикулит : торф (1 : 1) (рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ

Соматический эмбриогенез был индуцирован у многих видов рода *Pinus* (Pullman, Bucalo, 2010; Третьякова и др., 2014). У пятихвойных сосен индукция соматического эмбриогенеза была описана у *P. koraiensis* (Bozhkov et al., 1997), *P. sibirica* (Третьякова и др., 2014), *P. pumila* (Носкова и др.,

2012; Tretiakova et al., 2012). Однако частота инициации эмбриогенного каллуса у представителей пятихвойных сосен, как и у других видов рода *Pinus* оказалась очень низкой и зависела от дерева донора, стадии введения экспланта в культуру, состава питательной среды, введения в среду гормонов, желирующих агентов и других факторов (Becwar et al., 1990; Percy et al., 2000; Klimaszewska et al., 2001; Niskanen et al., 2004; MacKay et al., 2006; Lelu-Walter et al., 2008, 2013; Третьякова и др., 2014).

У *Pinus pumila* образование каллуса на среде 1/2LV₁ шло у значительного большинства эксплантов зародышей семян и интактных мегагаме-

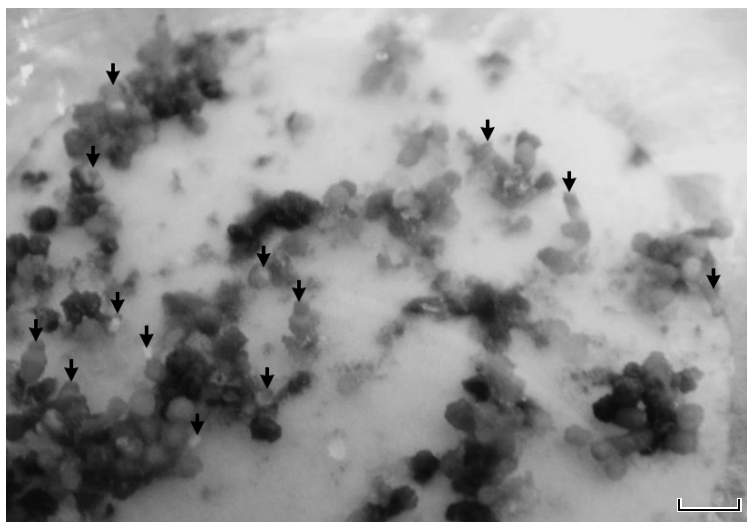


Рис. 7. Вызревание соматических зародышей кедрового стланика на среде с АБК. Шкала 1.5 см.

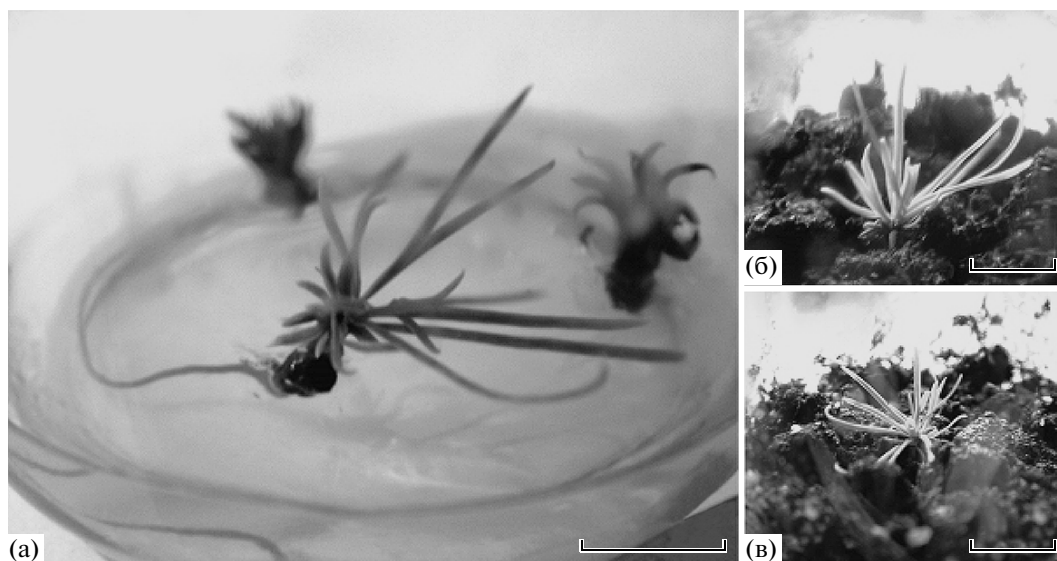


Рис. 8. Регенеранты кедрового стланика а – агаризованная среда, б–в – в почве. Шкала 2 см.

тофитов, введенных в культуру с зародышами. Однако каллусы, полученные из зиготических зародышей и большинства мегagamетофитов через 6–10 мес. культивирования приобретали, как правило, плотную матовую структуру и затем подвергались некрозу. Формирование пролиферирующих каллусов с рыхлой, белой структурой было обнаружено у отдельных мегagamетофитов, введенных в культуру вместе с зародышами на глобулярной стадии развития. Из 1050 образцов мегagamетофитов только четыре экспланта дали длительно пролиферирующие эмбриогенные клеточные линии от двух генотипов (из 55). Таким образом частота инициации эмбриогенных культур у кедрового стланика оказалась очень

низкой и составила 0.4% от числа введенных в культуру эксплантаов.

Для инициации эмбриогенных культур важное значение имеет стадия развития экспланта при введении его в культуру *in vitro*. Выявлено, что для видов *Pinus*, *Abies* наиболее оптимальной стадией введения в культуру является стадия предсемядольного зародыша (стадия инициации семядольного кольца), а для видов *Picea*, *Larix* – стадия развитых семядолей (Весвар et al., 1990; Lelu et al., 1994; Vondrakova et al., 2013). При этом для *Pinus* наиболее перспективным является введение в культуру зародышей с интактным мегagamетофитом. Инициация эмбриогенных культур таких мегagamетофитов с зародышами у *Abies alba* происхо-

дила даже в отсутствии гормонов (Vondrakova et al., 2013). В наших экспериментах инициация эмбрионных культур у *Pinus pumila* происходила при введении интактных мегагаметофитов с зародышами на глобулярной стадии развития (2–3 недели после оплодотворения) на среде инициации, дополненной ауксином и цитокинином.

Образование ЭМС и развитие в ней соматических зародышей у кедрового стланика в основном шло по схеме, описанной для других видов хвойных (von Arnold et al., 2002; Stassola, Yeung, 2002). Прежде всего, необходимым условием для запуска соматического эмбриогенеза *Pinus pumila*, как и у других видов хвойных, явилось растяжение соматических клеток до 300–400 мкм в длину. Далее вытянутые клетки подвергались асимметричному делению, которое шло под действием ауксина (2,4-Д) и цитокинина (6-БАП), как в культуре зародышей, так и в культуре мегагаметофитов (Bonga, et al., 2010; Третьякова, 2013). Точно такое же асимметричное деление лежит в основе зиготического эмбриогенеза всех видов растений (Батыгина, 1999), в том числе и другого представителя пятихвойных сосен – *Pinus sibirica* (Третьякова и др., 2014). Известно, что асимметричное деление заложено уже в первом делении зиготы, которое приводит к образованию двух неравных клеток. При этом полярность зиготы поддерживается и передается дочерним клеткам. По нашему мнению (Третьякова, 2013), асимметричное деление и полярность являются, по-видимому, основными критериями, определяющими переход клеток на путь эмбриогенеза: соматического или зиготического. В результате асимметричного деления образуются эмбриональные инициалы и эмбриональные трубки. Однако развитие глобулярных зародышей и суспензоров наблюдалось только у четырех пролиферирующих клеточных линий *Pinus pumila*, полученных из эксплантов мегагаметофитов, введенных в культуру с зародышами на глобулярной стадии развития. При этом на пролиферационной среде наблюдалось скопление глобул соматических зародышей, к которым тесно прилегали суспензоры. Такое скопление глобул соматических зародышей и суспензоров было названо полиэмбриональным комплексом (Vondrakova 2013). Соматический полиэмбриогенез (somatic polyembryogenesis) был описан в 1987 г. у *Pinus taeda* (Gupta, Dursan, 1987) и позднее получил название название “repetative” cleavage process” (Весвар et al., 1990) Вероятно, за счет этого феномена (кливажа) у кедрового стланика происходила интенсивная мультипликация соматических зародышей на глобулярной стадии развития. Эмбрионные каллусы с ЭМС активно росли и при регулярных пересадках сохраняли свойства эмбрионной культуры более четырех лет, и в них шло активное формирование соматических зародышей.

Феномен кливажной полиэмбрионии ярко выражен у сосен, в том числе у кедровых сосен. У последних эмбриональные инициалы зиготического зародыша, полученные от одной оплодотворенной яйцеклетки, распадаются на четыре идентичные эмбриональные единицы, каждая из которых дает начало четырем зародышам-близнецам. Ранее было отмечено, что у кедра сибирского встречаются деревья, у которых отмечена высокая степень полиэмбрионии (Третьякова, 1990). У таких деревьев наблюдается заложение четырех архегониев (в норме 2–3), и их оплодотворение. Из каждой оплодотворенной яйцеклетки данных деревьев в результате кливажа образуется четыре глобулярных зародыша. Таким образом, в зародышевом канале одного мегагаметофита (одной семяпочки) у кедра сибирского может развиваться 12–16 зародышей. К сожалению, эмбриология кедрового стланика до настоящего времени остается не изученной. Можно предположить, что в растительных клетках данного вида, также как у *Pinus sibirica* – типичного представителя кедровых сосен, архивировано наличие кливажа, который реализуется в культуре *in vitro* в пролиферирующей ЭМС путем активного деления и растяжения глобул соматических зародышей и эмбриональных трубок под действием гормонов. Вероятно, введение в культуру мегагаметофитов с глобулярными зародышами на стадии кливажа, является оптимальной стадией для индукции соматического эмбриогенеза и активной мультипликации глобулярных соматических зародышей кедрового стланика. Кливажный процесс или соматический полиэмбриогенез можно рассматривать как повторяющийся кливажный процесс, заложенный в зиготе (Gupta Dursan, 1987),

Пролиферирующие клеточные линии отличались по эмбрионной продуктивности. Число соматических зародышей на 1 г эмбрионного каллуса варьировало от 220 (Кл 21'.9) до 1230 (Кл 21'.4). Вызревание соматических зародышей происходило только у 0.2% (Кл 21'.4), 4% (Кл 21'.11) и 18% (Кл. 21'.12). У Кл 22'.9 вызревание соматических зародышей не обнаружено. Прорастание соматических зародышей и образование регенерантов составило 0.3 и 0.8% и было получено только у Кл 21'.11 и 21'.12.

Таким образом, в настоящей работе впервые у *Pinus pumila* был индуцирован эмбрионный каллус и показана эмбриональная продуктивность ЭМС. Для инициации соматического эмбриогенеза необходимо использовать зиготические зародыши на глобулярной стадии развития вместе с интактными мегагаметофитами. Проведение работ по введению в культуру *in vitro* мегагаметофитов кедрового стланика получение из них продуктивных клеточных линий и регенерантов будет способствовать образованию высокопродуктивных чистых линий у данного вида, из

которых будут получены сеянцы для создания орехоплодных плантаций кедрового стланика.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батыгина Т.Б.* Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 6. С. 884–898.
- Белоруссова А.С., Третьякова И.Н.* Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 2. С. 1–10.
- Носкова Н.Е., Сиренко А.С., Носкова М.А.* Получение стабильных эмбриогенных клеточных линий у кедрового стланика *Pinus pumila* (Pall.) путем соматического эмбриогенеза / Материалы международной заочной научной конференции “Проблемы современной аграрной науки” (15 октября 2011 г. Красноярск, 2012. С. 64–66.
- Рокицкий.* Биологическая статистика Минск, Высшая школа, 1973. 320 с.
- Третьякова И.Н.* Эмбриология хвойных: физиологические аспекты. Новосибирск, Наука, 1990. 157 с.
- Третьякова И.Н.* Эмбриогенные клеточные линии и соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* у лиственницы сибирской // Доклады Академии наук. 2013. Т. 450. № 1. С. 122–125.
- Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Шуваев Д.Н.* Каллусогенез и индукция соматического эмбриогенеза у гибридных зародышей семян *Pinus sibirica* // Физиол. раст. 2014. 61. № 2. С. 297–303.
- Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В.* Особенности инициации эмбриоидов *Pinus sibirica* из мегагаметофитов в культуре *in vitro* // Онтогенез. 2014. Т. 45. № 2. С. 112–120.
- Arya S., Kalia R.K., Arya I.D.* Induction of somatic embryogenesis in *Pinus roxburghii* Sarg. // Plant Cell Reports. 2000. V. 19. P. 775–780.
- Becwar M.R., Nagmani R., Wann S.R.* Initiation embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*) // Can. J. For. Res. 1990. V. 20. P. 810–817.
- Bercetche J., Paques M.* Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*) // Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. P. 269–285.
- Bonga J.M., Klimaszewska K., von Aderkas P.* Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers // Plant Cell. Tiss. Organ Cult. 2010. V. 100. P. 241–254.
- Bozhkov R.V., Ahn I.S., Park Y.A.* Two alternative pathways of somatic embryo origin from polyembryonic mature stored seeds of *Pinus koriensis* // Can. J. Bot. 1997. V. 85. P. 509–512.
- 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.
- Finer J.J., Kriebel H.B., Becwar M.R.* Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.) // Plant Cell Rep. 1989. V. 8. P. 203–206.
- Garin E., Isabel N., Plourde A.* Screening of large numbers of seed families of *Pinus strobus* L. for somatic embryogenesis from immature zygotic embryos // Plant Cell Rep. 1998. V. 18. P. 37–43.
- Gupta P.K., Dursan D.J.* Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine // BioTechnology. 1987. V. 5. P. 147–151.
- Klimaszewska K., Cyr D.R.* Conifer somatic embryogenesis: I. Development // Dendrobiology. 2002. V. 48. P. 31–39.
- Laine E., David D.* Somatic embryogenesis in immature embryos and protoplasts of *Pinus caribaea* // Plant Sci. 1990. V. 69. P. 215–224.
- Lelu M.A., Bastien C., Drugeault A., Gouez M.L., Klimaszewska K.* Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without plant growth regulators // Physiol. Plant. 1999. V. 105. P. 719–728.
- 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 M.A., Klimaszewska M.A., 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. P. 100–106.
- Lelu-Walter M.-A., Thompson D., Harvengt L., Sanchez L., Toribio M., Paques L.* Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction // Tree Genetics and Genomics. 2013. V. 9. P. 883–899.
- Litvay J.* Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.) // Litvay J., Verma D.C., Johnson M.A. // Plant Cell Rep. 1985. № 4. P. 325–328.
- Klimaszewska K., Park Y.S., Overton C., Mac Eacheron I., Bonga J.M.* Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. *in vitro* cell // Dev. Biol.-Plant. 2001. V. 37. P. 392–399.
- MacKay J.J., Becwar M.R., Park Y.-S., Corderro J.P., Pullman G.S.* Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding // Tree Genet Genom. 2006. V. 2. P. 1–9.
- Percy R.E., Klimaszewska K., Cyr D.R.* Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of western white pine // Can. J. For. Res. 2000. V. 30. P. 1867–1876.
- Niskanen A.-M., Lu J., Seitz S., Keinonen K., Von Weissenberg K., Pappinen A.* Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*) // Tree Physiology. 2004. V. 24. P. 1259–1265. 29.
- Park Y.-S., Lelu-Walter M.A.* Initiation Park Y.S., Lelu-Walter M.A. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France // Plant Cell Organ Cult. 2006. V. 86. P. 87–101.
- Pullman G.S., Bucalo K.* Pine somatic embryogenesis using zygotic embryos as explants // Plant Embryo Cultures: Methods in Molecular Biology. 2011. V. 710. P. 267–291.
- Salajova T., Jasik J., Kormutak A.* Somatic embryogenesis in *Pinus nigra* Arn. // Somatic Embryogenesis in Woody

- Plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1995. P. 207–220.
- Stasolla C., Yeung E.C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2003. V. 74.(1). P. 15–35.
- Tretyakova I., Voroshilova E., Ivanitskaya A., Shyvaev D., Park M. The embryogenic lines and somatic embryogenesis of coniferous species in Siberia // Proceedings of 2th International Conference of IUFRO “Integrating Vegetative Propagation, Biotechnologies and Genetic Improvement for Tree Production and Sustainable Forest Management”. 25–28 June 2012, Brno Cheswick republic. P. 71–79.
- Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P. et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2002. V. 69. P. 233–249.
- Vondrakova Z., Eliasova K., Fischerova L. Vagner M. The role of auxins on somatic embryogenesis of *Abies alba* // Cent. Rur. J. Biol. 2011 V. 6. № 4. P. 587–5965.

Somatic Embryogenesis in *Pinus pumila* and Productivity of Embryogenic Lines during Long-Term Cultivation In Vitro

I. N. Tret'yakova and D. N. Shuvaev

*Sukachev Institute of Forestry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
Akademgorodok 50, bld. 28, Krasnoyarsk, 660036 Russia
e-mail: culture@ksc.krasn.ru*

Received May 7, 2014; in final form, April 27, 2015

Zygotic embryos and megagametophytes of *Pinus pumila* for cultivation in vitro were transferred in 1/2 LV medium supplemented with growth regulators 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and benzylaminopurine (6-BAP) to induce somatic embryogenesis. Four stably proliferating cell lines from two genotypes were derived. The cell lines differed in the number of globular somatic embryos and the weight of embryogenic calli. Cells of these lines were multiplied as a result of somatic polyembryogenesis via cleavage. In the nutrient medium for maturation, mature somatic embryos were obtained. However, somatic embryos of not all embryogenic cell lines reached maturation. In this study, plantlets were obtained in an in vitro culture for the first time.

Keywords: *Pinus pumila*, zygotic embryos, megagametophytes, somatic embryos, proliferating embryogenic lines, in vitro