

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
Кафедра Водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ М.И. Гладышев

«_____» _____ 2017 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ *IN VITRO* *PINUS SIBIRICA*
И *LARIX SIBIRICA* ДЛЯ ПЛАНТАЦИОННОГО
ЛЕСОВЫРАЩИВАНИЯ

06.04.01 Биология
06.04.01.02 Физиология растений

Научный руководитель _____ доктор биологических наук, профессор
Третьякова И.Н.

Выпускник _____ Бектяшкина К.О.

Рецензент _____ доктор биологических наук, профессор
Муратова Е.Н.

Консультант _____ доктор биологических наук, профессор
Гаевский Н.А.

Красноярск 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ ХВОЙНЫХ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	6
1.1 Общая характеристика кедра сибирского и лиственницы сибирской	6
1.2. Зиготический эмбриогенез хвойных видов на примере родов <i>Pinus</i> и <i>Larix</i> .	9
1.3 Соматический эмбриогенез в культуре <i>in vitro</i>	11
1.3.1 Получение соматического эмбриогенеза у представителей рода <i>Pinus</i>	14
1.3.2 Получение соматического эмбриогенеза у представителей рода <i>Larix</i>	20
1.4 Роль состава и консистенции питательных сред, pH, интенсивности освещения и температуры в процессе соматического эмбриогенеза	23
1.4.1 Роль углеводов, ПЭГ и желирующих агентов	24
1.4.2 Влияние pH	25
1.4.3 Роль интенсивности освещения и температуры	25
1.4.4 Влияние абсцизовой кислоты и активированного угля	26
ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	28
2.1 Объект исследования	28
2.2 Методы исследования	28
2.2.1 Стерилизация помещений и лабораторной посуды. Обработка растительного материала	28
2.2.2 Получение каллусных культур кедра сибирского и лиственницы сибирской	29
2.2.3 Индукция каллусообразования и соматического эмбриогенеза	30
2.2.4 Пролиферация каллусной массы	31
2.2.5 Предсозревание соматических зародышей	32
2.2.6 Созревание соматических зародышей	32
2.2.7 Прорастание соматических зародышей	32
2.2.8 Цитологический анализ и статистическая обработка данных	33
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	35
3.1 Каллусогенез и индукция соматического эмбриогенеза из зиготических зародышей семян кедра сибирского	35

3.2 Каллусогенез и индукция соматического эмбриогенеза из зиготических зародышей лиственницы сибирской	37
3.3 Эксперимент по проращению зародышей лиственницы сибирской.....	38
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ	42
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	44

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Сосна сибирская (*Pinus sibirica* DuTour) и лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb) являются распространенными лесообразующими древесными видами на территории России. Отличительной чертой половой репродукции сосны сибирской является высокая полиэмбриональность семян (до 16 зародышей в одном мегagamетофите), требующих длительной стратификации семян (4-7мес.). Виды рода *Larix* обладают высокой пластичностью вегетативных и генеративных органов, что отличает их от других представителей семейства *Pinaceae* (Третьякова и др., 2006). Вместе с тем виды лиственницы, произрастающие в России, особенно в Сибири, характеризуются слабыми урожаями, что проявляется в низком качестве семян, а также повреждением генеративных органов энтомофитными, особенно часто лиственничной почковой галлицей. В насаждениях лиственницы редко (0.5%) встречаются деревья, устойчивые к лиственничной почковой галлице (Баранчиков, 1995).

Соматический эмбриогенез является одним из перспективных направлений в лесной биотехнологии микрклонального размножения в культуре *in vitro*. В его основе лежит явление тотипотентности - уникальной способности растительной клетки в условиях культуры *in vitro* реализовывать имеющуюся у нее генетическую информацию и давать начало целому организму (Бутенко, 1964). Этот эффективный метод регенерации растений является модельной системой для изучения реализации морфогенетических программ (тотипотентность, дифференцировка и компетентность), физиологических (гормональная регуляция) и молекулярно-генетических исследований (изучение состояние генома) в раннем онтогенезе, а также имеет прикладное значение в современных генетико-селекционных исследованиях, направленных на массовое тиражирование улучшенных форм хвойных.

К настоящему времени у хвойных получены соматические зародыши и растения-регенеранты у 28 видов рода *Pinus*, у 11 видов рода *Picea*, у 4 видов и

2 гибридов рода *Abies*, у 6 видов и гибридов рода *Larix* (Klimaszewska, Cyr, 2002). В качестве источника соматических клеток для индукции соматического эмбриогенеза у хвойных используются мегагаметофиты, зрелые и незрелые зародыши и их отдельные органы (семядоли и гипокотиль), хвоя молодых растений, а также сегменты вегетативных побегов зрелых деревьев (Stasolla, Yeung, 2003; Lelu-Walter, Paques, 2009).

У кедра сибирского первые результаты по индукции соматического эмбриогенеза из незрелых зиготических зародышей были опубликованы в 2009г (Третьякова, Ижболдина, 2009), однако инициация каллуса чаще происходит только у единичных эксплантов. Вместе с тем, значительные результаты по соматическому эмбриогенезу были получены у рода *Larix*, который считается моделью для изучения данного процесса.

Цели и задачи исследования. Цель исследования – индукция соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* у кедра сибирского и анализ данного процесса у лиственницы сибирской.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- индукция процесса соматического эмбриогенеза из зиготических зародышей кедра сибирского;
- изучение закономерностей образования эмбрионально-суспензорной массы из зиготических зародышей лиственницы сибирской и созревания соматических зародышей данного вида;
- изучение закономерностей прорастания соматических зародышей лиственницы сибирской, подбор питательных сред для прорастания.

ГЛАВА 1. СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ ХВОЙНЫХ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

1.1 Общая характеристика кедра сибирского и лиственницы сибирской

Кедр сибирский, сосна сибирская (*Pinus sibirica* Du Tour) относится к отделу Голосеменных (*Gymnospermatophyta*), классу Шишконосные (*Coniferopsida*), порядок Хвойные (*Coniferales*), семейство сосновые (*Pinaceae*), род сосна (*Pinus*).

Род *Pinus* – является самым многочисленным во всем отделе голосеменные. По современным данным, в нем насчитывается около 120 видов.

Область распространения представителей рода *Pinus* - практически все Северное полушарие за исключением Арктики, зоны пустынь и некоторых тропических регионов (полуостров Индостан, Центральная Африка). Сосны представлены почти во всех зональных типах растительных сообществ: от лесотундры и лесостепи до влажных тропических лесов.

Основная территория произрастания кедра сибирского - Западная и Восточная Сибирь, Урал, и далее на запад до Тиманского кряжа. В Центральном Алтае верхняя граница распространения кедра лежит на высоте 1900 - 2000м над уровнем моря, а в южных районах поднимается до высоты 2400м. Данный вид также произрастает на территории Монголии и Северного Китая.

Кедр сибирский - вечнозеленое дерево, достигает 35 - 45м в высоту и 1,8м в диаметре ствола, отличается густой, часто многовершинной кроной. Продолжительность жизни около 500 лет. Хвоя тёмно-зелёная с сизым налётом, длиной 6 - 14см, мягкая, трёхгранная, растёт пучками, по пять хвоинок в пучке. Ствол прямой, побеги не ограничены в росте. Корневая система состоит из короткого стержневого корня, от которого отходят боковые корни.

В кроне кедр сибирского можно видеть четыре типа побегов: ростовой, женский, мужской и редко обоеполый (Некрасова, 1972). Самый верхний ярус несет побеги, образующие только женские стробилы. Ниже его (второй сверху) именуется смешаннополым, т.к. кроме женских, на побегах его образуются и мужские стробилы. Еще ниже находится мужской генеративный ярус. Самый нижний ярус – ростовой, несущий только ростовые побеги с относительно небольшим и довольно быстро отмирающим приростом. Генеративные ярусы по протяженности занимаемого в кроне пространства часто варьируются в зависимости от полового типа и возраста дерева (Минина, 1975).

Кедр сибирский - однодомное, раздельнополое, анемофильное растение. Мужские шишки собраны в группы у основания побега (прироста текущего года) и состоят из отдельных плоских микроспорофиллов, сидят на общем стержне, располагаясь по спирали. На нижней стороне микроспорофилла расположены два микроспорангия, в которых находится пыльца. Пыльцевые зерна снабжены двумя воздушными мешками, которые способствуют их переносу ветром на значительные расстояния.

Женские шишки образуются на концах ростовых побегов, когда последние заканчивают свой рост, возле верхушечной почки. Состоят из центральной оси, на которой спирально расположены кроющие чешуи, несущие в пазухах семенные чешуи; у их основания на внутренней стороне обычно парами расположены семяпочки. Перед самым моментом опыления ось шишки немного удлиняется, и чешуйки слегка раздвигаются, облегчая доступ пыльцевым зернам (Чавчавадзе, Яценко-Хмелевский, 1978). Шишки крупные, вытянутые, яйцевидной формы; чешуи плотно прижатые. Шишки вызревают в течение 14-15мес. Семена 10-14мм в длину и 6-10мм в ширину, косообратно-яйцевидные, тёмно-бурые, без крыльев, массой около 260мг. Репродуктивный период у кедр начинается в среднем в 50-60 лет.

Лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb) — вид хвойных деревьев из рода Лиственница (*Larix*) семейства Сосновые (*Pinaceae*). Общеизвестными являются около 15 видов лиственницы.

Лиственницы являются самым распространённым видом деревьев. В Сибири и на Дальнем Востоке России она занимает огромные площади, где произрастает от юга Приморья до северных границ распространения деревьев. Местами образует светлохвойные лиственничные леса.

Лиственница сибирская произрастает в пределах лесной зоны, восток и северо-восток европейской части России, Урал, Западная и Восточная Сибирь. В горах поднимается до верхней границы леса, на Алтае до 2200—2400 м над уровнем моря. Растёт в хвойных лесах (вместе с сосной обыкновенной, елью сибирской и сибирским кедром, иногда с пихтой сибирской), реже образует чисто лиственничные леса.

Лиственница сибирская достигает в высоту 30-40 м, диаметр ствола 80-100 см. Крона молодых деревьев пирамидальная, позже становится овально-округлой. Кора на старых стволах серовато-бурая толстая, с продольными трещинами, глубоко-бороздчатая; на молодых — гладкая, светло-соломенного цвета.

Вершинные почки широко-конические; боковые — полушаровидные, желтовато-бурые. Хвоя мягкая, светло-зелёная, с сизоватым налётом, собрана по 30—40 штук в пучке, осенью хвоинки, как и у других видов лиственницы, опадают (Комаров, 1934).

Мужские колоски (микростробилы) одиночные, расположены на концах укороченных побегов; женские — широкояйцевидно-конические, длиной 10-15 мм, пурпурные или розовые. Опыление происходит в апреле-мае.

Шишки яйцевидные или продолговато-овальные, сначала пурпурного, затем светло-бурого или светло-жёлтого цвета, длиной 2-4 см. Семена косо-обратнойяйцевидные, мелкие, длиной 2-5 мм, шириной 3-4 мм.

1.2. Зиготический эмбриогенез хвойных видов на примере родов *Pinus* и *Larix*

У хвойных растений возможно несколько способов реализации репродуктивного потенциала: полиархеогониальность, полиэмбриония и кливаж. Оплодотворение двух и более яйцеклеток в пределах семязачатка и последующий кливаж клеток зиготического зародыша приводит к возникновению нескольких зародышей, полученных от разных опылителей в одном мегагаметофите (Третьякова, 1990; 2008).

Согласно классификации типов зародышей голосеменных растений, зиготический эмбриогенез хвойных может быть разделен на три основные фазы: проэмбриогенез, ранний эмбриогенез и поздний эмбриогенез (Singh, 1978). Проэмбриогенез включает в себя стадии до удлинения суспензора, затем следует стадия раннего эмбриогенеза, которая проходит до заложения меристемы корня. Следующая стадия, стадия позднего эмбриогенеза, характеризуется интенсивным образованием меристем корня и побега до момента формирования зрелого зародыша с развитыми семядолями (Singh, 1978; Третьякова, 1990).

Процесс *проэмбриогенеза* проходит внутри архегония. После оплодотворения ядро яйцеклетки делится дважды, образовавшиеся в результате деления четыре ядра опускаются в основание проэмбрио, где располагаются в одной плоскости. Далее каждое ядро делится вертикально, образуется два равных яруса клеток (Misra, 1994). Затем оба яруса делятся еще раз, формируя четыре уровня: два эмбриональных, суспензорный и верхний ярус (von Aderkas et al., 1991). Таким образом, образующийся 16-клеточный проэмбрио состоит из одинаковых клеток, отличающихся местом расположения относительно друг друга. Третий ярус клеток, суспензорный, удлиняется и выталкивает верхний

ярус клеток из архегония в ткань женского гаметофита, что знаменует окончание фазы проэмбриогенеза и начало стадии раннего эмбриогенеза (Misra, 1994).

Период *раннего эмбриогенеза* начинается с удлинения клеток первичного суспензора (von Aderkas et al., 1991). Рост первичных суспензоров (эмбриональных трубок) у представителей рода *Pinus* идет с неодинаковой скоростью и уже на уровне инициалей начинается кливаж зиготического зародыша на четыре самостоятельные единицы. Эмбриональные инициали подвергаются многократному делению и формируют четыре эмбриональных глобулы зародыша. Продвижение эмбриональных глобул в ткань мегагаметофита происходит за счет деления и отмирания эмбриональных трубок, сосредоточенных на базальном конце эмбриональной глобулы. При этом старая эмбриональная трубка дегенерирует, и на ее месте появляется новая. У представителей рода *Larix* типичный кливаж не наблюдается. Для лиственниц характерно проявление замедленного кливажа, проявляющегося на более поздней стадии эмбрионального развития (стадия раннего «торпедо») (Третьякова, 2008).

Явление полиэмбрионии характерно для голосеменных растений и имеет две вариации. Простая полиэмбриония происходит в результате оплодотворения нескольких яйцеклеток в женском гаметофите, например, у родов *Picea*, *Pseudotsuga* (Chowdhary, 1962). При таком типе полиэмбрионии каждый проэмбрио является результатом оплодотворения гамет из различных пыльцевых зерен, поэтому эмбрио генетически различны. Второй тип полиэмбрионии, кливажная полиэмбриония, дает начало множеству генетически идентичных эмбрио, образовавшихся посредством расщепления одного эмбрио. Явление характерно для родов *Pinus*, *Abies*, *Tsuga* (Chowdhary, 1962; Misra, 1994).

В ходе полиэмбрионии происходит конкуренция между зародышами, в результате чего выживает только наиболее развитый зародыш, остальные, как правило, дегенерируют (Gupta, Grob, 1995).

Сигналом перехода зародыша к стадии позднего эмбриогенеза служит заложение в эмбриональной массе клеток апикальных меристем корня и побега. Дальнейшее развитие зародыша связано с гистогенезом и накоплением в клетках запасных питательных веществ (Третьякова, 2008).

Процесс *позднего эмбриогенеза* характеризуется явлением гистогенеза – формированием различных меристем. Зародышу необходимо пройти период роста и развития, прежде чем клетки перестанут делиться и эмбрион созреет. В это время гипокотиль (эмбриональный стебель) и семядоли удлиняются, появляются сосудистые ткани. Зрелый зародыш имеет семядоли, апекс побега, первичную кору, центральный цилиндр, апекс корня и корневой чехлик со сформированной внутри колонкой (von Aderkas et al., 1991).

1.3 Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro*

Множественные пути реализация репродуктивного потенциала у представителей семейства сосновых ярко проявляются в экспериментальных условиях культуры *in vitro*, и, прежде всего, при асексуальном развитии зародыша через соматический эмбриогенез (СЭ), который является одним из перспективных направлений в клеточной биотехнологии (Третьякова, 2008). Соматический эмбриогенез является многоэтапным регенерационным процессом и характеризуется тем, что соматические зародыши развиваются вне зародышевого мешка из соматических клеток культивируемых тканей. Развитие соматического зародыша начинается с образования эмбрионально-суспензорной массы, затем проходит через стадии образования эмбрио, созревания и регенерации ювенильного растения (стадия прорастания) (Klimaszewska, 2009).

Впервые СЭ был получен и описан в 1958г Ф. Стюардом в суспензионной культуре моркови (Steward, 1958). Он наблюдал глобулярные, сердцевидные, торпедовидные стадии развития соматического зародыша в культуре каллусных клеток. В настоящее время соматический эмбриогенез используется как один из

методов клонального микроразмножения покрытосеменных и голосеменных растений (Klimaszewska, 2009).

Выделяют два пути соматического эмбриогенеза. Первый путь – прямой соматический эмбриогенез, он заключается в формировании эмбриоида из «проэмбриогенных детерминированных клеток» ткани экспланта без этапа каллусообразования. Второй — непрямым, или косвенным, эмбриогенез, при котором первоначально происходит образование каллуса. В нем формируются эмбриогенные клеточные комплексы, в которых с течением времени происходит развитие проэмбриональных структур, а впоследствии формируются биполярные эмбриониды. В непрямом соматическом эмбриогенезе задействованы «индуцированные эмбриогенные детерминированные клетки» (Sharp et al., 1980). Наряду с первичным соматическим эмбриогенезом происходит вторичный эмбриогенез, когда на поверхности сформировавшихся соматических зародышей образуются добавочные эмбриониды (Митрофанова, 2009).

Исследования по соматическому эмбриогенезу хвойных начались в 70-е гг. прошлого века, и впервые данный процесс был получен в 1985г у *Picea glauca* из зиготических зародышей (Nakman, Fowke, 1985) и у *Larix decidua* из мегагаметофитов (Nagmani, Bonga, 1985). Соматические зародыши являются аналогами зиготических, они способны к прорастанию и формированию растений-регенерантов (Lelu et al., 1994).

К настоящему времени у хвойных получены соматические зародыши и растения-регенеранты у 28 видов рода *Pinus*, у 11 видов рода *Picea*, у 4 видов и 2 гибридов рода *Abies*, у 6 видов и гибридов рода *Larix*. В качестве источника соматических клеток для индукции соматического эмбриогенеза у хвойных используются мегагаметофиты, зрелые и незрелые зародыши и их отдельные органы (семядоли и гипокотиль), хвоя молодых растений, а также сегменты вегетативных побегов зрелых деревьев.

Соматический эмбриогенез у хвойных видов повторяет путь развития половых зародышей: проэмбриогенез, ранний эмбриогенез и поздний эмбриогенез. Однако в процессах образования соматических и зиготических зародышей имеются определенные различия. Если у зиготического зародыша образуются морфологически одинаковые клетки 16-клеточного проэмбрио, выполняющие разные функции, т.е. детерминация клеток связана с их положением в системе проэмбрио, то при соматическом эмбриогенезе все структуры соматических зародышей возникают из одной и той же клетки, путем ее удлинения, а затем неравного деления (Третьякова, 2008).

Соматический зародыш представляет собой биполярную структуру, у которой одновременно развиваются апикальные меристемы стебля и корня. Соматические клетки культивируемых тканей экспланта (зиготические зародыши) при определенных условиях стимуляции превращаются в зиготоподобные, дающие начало структурам, которые состоят из длинных асимметричных клеток, деление которых приводит к образованию эмбриональной трубки и инициали (процесс идентичный зиготическому эмбриогенезу) Таким образом, дальнейшее эмбриональное развитие клеток у соматических и зиготических зародышей идет одинаково. У тех и других формируются две группы клеток – эмбриональные клетки и эмбриональные трубки. Из эмбриональных клеток формируются эмбриональные глобулы, а из эмбриональных трубок дополнительные эмбриональные трубки и клетки суспензора. Пролиферация эмбриогенного каллуса и активное нарастание эмбрионально-суспензорной массы при соматическом эмбриогенезе обусловлены проявлением кливажной активности зародышевых клеток (Третьякова, 2008).

Также отмечено, что при соматическом эмбриогенезе рост эмбриональных трубок происходит полярно из нижнего слоя эмбриональных клеток. Формирование суспензора может происходить на любом конце

эмбриональной трубки. При зиготическом эмбриогенезе образование клеток суспензора идет упорядоченно в области будущего зародышевого корешка.

Таким образом, соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* у представителей семейства Pinaceae, так же как и зиготический эмбриогенез – процесс многоступенчатый, проходящий стадию проэмбрионального развития, раннего и позднего эмбриогенеза, заканчивающийся формированием биполярной структуры зародыша, несущего на одном конце гипокотилия семядоли, а на другом – зародышевый корешок.

Соматический эмбриогенез является моделью для исследования процессов морфогенеза (тотипотентность, детерминация, дифференциация растительных клеток), физиологических и молекулярно-генетических процессов. (von Arnold et al., 2002; Klimaszewska et al., 2002; Park, 2002; Stasolla et al., 2002; Lelu-Walter et al., 2009).

В настоящее время данная биотехнология направлена на получение и массовое тиражирование улучшенных генотипов растений, повышение продуктивности лесов в результате насаждения полученных клоновых сеянцев, отличающихся улучшенным качеством древесины (Park, 2002; Pullman, 2010).

1.3.1 Получение соматического эмбриогенеза у представителей рода Pinus

К настоящему времени эмбриогенный каллус и соматические зародыши получены у 28 видов рода *Pinus* (Pullman et al., 2011), для более чем половины из них оптимизированы условия культивирования, обеспечивающие регенерацию из соматических зародышей целых растений. Как правило, в культуре ткани хвойных для индукции соматического эмбриогенеза в качестве первичных эксплантов используются незрелые зародыши, находящиеся на кливажной стадии развития (культура мегагаметофитов) и предсемядольной стадии развития (культура зародышей) (Lelu et al., 1994, Klimaszewska et al., 2001).

Таким образом, соматический эмбриогенез хвойных проходит через четыре стадии: индукция, пролиферация, созревание и прорастание.

Индукция соматического эмбриогенеза и пролиферация эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ)

Для индукции соматического эмбриогенеза в культуре хвойных в качестве первичного экспланта используют незрелые мегагаметофиты (кливажная стадия) зиготического зародыша. Показаны результаты образования каллуса из незрелых гаметофитов у *Pinus strobes* (Finer et al., 1989), *P. pinaster* и *P. sylvestris* (Lelu et al., 1999, Lelu-Walter et al., 2008) *P. monticola* (Persy et al., 2000)

Формирование эмбриогенного каллуса из зрелых зиготических зародышей показано у видов *Pinus caribaea* (Malabadi, 2011), *P. taeda* (Tang et al., 2001), *P. kesiya* (Malabadi et al., 2002), из вегетативных частей растения у *Pinus patula* (Malabadi et al., 2005).

Более эффективно процесс СЭ проходит при введении в культуру *in vitro* мегагаметофитов вместе с незрелыми зародышами. Проблема культивирования зрелых дифференцированных тканей заключается в том, что выделение части ткани экспланта сопровождается раневой реакцией, что вызывает продукцию летальных доз фенолов и оксидатов, а также осмотический шок. Кроме того, использование зрелых тканей в качестве экспланта препятствует реализации тотипотентности клетки и ее дифференцировке в культуре ткани (Attree et al., 1989).

После поверхностной стерилизации семян мегагаметофиты рассекают и помещают на индукционную среду для образования экстрюзий в области микропилярного конца (Pullman, Vaculo, 2010).

После нескольких недель культивирования в темноте, в зависимости от вида и генотипа, у эксплантов наблюдается образование эмбриогенной ткани. Ее характеризуют как полупрозрачную массу, состоящую из незрелых

соматических зародышей. В растущей эмбриональной массе (ЭМ) выделяют два типа клеток: маленькие клетки с плотной цитоплазмой, которые образуют головку эмбриона, и удлиненные клетки с крупными вакуолями, формирующие суспензорный аппарат. Однако механизм формирования и роста эмбриональной ткани в культуре остается неясным (Stasolla et al., 2003).

Рост эмбриональной массы в культуре происходит в основном кливажом (Timmis, 1998). Полиэмбриональный кливаж, наблюдаемый на ранних стадиях развития зиготического эмбриогенеза у хвойных, проходит в культуре *in vitro* одинаковым путем (Stasolla et al., 2003).

На индукцию эмбриогенного отклика влияет несколько факторов: основные компоненты среды, воздействие экзогенных растительных регуляторов роста, физические условия культивирования. Выбор базальной среды, используемой для индукции соматического эмбриогенеза, является видоспецифичным (Gupta, Grob, 1995; Pullman, Vaculo, 2010). Ауксины и цитокинины необходимы для индукции и пролиферации эмбриональной ткани, тогда как развитие ранних соматических зародышей происходит при снижении их концентрации или изъятии этих компонентов из среды, так как в их присутствии ткани новообразованного зародыша вновь могут подвергнуться дедифференцировке. В качестве ауксинов используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) и/или нафтилуксусную кислоту (НУК), цитокининов - N⁶-бензиламинопурин (6-БАП) и/или кинетин. В некоторых случаях применяют низкие концентрации brassinosteroidов (Pullman, Vaculo, 2010).

Основные среды, используемые для индукции соматического эмбриогенеза у *Pinus* – это различные модификации сред LV (Litvay, 1985), MS (Murashige, Skoog, 1962), DCR (Gupta, Durzan, 1985) и др.

Частота инициации соматического эмбриогенеза и морфогенетический отклик у большинства изученных видов рода *Pinus* зависит от генотипа дерева-донора.

В последние годы исследования ученых направлены на повышение частоты инициации эмбриогенной ткани. Эти работы включают в себя оптимизацию минерального состава сред и концентраций ауксинов и цитокининов (Pullman, Johnson, 2002), использование абсцизовой кислоты (АБК) (Pullman et al., 2003), брассиностероидов, полиаминов (Malabadi, Nataraja, 2007).

Для *P. radiata* и *P. taeda* (Pullman, Vaculo, 2010) было показано положительное влияние предварительной холодной обработки семян на частоту инициации. Для *P. pinaster* (Alvarez et al., 2013) показано, что длительная криоконсервация не снижает жизнеспособности эмбриогенных культур.

После достижения нескольких миллиметров в диаметре, эмбриогенную ткань пересаживают на питательную среду с пониженной концентрацией регуляторов роста, поскольку их содержание в питательной среде ингибирует рост культур (de Vries et al., 1988; Nomura and Komamine 1995; Filonova et al., 2000a). Рост ткани происходит в темноте и требует регулярных пересадок каждые 10-14 сут. при культивировании на твердой среде.

В результате длительного субкультивирования, как правило, наблюдается потеря эмбриогенного потенциала и увеличение числа эмбрионов с аномальными структурами (Stasolla et al., 2003). Поэтому на данном этапе ткань сохраняют путем криоконсервации в условиях низких температур (Kartha et al., 1988), длительного хранения в газонепроницаемых колбах при комнатной температуре (Joy et al., 1991a), хранения при низких температурах (Attree, Fowke, 1993). Следует отметить, что криоконсервация эмбриогенных тканей является ключевым компонентом в использовании ювенильных эксплантов для массового распространения при восстановлении лесов (Stasolla et al., 2002).

Созревание соматических эмбрионов

Процесс созревания соматических зародышей в культуре *in vitro* начинается с достижения стадии торпедо и заканчивается полным

морфогенезом и обезвоживанием перед прорастанием. Начало развития эмбрионов инициируется остановкой клеточной пролиферации путем удаления из питательной среды ауксинов и цитокининов, и добавлением абсцизовой кислоты (АБК). АБК играет основную роль на начальных этапах созревания эмбрионов и используется для стимуляции созревания эмбрионов у нескольких родов хвойных, включая *Picea*, *Larix* и *Pinus* (Stasolla et al., 2002). Замена регуляторов роста является основным моментом в процессе развития, необходимым для завершения процесса эмбриогенеза (Bozhkov et al., 2002).

Водный дефицит наблюдается в течение поздних стадий развития семени и определяет переход к прорастанию. Осмотические условия позволяют контролировать развитие эмбрионов у многих видов растений. Было установлено, что часто только присутствия в среде АБК недостаточно, для предотвращения преждевременного прорастания соматических эмбрионов хвойных. Необходимо изменять водный потенциал путем добавления в среду осмолитов (Pullman, Johnson, 2009).

В качестве осмолитов добавляют в среду сахарозу, мальтозу, сахарные спирты, аминокислоты, неорганические соли, но они способны оказывать токсическое действие на ткани (Attree, Fowke, 1993). Для хвойных наиболее часто используется полиэтиленгликоль (ПЭГ) в качестве осмолитического агента (Attree et al., 1991; Gupta, Pullman, 1991). В настоящее время комбинированное применение АБК и ПЭГ является наиболее часто используемым при созревании соматических зародышей нескольких родов хвойных, включая *Larix* (Klimaszewska et al., 1997), *Picea* (Attree et al., 1991; Kong and Yeung, 1995; Find, 1997) и *Pinus* (Li et al., 1997).

Также, для снижения оводненности клеток применяют метод добавления в среду для созревания сильного желирующего агента (Klimaszewska, Smith, 1997; Klimaszewska et al., 2000). Этот же эффект аналогичен для ПЭГ.

Зародыши в своем развитии проходят полный морфогенез, образуется ось зародыша – гипокотиль, на противоположных концах которого образуются семядоли и зародышевый корешок.

В гистохимических исследованиях описано накопление запасных продуктов при соматическом эмбриогенезе. У белой ели, на которой сделано большинство работ, в первую очередь накапливается крахмал, далее липиды и белки (Joy et al., 1991). На ранней стадии нитчатого эмбриона накопление крахмала сначала наблюдается в проксимальной области суспензора. При развитии эмбриона, накопление крахмала продолжается, в основном в корневой части и кортикальных клетках (Joy et al., 1991; Kong et al., 1999). Накопление белковых тел и липидных частиц начинается на поздних филламентных стадиях развития и следует по градиенту от базального конца к апикальному концу эмбриона.

Прорастание соматических эмбрионов

Соматические эмбрионы обычно прорастают на среде, лишенной растительных ростовых гормонов и с пониженным содержанием солей, сахара и витаминов. Аскорбиновая кислота часто способствует удалению остаточного содержания регуляторов роста. Конечная цель многих зарубежных работ по соматическому эмбриогенезу – оптимизация процесса прорастания соматических эмбрионов и увеличение числа конечного выхода растений (Pullman, 2007). Были разработаны следующие методики, повышающие процент прорастания соматических зародышей у *Pinus*. Увеличить процент прорастания соматических эмбрионов рода *Pinus* возможно, используя следующие методики: полное или частичное обезвоживание эмбрионов до прорастания (Hay, Charest, 1999), стратификация (Gupta et al., 2005), применение красного света (Merkle et al., 2006), обработка эктомикоризой гриба *Psolitus tinctorius* (Niemi, Haggman, 2002).

После достижения соответствующих размеров в культуре *in vitro*, проростки пересаживают в почву в теплицу для периода акклиматизации, после которого пересаживают в питомники или лесные участки. Обычно, у клоновых деревьев наблюдается единообразие формы и роста (Timmis, 1998).

1.3.2 Получение соматического эмбриогенеза у представителей рода

Larix

Благодаря активному исследованию соматического эмбриогенеза в последние годы, род *Larix* стал моделью для его изучения среди видов хвойных. Достаточно хорошо изучены необходимые условия для развития растений, полученных таким способом, что даёт возможность получать высококачественные соматические эмбрионы, идентичные зиготическим в их анатомии и физиологии. Соматический эмбриогенез является альтернативным инструментом для ускоренной продукции клонов растений и их последующего массового производства (Lelu-Walter, 2016).

Сохранение ценных эмбриогенных линий часто осуществляется путём длительной пролиферации клеточных культур, однако данный способ включает в себя риск загрязнения, соматических изменений и потерь эмбриогенной способности. Криоконсервация эмбриогенных культур даёт перспективы для долгосрочного сохранения и управления ценными генотипами (Engelmann, 2000; Lambardi, 2003). Более того, важность криоконсервации как связующего звена между выведением и последующим массовым размножением клонов была подчеркнута для хвойных деревьев (Klimaszewska, Cyr, 2002). Фактически криоконсервация может быть применена как к соматическим эмбрионам, так и зиготическим (Vieitez et al., 2011).

Род *Larix* является привлекательным для программ лесовосстановления из-за его быстрого роста, широкой экологической пластичности рода и хорошего качества древесины (Gower and Richards 1990). Лиственница (*Larix sp.*) является одним из основных компонентов хвойного леса в Северном полушарии, где представлена 10 видами.

В Европе предметом интереса является лиственница европейская (EL, *L. decidua*), растущая преимущественно в горных районах (главным образом в Альпах, Татрах, Судетских горах), а также лиственница японская (JP, *L.*

kaempferi), высокогорный вид из Японии. Другие виды также представляют интерес в Северной Скандинавии, где лиственницы Сукачёва и сибирская растут значительно лучше. Третий лиственничный таксон, который представляет интерес для Европы и Северной Америки, межвидовой гибрид европейской и японской лиственниц (*L. x eurolepis*). Вегетативное размножение таких гибридов поддерживает высокий уровень гибридной чистоты, обеспечивает стабилизацию сортов и единообразие культур (Lelu-Walter , 2016). Соматический эмбриогенез был выбран как метод для клонального размножения лесных деревьев из-за высокой скорости размножения эмбрионных культур и возможности длительного криогенного хранения материала (Lelu-Walter et al., 2013).

Последние достижения в соматическом эмбриогенезе хвойных пород были недавно рассмотрены Klimaszewska, Hargreaves и Lelu-Walter (Klimaszewska et al., 2015). В *Larix* соматический эмбриогенез был индуцирован у нескольких видов (Bonga et al., 1995). Об этом впервые было сообщено Klimaszewska (1989a) для гибридных лиственниц *Larix x eurolepis* Henry (*L. decidua x L. kaempferi*) и *Larix x marschlinsii* Coaz (*L. kaempferi x L. decidua*). С тех пор СЭ был получен для европейской лиственницы (*L. decidua* Mill.) (von Aderkas et al., 1990, Szczygieł 2005), японской лиственницы (*L. kaempferi* Gond.) (Von Aderkas et al., 1990), западной лиственницы (*L. occidentalis* Nutt.) (Thompson and von Aderkas 1992), восточной лиственницы (*L. laricina*, (Du Roi) K. Koch tamarack) (Klimaszewska et al., 1997), сибирской лиственницы (*L. sibirica*) (Третьякова и др., 2012). Значительные улучшения процесса соматического эмбриогенеза были получены для японской лиственницы (Kim and Moon 2007) и гибридных лиственниц (Lelu-Walter and Paques 2009).

Аспекты получения соматического эмбриогенеза у лиственниц

Образование эмбриональной массы зависит от стадии развития зиготического эмбриона. Исследования, проведенные за последние два

десятилетия, доказали, что соматический эмбриогенез наиболее эффективно инициируется из незрелых зиготических зародышей (Lelu-Walter , 2016).

После индукции соматического эмбриогенеза полученную эмбриональную массу переносят на питательную среду для поддержания пролиферации и культивируют в течение 2 недель, а затем переносят на свежую среду.

Для лиственницы, как и для других хвойных растений, развитие соматических зародышей происходило интенсивнее в присутствии абсцизовой кислоты (АБК), её концентрация варьировала в зависимости от вида в пределах 40-60 мкМ. Это приводит к синхронному развитию семядолей соматических эмбрионов без преждевременного прорастания. АБК влияет на дифференцировку тканей в лиственнице (Gutmann et al., 1996) и способствует накоплению липидов и белков у зародышей (Gutmann et al., 1996, von Aderkas et al., 2002).

Осмолярность питательной среды является еще одним важным фактором. Чаще всего, средний водный потенциал одновременно снижается за счет увеличения концентрации сахаров и создания осмотического стресса, или путем включения ПЭГ. Для *L. laricina* и *L. sibirica* полиэтиленгликоль добавлялся в среду для созревания зародышей (Klimaszewska et al., 1997; Tretiakova et al., 2012). Альтернативный метод воздействия на развитие соматических зародышей заключается в увеличении концентрации желирующего агента в среде с АБК, что увеличивает плотность среды и снижает доступность воды для клеток. Так, развитие соматических зародышей гибридных лиственниц *Larix x eurolepis* и *Larix x marschlinsii* происходило активнее при уменьшении количества доступной воды за счёт высокой концентрации желирующего агента (Lelu-Walter and Pâques 2009).

Продолжительность созревания влияет на последующий этап развития – на прорастание эмбриона. У гибридных видов лиственницы увеличение

периода созревания в присутствии АБК приводило к значительному снижению частоты прорастания растений, что связано с увеличением содержания АБК в растениях (Lelu and Label 1994; Label and Lelu 2000). В настоящее время к соматическим эмбрионам, созревшим в присутствии АБК, применяется обработка высушиванием, что приводит к снижению эндогенной АБК. Также обнаружено, что содержание белка является надежным показателем физиологической зрелости соматических эмбрионов листовенницы. Таким образом, для соматических зародышей применяется высушивание для улучшения частоты прорастания и образования проростков (Lelu-Walter, 2016).

1.4 Роль состава и консистенции питательных сред, рН, интенсивности освещения и температуры в процессе соматического эмбриогенеза

Основными индукторами дифференциации соматических эмбриоидов и дальнейшей регенерации растений из них являются специфически необходимые регуляторы роста растений, осмотически активные вещества, консистенция и рН среды, интенсивность освещения, фотопериод, температура и влажность.

Базовой питательной средой для многих культурных и диких видов растений является среда Мурасиге и Скуга (МС). Среда МС чаще всего используется в половинной концентрации макро- и микросолей, что значительно стимулирует образование эмбриогенного каллуса и дальнейшую пролиферацию клеток. Для каждого этапа соматического эмбриогенеза (индукции каллусообразования и поддержания роста каллуса и суспензии, созревания соматических зародышей, роста и развития растений) применяются соответствующие питательные среды (Dunstan et al., 1995).

Для культур необходимо содержание в питательной среде экзогенных регуляторов роста. Ауксины (2,4-Д) и цитокинины (БАП) необходимы для индукции и пролиферации эмбриональной ткани, тогда как развитие ранних соматических зародышей происходит при изъятии этих компонентов из среды,

так как в их присутствии ткани новообразованного зародыша вновь могут подвергнуться дедифференцировке. Дальнейший рост и развитие ранних соматических эмбрионов до стадии созревания требует присутствия абсцизовой кислоты (АБК). АБК обеспечивает нормальное развитие соматических зародышей *in vitro*, стимулируя накопление запасных веществ и ингибируя раннее прорастание (Зайнутдинова и др., 2005; von Arnold et al., 2002).

1.4.1 Роль углеводов, ПЭГ и желирующих агентов

В зависимости от видовой принадлежности растений их потребности в тех или иных соединениях питательной среды могут существенно различаться, однако элементы углеводного питания остаются доминирующими. Наиболее распространенными углеводами, используемыми в процессе соматического эмбриогенеза, являются сахароза и глюкоза, реже — мальтоза, галактоза, лактоза, сорбит и маннит (Митрофанова, 2009).

Считается, что на частоту инициации соматического эмбриогенеза влияет тип углевода в составе питательной среды. Сахароза является основным углеводом в составе питательных сред для пролиферации эмбриональной массы и может играть дополнительную регуляторную роль в процессе созревания. В исследовании с соматическими эмбрионами *P. glauca* и *P. mariana* было обнаружено, что сахароза в концентрации 6% (в отсутствии ПЭГ) стимулировала созревание соматических зародышей и накопление растворимых и нерастворимых белков (Klimaszewska et al., 2015).

У *P. abies* питательная среда с ПЭГ и мальтозой (3%) способствовала развитию большого количества соматических эмбрионов, но с низкой частотой прорастания, несмотря на частичное обезвоживание после созревания.

Напротив, соматические эмбрионы, развивавшиеся на среде с 3% сахарозы (без дополнительного осмотического агента), прорастали. Основываясь на этих данных, был сделан вывод, что соматические эмбрионы, выращенные на среде, содержащей сахарозу, приобретают устойчивость к высыханию, а содержание мальтозы, вероятно, её снижает (Klimaszewska et al., 2015).

Манипулировать доступностью воды клеткам эмбриональной массы также можно физическими способами, не влияя на водный потенциал среды, за счет увеличения количества желирующего агента. Он увеличивает плотность среды и, следовательно, уменьшает количество доступной воды клеткам. Путем применения этого метода контроля воды к культурам ранних эмбрионов, у *P. strobus* были получены зрелые соматические зародыши, накапливающие большое количество запасных белков. Такое воздействие водного стресса на развивающиеся соматические зародыши аналогично состоянию зиготического зародыша, созревание которого сопровождается потерей воды (Klimaszewska et al., 2015; Trontin et al., 2016).

1.4.2 Влияние pH

Одним из важных условий успешной реализации процесса соматического эмбриогенеза является правильно подобранный pH питательной среды. В зависимости от потребностей растений концентрация ионов водорода может быть различной в пределах 4,0-7,5. Низкое значение pH (4,0-4,5) способствует сохранению проэмбрио на преглобулярной стадии, а повышение pH до 5,8 дает возможность развития и формирования растений и повышает эффективность соматического эмбриогенеза (Митрофанова, 2009).

1.4.3 Роль интенсивности освещения и температуры

Спектральный состав света, интенсивность освещения и температура оказывают значительное влияние на жизнедеятельность растений, в том числе на процессы их роста и развития. Известно, что существует тесная взаимосвязь между качеством света и накоплением в растении отдельных гормонов и ингибиторов роста (Константинова и др., 1987). Доказано, что оптимальная температура, при которой культивируются соматические зародыши большинства видов растений, находится в пределах 21—25 °C (Dunstan et al., 1995).

В хвойных растениях влияние абиотических факторов, таких как свет, при созревании соматических эмбрионов, обычно не изучается. Относительно

недавно было исследовано влияние условий освещения при созревании соматических эмбрионов гибридной лиственницы (Kim, Moon 2007; Lelu-Walter, Râques, 2009). Морфогенез соматических зародышей, вызревающих на свету и в темноте, не различался. Зародыши имели полный набор органов: семядоли, гипокотиль и зародышевый корешок. Однако свет отрицательно влиял на накопление белка, в то время как накопление полифенолов усиливалось (von Aderkas et al., 2015).

1.4.4 Влияние абсцизовой кислоты и активированного угля

Как упоминалось выше, для созревания и регенерации соматических зародышей исследователи часто используют абсцизовую кислоту (АБК). АБК обеспечивает нормальное развитие соматических зародышей *in vitro*, стимулируя накопление запасных веществ и ингибируя раннее прорастание (Митрофанова, 2009).

Активированный уголь (АУ) является компонентом многих культуральных сред. Считается, что положительное действие АУ обусловлено адсорбцией остаточных гормонов, токсичных метаболитов, в том числе и некоторых фенольных соединений, выделяющихся в процессе культивирования органов и тканей растений. При использовании АУ следует соблюдать осторожность, поскольку он может также адсорбировать необходимые гормоны, витамины или ионы металлов, такие как Cu^{+2} и Zn^{+2} (Pullman et al., 2005).

Сочетание абсцизовой кислоты (АБК) и активированного угля стимулировало развитие семядолей соматических эмбрионов Ели обыкновенной (*Picea abies* L., Karst.), увеличило число генотипов, формирующих семядольные эмбрионы. Соматические эмбрионы увеличились в размере, имели крупные апикальные области, стали морфологически более похожи на зиготические и показали более интенсивное развитие эпикотилия после прорастания. Зародыши имели бело-желтую окраску, удлинялись,

напротив, эмбрионы, культивированные с АБК без активированного угля, были желтоватого цвета, короткими и плоскими в апикальной области корня (Pullman et al., 2005).

Также, АУ использовали при созревании зародышей *P. pinaster*, покрывая им клетки и культивируя на фильтровальной бумаге, помещенной на среду для созревания. Этот метод культивирования привел к большему количеству зрелых соматических зародышей, полученных за более короткий срок, по сравнению с культивированием без использования АУ (Lelu-Walter et al., 2006).

Исследование, которое однозначно подтвердило, что АБК имеет решающее значение для развития и созревания нормальных соматических зародышей у хвойных, было проведено с *Larix x leptoeuropaea* (von Aderkas et al., 2002).

Этот гибрид лиственницы уникален, потому что он может вырабатывать соматические зародыши и проростки на среде с АБК или без нее, что обеспечивает идеальный материал для исследования. Соматические эмбрионы, которые развивались на обеих средах, отличались по структуре, типам клеток, внутриклеточным вторичным метаболитам и эндогенным концентрациям АБК. Тем не менее, у всех видов хвойных, изученных до настоящего времени, определенное количество генотипов у данного вида не дает зрелых соматических эмбрионов даже при наличии оптимизированных концентраций АБК (Klimaszewska et al., 2015).

ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования служили 33 дерева сосны сибирской (кедра сибирского, *Pinus sibirica* DuRoi), произрастающие на клоновых плантациях Западно-Саянского опытного лесного хозяйства (Ермаковский стационар Института леса им. Сукачева СО РАН, с. Ермаковское Красноярского края), в естественном древостое около п. Танзыбей Ермаковского района Красноярского края (памятник природы краевого значения «Сосновый носок», «Китаева гора») и д. Никулино Енисейского района Красноярского края. Взятие образцов проводилось в период 2-4 июля 2016 г.

Объектом исследования служило дерево лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb) №А4. Сбор материала производили в сухую погоду в дендрарии Института леса им. В.Н. Сукачева, в г. Красноярске. Шишки собирали с дерева-донора № А4 в заранее подготовленные бумажные пакеты. Хранение собранных шишек производили в холодильнике, чтобы предотвратить перезревание зародышей.

Объектом исследования служили 3 эмбриогенные клеточные линии (КЛ 4, КЛ 12, КЛ 201), полученные от лиственницы сибирской, произрастающей в дендрарии Института леса им. Сукачева СО РАН и устойчивой к лиственничной почковой галлице *Dasyneura laricis* F. Lw.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Стерилизация помещений и лабораторной посуды. Обработка растительного материала

Эксперименты по культуре *in vitro* проводили в стерильных условиях ламинар-боксов. Непосредственно перед работой проводили облучение помещения ультрафиолетом в течение 25 мин. Все поверхности ламинара обрабатывали 96% раствором спирта.

Лабораторную посуду, дистиллированную воду, инструменты и питательные среды стерилизовали в автоклаве под давлением 1атм, в течение 20мин.

2.2.2 Получение каллусных культур кедр сибирского и лиственницы сибирской

Для получения каллусных культур и индукции соматического эмбриогенеза в качестве эксплантов использовали извлеченные зиготические зародыши кедр сибирского. Для взятия образцов было выбрано 33 дерева кедр сибирского, экспланты были взяты в количестве 30-35 штук с каждого варианта.

Семена опытных деревьев очищали, упаковывали в марлевые мешочки по 20-25 шт и стерилизовали гипохлоритом натрия или раствором йода с 90% спиртом (1:3) в течение 10-12 мин с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде. Зародыши извлекали из мегагаметофитов в стерильных условиях ламинар-бокса и помещали на питательную среду по 5-6 эксплантов на колбу.

Для получения каллусных культур и индукции соматического эмбриогенеза в качестве эксплантов использовали мегагаметофиты и извлеченные зиготические зародыши лиственницы сибирской. Собранные семена очищали от покровных чешуй, поверхностно стерилизовали раствором 0,5% раствором марганца, а затем в условиях бокса стерилизовали повторно 96% раствором спирта в течение 5 минут, обрабатывали 10% раствором перекиси водорода в течение 5-10 минут, трехкратно промывали в стерильной дистиллированной воде.

Из семян были извлечены мегагаметофиты и зародыши, перенесены на фильтровальную бумагу в чашках Петри, а затем на питательную среду. На колбу приходилось 5-7 зародышей (Третьякова и соавторы, 2012). Всего было высажено 89 эксплантов самоопыления и 48 эксплантов свободного опыления.

2.2.3 Индукция каллусообразования и соматического эмбриогенеза

Для получения эмбриогенного каллуса из зиготических зародышей кедр сибирского использовались базовая среда DCR (Gupta, Durzan, 1985) и 1/2LV (среда LV с уменьшенным вдвое содержанием макроэлементов, Litvay et al., 1985). Питательные среды дополнены сахарозой (30 г/л), казеином (0,5г/л), мезоинозитом (1г/л), агаром (7 г/л) или Gelrite (4 г/л), глютамином (1г/л), и аскорбиновой кислотой (0,3г/л). В качестве регуляторов роста использовали 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксусную кислоту) и 6-БАП (6-бензиламиноперемедин) в концентрациях (2 мг/л) и (1мг/л) соответственно. Водородный показатель среды доводили до 5,8 перед автоклавированием. Глютамин и аскорбиновую кислоту добавляли после автоклавирования через бактерицидный фильтр, когда среда остывала до ~50°C. После этого среду разливали в стеклянные колбы по 20мл.

Таблица 1 – Состав базовых сред LV, DCR, MS, АИ

Компоненты среды	Концентрации элементов в среде, мг/л			
	LV	DCR	MS	АИ
<i>макроэлементы:</i>				
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	556	-	-
NH ₄ NO ₃	1650	-	1650	-
KNO ₃	1900	340	1900	1060
CaCl ₂ ·7H ₂ O	22	85	440	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1850	370	370	570
KH ₂ PO ₄	340	170	170	150
KCl	-	-	740	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	450
<i>микроэлементы:</i>				
KI	4,15	0,83	0,83	1,2
H ₃ BO ₃	31	0,62	6,2	8,69
MnSO ₄ ·4H ₂ O	27,7	22,3	22,3	-

ZnSO ₄ *7H ₂ O	43	8,6	8,6	13,05
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	1,25	0,25	0,25	0,375
CuSO ₄ *6H ₂ O	0,5	0,025	0,025	0,160
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,125	0,025	0,025	0,0515
<i>железо:</i>				
FeSO ₄ *7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8
Na ₂ *ЭДТА	37,3	37,3	7,45	37,3
<i>витамины:</i>				
Тиамин	0,1	0,1	0,1	1
Пиридоксин	0,1	0,5	0,5	0,5
Никотиновая кислота	0,5	0,5	0,5	0,5

Помещенные на среду экспланты культивировали в темноте при 25°С±1°С в течение 30 суток. Затем образовавшийся каллус переносили на среду для пролиферации.

Для инициации эмбрионного каллуса у лиственницы сибирской использовали минеральные основы базовых сред АИ (патент №2456344) с добавлением мезоинозита - 0,1 г/л, аскорбиновой кислоты - 0,4 г/л, гидролизата казеина - 1 г/л, L-глутамин - 0,5 г/л, сахарозы - 30 г/л, агара - 7 г/л. В качестве регуляторов роста применяли ауксин (2,4Д) - 2 мг/л, цитокинин (6-БАП) - 1 мг/мл. Водородный показатель среды приводили к 5,8. Автоклавировали при 121°С, 110 кРа в течении 20 минут (Третьякова и соавторы, 2015). В каждой чашке Петри культивировали по 10 зародышей на 20 мл индукционной среды в темноте при 24 ± 1°С.

2.2.4 Проллиферация каллусной массы

Для пролиферации полученной каллусной массы кедра сибирского использовали питательные среды DCR и 1/2LV с пониженным содержанием сахарозы (20г/л) и 6-БАП (0,5г/л). Культуры содержались в темноте при 25°С±1°С. Пересадку на свежую питательную среду проводили каждые 14 суток.

Для пролиферации полученной ЭСМ лиственницы сибирской применяли базовую питательную среду АИ, содержащую 2.4-Д (2 мг/л), БАП (0.5 мг/л) и сахарозу (30 г/л). Культуры инкубировали в темноте при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Пересадку на свежую питательную среду проводили каждые 14 дней.

2.2.5 Предозревание соматических зародышей

Через семь дней после субкультивирования ЭСМ лиственницы сибирской на пролиферационной питательной среде кусочки активно растущей ЭСМ весом 100-300 мг переносили на безгормональную базовую среду АИ с активированным углем (10 г/л) и повышенным содержанием сахарозы (34 г/л) на 5–7 суток для остановки пролиферации и перехода соматических зародышей к созреванию.

2.2.6 Созревание соматических зародышей

Созревание соматических зародышей лиственницы сибирской выполняли на базовой среде АИ, содержащей сахарозу (40 г/л), абсцизовую кислоту (АБК) (40 мкмоль), индолил-масляную кислоту (ИМК) (1 мкмоль) и полиэтиленгликоль (ПЭГ) (10%). В качестве желирующего агента использовали Gelrite (4 г/л). Культивирование осуществляли в темноте, при $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Растительные регуляторы роста (АБК и ИМК) и L-глутамин стерилизовали фильтрованием и добавляли в охлажденную питательную среду после автоклавирования.

2.2.7 Проращивание соматических зародышей

Для опытов по проращиванию соматических зародышей были отобраны три (КЛ 4, КЛ 12, КЛ 201) разновозрастные эмбриогенные клеточные линии из коллекционного банка ИЛ СО РАН (Третьякова и др. 2016, Пак и др., 2016), полученные в результате свободного и контролируемого опыления (*Larix sibirica* x *Larix sibirica*).

Для проращивания соматических зародышей использовали базовые питательные среды 1/2 MS и 1/2 АИ, свободные от растительных регуляторов

роста и дополненные активированным углем (0,2 и 2 г/л) (контроль – без угля) и сахарозой (10 и 20 г/л).

Созревшие соматические зародыши переносили на среды по 15 шт на чашку Петри в 3-х повторностях.

В качестве контроля использовали извлеченные зиготические зародыши лиственницы сибирской. Для проращивания использовали базовую питательную среду 1/2 АИ, свободную от растительных регуляторов роста и дополненную активированным углем (0,2 г/л) и сахарозой (10 г/л).

Также в качестве контроля проращивали семена лиственницы сибирской в чашке Петри на увлажненной фильтровальной бумаге в количестве 45 штук.

Все измерения проводили линейкой каждые 4 дня в течение 21 суток. Соматические и зиготические зародыши считали проросшими при появлении корешка. Культивирование осуществляли в условиях климатической камеры с программируемым циклом.

2.2.8 Цитологический анализ и статистическая обработка данных

Для проведения цитологического анализа готовили давленные препараты по стандартной методике (Паушева, 1990). Экспланты помещали на предметное стекло и 1–2 минуты выдерживали в красителе (сафранин с добавлением метиленового синего). Далее добавляли глицерин и накрывали препарат покровным стеклом.

Продуктивность эмбриогенных клеточных линий оценивали, подсчитывая число созревших соматических зародышей на 1 г начальной эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) через 40-45 суток.

Просмотр микроскопических образцов осуществляли на микроскопе «МИКМЕД-6» (ЛОМО, Россия).

Статистическая обработка данных проводилась по стандартным методикам (Лакин, 1973) при помощи программы Microsoft Excel 2003. Для оценки достоверности различий использовали однофакторный дисперсионный анализ и t-критерий Стьюдента (при $P \leq 0,05$) (Рокицкий, 1973).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Соматический эмбриогенез является моделью для исследования процессов дифференцировки и дедифференцировки растительных клеток, физиологических и молекулярно-генетических процессов (von Arnold et al., 2002). В настоящее время данная биотехнология направлена на получение и распространение генетически ценных деревьев, и повышение продуктивности лесов в результате насаждения полученных клоновых элитных сеянцев, отличающихся улучшенным качеством древесины (Park, 2002; Pullman, 2010).

Ключевыми моментами для успешной реализации соматического эмбриогенеза являются отбор деревьев, экспланты которых стабильно обладают эмбриогенным потенциалом в культуре *in vitro*, подбор оптимальной стадии развития экспланта для ввода в культуру, а также подбор физико-химических условий культивирования, в том числе определение оптимальных концентраций и соотношений фитогормонов в питательной среде. Данные факторы являются индивидуальными для каждого вида.

В проведенном исследовании был индуцирован соматический эмбриогенез из зиготических зародышей кедра сибирского и лиственницы сибирской. Получены эмбриогенные клеточные линии, продуктивность, способность к созреванию и прорастанию которых в дальнейшем будет исследована. Исследованы закономерности прорастания соматических зародышей трех эмбриогенных клеточных линий и зиготических зародышей на питательных средах различной обработки.

По результатам исследований сделаны следующие выводы:

1. Индукция соматического эмбриогенеза из зиготических зародышей кедра сибирского зависит от генотипа дерева-донора. Зиготические зародыши кедра сибирского способны формировать эмбриогенный каллус, однако при продолжительной пролиферации (4-5 мес.) каллус теряет эмбриогенную способность.

2. У дерева №33 неэмбриогенный каллус продолжает расти на протяжении 11 месяцев.
3. Процент формирования эмбрионально-суспензорной массы у лиственницы сибирской от эксплантов, полученных в результате контролируемого самоопыления не отличается от полученных в результате свободного опыления и соответствует полученным данным в 2012 г. (Третьякова и др.) (7,9% и 1-18% образования ЭСМ, соответственно).
4. Динамика прорастания соматических и зиготических зародышей лиственницы сибирской на питательной среде значительно не отличается. Наиболее интенсивный рост проростков клеточных линий отмечен на питательной среде, содержащей активированный уголь, что может быть связано со способностью активированного угля адсорбировать соединения, ингибирующие рост и морфогенез.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабилова А. В., Горпенченко Т. Ю., Журавлев Ю. И. Растение как объект биотехнологии // Комаровские чтения. – Вып. LV. – 2007. – С. 184-211.
2. Баранчиков Ю.Н. Этапы морфогенеза вегетативных почек лиственницы сибирской и его модификации насекомыми галлообразователями // Ботанические исследования в Сибири. 1995. № 4. С. 12–18.
3. Барсукова А. В. Регуляция соматического эмбриогенеза у видов лиственницы в культуре *in vitro* / автореферат дис. 03.01.05 – Красноярск, 2011 – с. 1-15.
4. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений: Учебник. — СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2002. — 232 с.
5. Белоруссова, А.С. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты/ А.С. Белоруссова, И.Н. Третьякова // Онтогенез. - 2008. Т. 39. - №2. - С.1-10.
6. Зайнутдинова Э.М., Круглова Н.Н., Шаяхметов И.Ф. Роль АБК в соматическом эмбриогенезе растений в культуре *in vitro* // Физиология и биохимия культ. растений. — 2005. — 37, № 3. — С. 208—219.
7. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. — Киев: Наук. думка, 1992. — 232 с.
8. Комаров В. Л. *Larix sibirica* — Лиственница сибирская // Флора СССР : в 30 т. / гл. ред. В. Л. Комаров. — М.—Л. : Изд-во АН СССР, 1934. — Т. I / ред. тома М. М. Ильин. — С. 155—156. — 302 + XVI с. — 5000 экз.
9. Константинова Т.Н., Аксенова Н.П., Сергеева Л.И., Чайлахян М.Х. Взаимное влияние света и гормонов на регуляцию морфогенетических процессов в культуре *in vitro* // Физиология растений. — 1987. — 34, № 4. — С. 795—802.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1973. 343 с.
11. Минина Е.Г. Пол у сосны обыкновенной // Вопросы физиологии половой репродукции хвойных / Красноярск: ИЛИД, 1975. С. 68–89.
12. Минина Е.Г., Третьякова И.Н. Геотропизм и рост хвойных / Под. ред. Реймерса Ф.Э. Новосибирск: Наука, 1983. 200 с.
13. Митрофанова, И. В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений / И.В. Митрофанова // Физиология и биохимия культ. растений. – Киев, 2009. – Т. 41, №6 – С. 496-508
14. Муромцев Г. С., Бутенко Р. Г., Тихоненко Т. П., Прокофьев М. Н. «Основы сельскохозяйственной биотехнологии» М. Агропромиздат, 1990 г.
15. Некрасова Т.П. Рост и плодоношение сосны обыкновенной // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1972. Вып. 3. С. 45–52.

16. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980. 340 с.
17. Рокицкий П. Ф. Биологическая" статистика. — Минск : Вышэйш. школа, 1973. — 319 с.
18. Третьякова И.Н., Барсукова А.В. Соматический эмбриогенез лиственниц и кедра сибирского в Сибири // Лесоведение, 2012, № 6, с. 63–70.
19. Третьякова И.Н. Способ микроклонального размножения лиственницы сибирской в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез на среде АИ для плантационного лесовыращивания: Патент № 245344 // Федеральная служба по интеллектуальной собственности. 2012. Бюл. №20. 7 с.
20. Третьякова И.Н. Сходства и различия зиготического и соматического эмбриогенеза сибирских видов хвойных // Материалы XII съезда Русского ботанического общества «Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века», Петрозаводск, 22-27 сентября 2008. Ч. 1. С. 298-300.
21. Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных: физиологические аспекты. Новосибирск, Наука, 1990. 157 с.
22. Третьякова И.Н., Баранчиков Ю.Н., Буглова Л.В., Белоруссова 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.
23. Тюкавин Г. Б. Основы биотехнологии моркови: Монография / ВНИИССОК. – М., 2007. – 480 с.
24. Чавчавадзе Е.С., Яценко-Хмелевский А.А. Порядок сосновые (Pinales) // Жизнь растений в шести томах. Т.4 / Под ред. Грушвицкого И.В. М.: Просвещение, 1978. С. 350-354.
25. Alvarez J.M., Bueno N., Cortizo M., Ordas R.J. Improving plantlet yield in *Pinus pinaster* somatic embryogenesis. *Scandinavian Journal of Forest Research* 28: 613–620; 2013.
26. Ammirato P.V. Patterns of development in culture // *Tissue culture in forestry and agriculture* / Eds. R.R. Henke, K.W. Hughes, M.J. Constantin, A. Hollaender. — New York: Plenum Press, 1985. — P. 9—29.
27. Attree S.M., Dunstan D.I., Fowke L. Initiation of embryogenic callus and suspension cultures, and improved embryo regeneration from protoplasts of white spruce (*Picea glauca*) // *Can J Bot.* 1989. V. 67. P. 1790–1795.
28. Attree, S. M.; Fowke, L. C. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 35:1–35; 1993.
29. Attree, S. M.; Moore, D.; Sawhney, V. K.; Fowke, L. C. Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) somatic

- embryos: effects of a non-plasmolyzing water stress and abscisic acid. *Ann. Bot.* 68:519–525; 1991.
30. Bonga JM, Klimaszevska K, Lelu M-A, von Aderkas P. Somatic embryogenesis in *Larix*. In: Jain S, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in Woody plants*. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherland, 1995, vol.3, pp. 315-339.
 31. 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.
 32. Chowdhary, C.R. The embryogeny of conifers: a review. // *Phytomorphology*, 12. 1962. P. 313-338.
 33. Corredoira E., Ballester A., Vieitez A.M. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants // *Ann. Bot.* — 2003. — 92. — P. 129—136.
 34. Corredoira E., San-Jose M.C., Ballester A., Vieitez A.M. Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut // *Cryo Lett.* — 2004. — 25, N 1. — P. 33—42.
 35. de Vries SC, Booij H, Meyerink P, Huisman G, Wilde DH, Thomas TL & van Kammen A. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension culture. *Planta* 176: 196–204, 1988a.
 36. Dodeman V.L., Ducreux G., Kreis M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis // *J. Exp. Bot.* — 1997. — 48, N 313. — P. 1493—1509.
 37. Dunstan D.I., Tautorius T.E., Thorpe T.A. Somatic embryogenesis in woody plants // *In vitro Embryogenesis in Plants* / Ed. T.A. Thorpe. — Netherlands, Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995. — P. 471—538.
 38. Engelmann F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: Engelmann F, Takagi H (eds) *Cryopreservation of tropical plant germplasm – current research progress and application*. JIRCAS, Tsukuba/IPGRI, Rome, 2000, pp 8–20.
 39. Filonova L, Bozhkov P & von Arnold S. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J. Exp. Bot.* 51: 249–264, 2000a.
 40. Find, J. I. Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, desiccation and germination. *Plant Sci.* 128:75–83; 1997.
 41. 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.

42. Fujimura T., Komamine A. Involvement of endogenous auxin in somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture // *Ztschr. Pflanzenphysiol.*, 1979, 95, № 1, p. 13-19.
43. Gower ST, Richards JH. Larches: deciduous conifers in an evergreen world. *Biosciences* 40:818-826; 1990.
44. Gray D.J. Nonzygotic embryogenesis // *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises* / Eds. R.H. Trigiano, D.J. Gray. — Tokyo: CRC Press, 1996. — P. 133—147.
45. Gray D.J., Purohit A. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology // *Crit. Rev. Plant Sci.* — 1991. — 10. — P. 33—61.
46. Gupta P.K., Grob J.A. Somatic embryogenesis in conifers // In: Jain S., Gupta P., Newton R. (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants* / Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 1995. V. 1. P. 81–98.
47. Gupta P.K., Timmis R., Timmis K. et al. Increase in forest productivity through biotechnology // *Crop Productivity and Sustainability-Shaping the Future* / Eds. V.L. Chopra, R.B. Singh, A. Verma. — New Delhi: Oxford&IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., 1999. — P. 745—752.
48. Gupta PK, Holmstrom DG, Larson B, Zucati J. Development and stratification of pine somatic embryos using a liquid system. US Patent 20050026281, 2005.
49. Gupta, P.K. and D.J. Durzan. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Rep.* 4:177-179; 1985.
50. Gutmann M, von Aderkas P, Label P, Lelu M-A. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *J Exp Bot* 47: 1905-1917; 1996.
51. Hay EI, Charest PJ. Somatic embryo germination and desiccation tolerance in conifers. In: Mohan JS, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol 4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 61–69, 1999.
52. Joy IV, R. W.; Kumar, P. P.; Thorpe, T. A. Long-term storage of somatic embryogenic white spruce tissue at ambient temperature. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 25:53–60; 1991a.
53. Kartha, K. K.; Fowke, L. C.; Leung, N. L.; Caswell, K. L.; Hakman, I. Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). *J. Plant Physiol.* 132:529–539; 1988.
54. Kim YW, Moon HK. Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 88:241-245; 2007.
55. Klimaszewska K, Hargreaves C, Lelu-Walter M-A, Trontin J-F. Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. In: Germanà MA, Lambardi M (eds)

- In Vitro Plant Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology, Chap 7. Springer Humana Press (in press); 2015.
56. Klimaszewska K. Plantlet development from immature zygotic embryos of hybrid larch through somatic embryogenesis. *Plant Sci* 63:95-103; 1989a.
57. Klimaszewska K., Bonga J.M., Park Y.S., Lelu-Walter M.-A., Harvengt L., Trontin J.F., MacEacheron I. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2006. V. 86. P. 87–101.
58. Klimaszewska K., Cyr D.R. Conifer somatic embryogenesis: I. Development // *Dendrobiology.* 2002. V. 48. P. 31–39.
59. Klimaszewska K., Park Y.-S., Overton C., McEacheron I., Bonga J.M. Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. // *In Vitro Cell Dev. Biol.Plant.* 2001. V. 37. P. 392–399.
60. Klimaszewska, K.; Bernier-Cardou, M.; Cyr, D. R.; Sutton, B. C. S. Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36:279–286; 2000.
61. Klimaszewska, K.; Smith, D. R. Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiol. Plant.* 100:949–957; 1997.
62. Kong, L.; Yeung, E. C. Effects of silver nitrate and polyethylene glycol on white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development: enhancing cotyledonary embryo formation and endogenous ABA content. *Physiol. Plant.* 93:298–304; 1995.
63. Label P, Lelu M-A. Exogenous abscisic acid fate during maturation of hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryo. *Physiol Plant* 109: 456-462; 2000.
64. Label P, Lelu M-A. Influence of exogenous abscisic acid on germination and plantlet frequencies of hybrid larch somatic embryos (*Larix x leptoeuropaea*). Relation with in planta abscisic acid and abscisic acid glucose ester levels. *Plant Growth Regul* 15:175-182; 1994.
65. Lambardi M, De Carlo A. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. In: Jain SM, Ishii K (eds) *Micropropagation of woody trees and fruits.* Kluwer Academic, Dordrecht, 2003, pp 815–840.
66. 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.

67. 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.
68. 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.
69. Lelu-Walter M-A, Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait) // *Plant Cell Rep.* 2006. V. 25. P. 767–776.
70. Lelu-Walter M-A, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M, Pâques LE. Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genet Genomes* 9: 883-899; 2013.
71. Lelu-Walter M-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. Clonal plant production from self- and crosspollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2008. V. 92. P. 31–45.
72. Lelu-Walter M-A., Paques L.E. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x marschlinsii*). Perspectives for breeding // *Ann. For. Sci.* 2009. V. 66. P. 104.
73. Li, X. Y.; Huang, F. H.; Grur, E. E. Polyethylene glycol-promoted development of somatic embryos in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 33:184–189; 1997.
74. Litvay, J. D.; Verma, D. C.; Johnson, M. A. 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.). *Plant Cell Rep.* 1985. 4:325–328; 1985.
75. Malabadi R. B., Teixeira da Silva J. A., Mulgund G. S. Induction of somatic embryogenesis in *Pinus caribaea*. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 5(1), 27-32, 2011b.
76. Malabadi R.B., Choudhury H., Tandon P. Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Pinus kesiya* (Royle ex. Grod.) // *Appl Biol Res.* 2002. V. 4. P. 1–10.
77. Malabadi R.B., Van Staden J. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula* // *Tree Physiology.* 2005. V. 25. P. 11–16.
78. Merkle S.A., Dean J.E. Forest tree biotechnology // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2000. — 11, N 3. — P. 298—302.
79. Merkle S.A., Parrott W.A., Flinn B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis // *In vitro embryogenesis in plants* / Ed. T.A. Thorpe. — Netherlands: Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995. — P. 155—203.

80. Merkle SA, Montello PM, Xia X, Upchurch BL, Smith DR. Light quality treatments enhance somatic seedling production in three southern pine species. *Tree Physiol* 26:187–194, 2006.
81. Misra S. Conifer zygotic embryogenesis, somatic embryogenesis, and seed germination: Biochemical and molecular advances // *Seed Science Research* / Volume 4 / Issue 04. 1994. P. 357 – 384
82. Murashige T. Clonal clops through tissue culture: *Plant Tissue Cult. and Its Bio-technol. Appl., B. etc.: Spring. – Verl., 1977, p. 392-403.*
83. 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.
84. Nagmani, R.; Becwar, M. R.; Wann, S. R. Single cell origin and development of somatic embryos of *Picea abies* (L.) Karst. (Norway spruce) and *P. glauca* (Moench) Voss (white spruce). *Plant Cell Rep.* 6:157–159; 1987.
85. Nomura K., Komamine A.I. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.* 79: 988–991; 1985.
86. Nomura K., Komamine A.I. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis // *In vitro Embryogenesis in Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture* / Ed. T.A. Thorpe. — Vol. 20. — Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ., 1995. — P. 417—470.
87. 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.
88. Persy 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.
89. Pullman G.S., Bucalo K. Pine somatic embryogenesis using zygotic embryos as explants // *Plant Embryo Cultures: Methods in Molecular Biology* / Trevor A. Thorpe, Edward C. Yeung. 2011. V. 710. P. 267–291.
90. Pullman, G.S., Gupta, P.K., Timmis, R., Carpenter, C., Kreitinger, M., Welty, E. Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon // *Plant cell reports*, 2005, v.24 no.5 pp. 271-279.
91. Raghavan V. Applied aspects embryo culture // *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture* / Eds. I. Reinert, Y.P.S. Bajaj. — Berlin, New York: Springer-Verlag, 1977. — P. 375—398.

92. Roberts D.R., Flinn B.S., Webb D.T. et al. Abscisic acid and indole-3butric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce // *Physiol. Plant.* — 1990. — 78. — P. 355—360.
93. Sharp W.R., Sondahl M.R., Caldas L.S., Marraffa S.B. The physiology of in vitro asexual embryogenesis // *Hort. Rev.* — 1980. — 2. — P. 268—310.
94. Singh H. Embryology of Gymnosperms. Berlin: Gebruder Borntraeger. 1978. 302 p.
95. Skolmen R.G. Acacia (*Acacia koa* Gray) // *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees 1* / Ed. Y.P.S. Bajaj. — Vol. 1. — Berlin: Springer Verlag, 1986. — P. 375—384.
96. 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.
97. 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.
98. Steward F.C. Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant // *Amer. J. Bot.* — 1958. — 45. — P. 709—713.
99. Szczygieł K, Hazubska-Przybył T, Bojarczuk K. Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of the genera *Picea*, *Abies* and *Larix*.) *Acta Soc. Bot. Poloniae*, 76:7-15; 2007.
100. Tang W., Guo Z., Ouyang F. Plant regeneration from embryogenic cultures initiated from mature loblolly pine zygotic embryos // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2001. V. 37. P. 558–563
101. Thompson RG, von Aderkas P. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of western larch. *Plant Cell Rep* 11: 379-385; 1992.
102. Timmis R. Bioprocessing for tree production in the forest industry: conifer somatic embryogenesis // *Biotechnol. Prog.* V. 14. P. 156–166, 1998.
103. Toering, A., Pullman, G.S. Modeling available 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in a tissue culture medium containing activated carbon // *Plant cell, tissue, and organ culture*, 2005, v.82 no.2 pp. 179-188.
104. Tretiakova I, Voroshilova E, Ivanitskya A, Shuvaev D, Park M. The embryogenic lines and somatic embryogenesis of coniferous species in Siberia. In: Park YS, Bonga, JM (eds). *Proceedings of the IUFRO Working Party 2.09.02 conference on Integrating vegetative propagation, biotechnologies and genetic improvement for tree production and sustainable forest management*, pp71-79; 2012.

105. Trontin J-F, Klimaszewska K, Morel A, Hargreaves C, Lelu-Walter M-A. Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: a review of genome-wide approaches and recent insights. In: Germana MA, Lambardi M (eds) *In vitro embryogenesis in higher plants, Methods in Molecular Biology*, Chapter 8, 2016, vol. 1359, pp 167-207.
106. Von Aderkas P, Teyssier C, Charpentier JP, Gutmann M, Pâques L, Le Metté C, Ader K, Label P, Kong L, Lelu-Walter M-A. Effect of light conditions on anatomical and biochemical aspects of somatic and zygotic embryos of hybrid larch (*Larix x marschlinsii*). *Ann Bot* 115:605-615; 2015.
107. Von Aderkas P., Bonga J., Klimaszewska K., Owens J. Comparison of larch embryogeny in vivo and in vitro // *Woody plant biotechnology* / New York: Plenum press. 1991. P. 139-155.
108. Von Aderkas, P., Rohr, R., Sundberg, B., Gutmann, M., Dumont-BeBoux, N., and Lelu, M.A. Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69, 111–120; 2002.
109. Von Arnold S, Sabala I., Bozhkov P. et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2002. V. 69. P. 233–249.