Journal of Siberian Federal University. Biology 1 (2013 6) 44-60
~ ~ ~

УДК 581*581.1: 582.475.2

Образование каллуса и индукция соматических зародышей в культуре *in vitro* у *Pinus sibirica* Du Tour

И.Н. Третьякова[а]*, Е.В. Ворошилова[б], Д.Н. Шуваев[б], А.С. Лукина[а]
[а] Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Россия 660036, Красноярск, Академгородок 50/28
[б] Сибирский федеральный университет, Россия 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

Received 05.12.2011, received in revised form 28.01.2013, accepted 17.03.2013

В культуре in vitro из незрелых зиготических зародышей семян, собранных с деревьев Pinus sibirica (кедр сибирский), произрастающих в естественном древостое Западного Саяна и на клоновой плантации, был индуцирован неэмбриогенный каллус. Активный каллусогенез шел у эксплантов гибридных семян, полученных в результате контролируемого опыления клонов пыльцой кедров-акселератов с однолетним циклом развития женских шишек. Цитологические исследования показали, что на стадии индукции каллуса у всех эксплантов идет сильное удлинение клеток гипокотиля. На стадию пролиферации с образованием эмбриогенной массы вышли экспланты семян только отдельных клонов, опыленных пыльцой деревьев-акселератов. При этом удлиненные клетки асимметрично делились и формировали эмбриональные инициали, из которых развивались глобулы соматических зародышей и эмбриональные трубки.

Ключевые слова: кедр сибирский, пыльца кедров-акселератов, зиготические зародыши, гибридные зародыши, каллус, эмбриогенная масса, соматические зародыши.

Введение

Pinus sibirica Du Tour (кедр сибирский) – единственный орехоносный вид в горах Южной Сибири – подвергается хищническому истреблению в результате антропогенной нагрузки. Вместе с тем естественное возобновление кедра сибирского затруднено из-за специфичности его половой репродукции, которая отличается от других представителей семейства *Pinaceae*:

– высокой полиэмбриональностью семян, до 16 зародышей в одном мегагаметофите, требующих длительной стратификации (4-7 мес.) (Третьякова, 1990);

– встречаемостью в природных популяциях кедра сибирского уникальных геноти-

© Siberian Federal University. All rights reserved
* Corresponding author E-mail address: culture@ksn.krasn.ru

пов (0,2 %) – «кедров-акселератов», у которых наблюдается акселерация генеративного цикла (от опыления до оплодотворения проходит 2 мес. вместо 14-15 мес. (Ирошников, 1974; Минина, Ларионова, 1979). Однако размножение таких форм естественным путем невозможно вследствие гаметофитной несовместимости и отсутствия зародыша (Третьякова, 1990, Третьякова и др., 2004).

Для изучения репродуктивного процесса кедра сибирского и сохранения его уникальных форм наиболее перспективным направлением является проведение экспериментов по контролируемому опылению и получению хозяйственно-ценных гибридов, которые можно размножать *ex situ* и современными инновационными методами биотехнологии в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез.

Соматический эмбриогенез, открытый 26 лет назад у *Picea glauca* (Hakman et al., 1985), является асексуальным способом микроклонального размножения, основанным на тотипотентности растительных клеток (Бутенко, 1964). В настоящее время этот феномен не только используется как модель для исследования процессов морфогенеза (тотипотентность, детерминация, дифференцировка) растительных клеток, физиологических и молекулярно-генетических процессов, но и позволяет получить генетически однородный селекционный материал улучшенных форм и проводить их массовое тиражирование. К настоящему времени эмбриогенный каллус и соматические зародыши были индуцированы у 16 видов рода *Pinus* и у более половины из них получены растения-регенеранты (Klimaszewska, Cyr, 2002). В качестве источника соматических клеток для индукции соматического эмбриогенеза использовали мегагаметофиты и незрелые зародыши на разных стадиях развития. Было выявлено, что компетентность эксплантов при введении их в культуру оказалась наиболее высокой на посткливажной стадии развития зародыша (культура мегагаметофитов) и предсемядольной стадии развития (культура зародышей) (Lelu et al., 1994; Klimaszewska et al., 2001; и др.). Частота инициации соматического эмбриогенеза у большинства изученных видов рода *Pinus* сильно варьировала. Так, у *P. taeda* она колебалась от 2 (Becwar et al., 1990) до 25 % (MacKay et al., 2006), у *P. strobes* – от 52,9 (Finer et al., 1989) до 76 % (Klimaszewska et al., 2001), у *P. pinea* – от 0,5 до 7,2 % (Carnerous et al., 2009), у *P. pinaster* в пределах 15 % (Bercetche, Pagues, 1995). Выявили, что инициация эмбриогенного каллуса и образование соматических зародышей у *P. strobus* (Carin et al., 1998; Klimaszewska et al., 2001), *P. monticola* (Persy et al., 2000), *P. taeda* (MacKay et al., 2006), *P. sylvestris* (Nikanen, 2004; Lelu-Walter et al., 2008), *P. pinea* (Klimaszewska et al., 2009) происходит под генетическим контролем. При этом было показано, что у *P. sylvestris* гибридизация положительно влияет на частоту инициации эмбриогенного каллуса. У гибридов, полученных при скрещивании генотипов, экспланты которых в культуре *in vitro* образуют соматические зародыши, частота инициации эмбриогенного каллуса значительно выше, чем у негибридных эксплантов (Lelu-Walter et al., 2008).

Первые результаты по индукции соматического эмбриогенеза из мегагаметофитов и изолированных незрелых зиготических зародышей у кедра сибирского были получены нами в 2009 г. При этом было выявлено, что процесс инициации каллуса шел у 58 % эксплантов (Третьякова, Ижболдина, 2009).

Целью настоящего исследования являлась индукция эмбриогенного каллуса из зародышей гибридных семян кедра сибирского и сравнение эмбриогенной компетентности

семян «отцовских» и «материнских» деревьев, участвовавших в экспериментах по контролируемому опылению.

Материалы и методы

Объекты исследований

Объектом исследования служили клоны кедра сибирского, произрастающие на прививочной плантации Западно-Саянского опытного лесного хозяйства (ОЛХ). Клоновая прививочная плантация располагается на территории ОЛХ Даурского лесничества вблизи пос. Ермаковское (53°16`с.ш. и 92°23` в.д., высота над уровнем моря 300-320 м). Плантация занимает площадь 10 га. Каждый клон представлен прививками плюсовых деревьев кедра сибирского из естественного древостоя Западного Саяна, выделенных Ю.А. Череповским с сотрудниками, и состоит из 12-15 деревьев (рамет).

В 2007-2011 гг. на семи высокоурожайных 14-20-летних клонах (277/22, 275/20, 280/25, 281/26, 002, 145/4, 153/13) проводили опыты по контролируемому опылению. Для опыления клонов собирали пыльцу с двух деревьев-акселератов с однолетним циклом развития женской шишки (деревья 106 и 107) и шести плюсовых деревьев, характеризующихся стабильно высокой семенной продуктивностью женских шишек, крупными полиэмбриональными семенами. Эти деревья произрастали в естественном древостое Западного Саяна. Возраст деревьев 100-110 лет. Со всех опытных деревьев, «отцовских» и «материнских» (клоны), проводили сбор шишек, полученных в результате свободного опыления, а также при контролируемом опылении клонов и их самоопылении. Гибридные семена были получены от 49 вариантов контролируемого опыления. В табл. 1 приведены варианты кон-

Таблица 1. Варианты контролируемого опыления и сохранность шишек кедра сибирского на клоновой плантации Западно-Саянского опытного лесного хозяйства (числитель – число завязавшихся шишек, знаменатель – % сохранившихся шишек от числа завязавшихся)

Клон / Дерево-опылитель	275/20	277/22	145/4	153/13	280/25	281/26	002
2006/2007 гг.							
106		16/80					
492		14/78				24/60	
277		2/40					
2008/2009 гг.							
106	66/94	21/68	13/50	40/56	15/37	4/100	
Кш2	55/88	1/10	3/100	27/66	9/43		
357	29/10	17/100			8/27		
Самоопыление	31/56	6/100	5/25	13/50	9/56		
2010/2011 гг.							
106	14/47	8/29	12/40	5/41	13/45	17/62	15/45
107	9/56	11/79	5/22	13/76	12/75	5/55	12/67
Кт1	10/83	10/83	7/47	8/61	11/48	10/55	17/80
Кт2	10/67	5/62	24/80	21/95	14/82	7/43	14/82
Самоопыление	13/43	10/58	8/40	10/53	15/68	5/28	12/70

тролируемого опыления и сохранность опыленных шишек; в разных вариантах получено от 2 до 66 шишек, семена которых были использованы в экспериментах по культуре ткани.

Растительный материал

В качестве эксплантов для индукции каллуса использовали зиготические зародыши на предсемядольной (I декада июля) и семядольной (III декада июля – начало августа) стадиях. В культуру вводили 20-50 зародышей от каждого варианта контролируемого опыления. Мегагаметофиты извлекали из семян и стерилизовали гипохлоритом натрия или раствором йода с 90 %-ным спиртом (1:3) с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде. В стерильных условиях зародыши извлекали из мегагаметофитов и помещали на питательную среду ½ LV (Becwar et al., 1990) с добавлением мезоинозита (0,1 г·л$^{-1}$), L-глютамина (1,0 г·л$^{-1}$), фитогормонов: 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) (0,5-3 мг·л$^{-1}$) и 6-бензинаминопурина (6-БАП) (0,5-1,0 мг·л$^{-1}$), сахарозы (30 г·л$^{-1}$), а также агара (7 г·л$^{-1}$). Кроме того, в 2011 г. после сбора семена выдерживали в холодильной камере при температуре 0–2 ºС, в течение 1-2 месяцев, а в среду вводили аскорбиновую кислоту в концентрации 300 мг·л$^{-1}$. Пролиферация эмбриональной массы шла на той же среде с пониженной концентрацией 6-БАП (0,25-0,5мг·л$^{-1}$) и сахарозы (20 г·л$^{-1}$). Культивирование проводили в темноте при 25°С±1°С. Для сравнения интенсивности роста культур образующийся каллус взвешивали через 10, 20, 30 45 и 60 суток. В табл. 2 дано число эксплантов (зародышей), у которых шло образование каллуса.

Таблица 2. Число эксплантов (зародыши семян клонов кедра сибирского), от которых был получен каллус

Клон / Дерево-опылитель	275/20	277/22	145/4	153/13	280/25	281/26	002
2006/2007 гг.							
106		12					
492		14				17	
277		8					
2008/2009 гг.							
106	25	8	14	15	16	12	
Кш2	21	6	9	10	11		
357	11	10			9		
Самоопыление	12	4	13	7	8		
2010/2011 гг.							
106	22	15	19	21	24	31	29
107	14	17	11	16	20	22	15
Кт1	16	12	17	8	16	13	26
Кт2	13	9	11	15	19	14	17
Самоопыление	7	10	14	11	6	8	7

Цитологический анализ

Для цитологического анализа использовали временные давленые препараты. Окраску проводили сафранином с добавлением капли метиленового синего. Просмотр образцов осуществляли на микроскопе «МИКРОМЕД-6» (ЛОМО, Россия). Замеры клеток и эмбриональных структур делали при помощи окуляр-микрометра.

Статистический анализ

Для оценки достоверности различий использовали однофакторный дисперсионный анализ и t-критерий Стьюдента и критерий Фишера (при $p \leq 0{,}05$) (Рокицкий, 1973).

Результаты

Каллусогенез зародышей семян, собранных у деревьев из естественного древостоя

Морфологический отклик зародышей семян, собранных у деревьев кедра сибирского из естественного древостоя, введенных в культуру *in vitro*, был заметен уже на 4-8-е сутки и выражался в формировании каллуса в области зародышевого корешка (рис. 1А). На

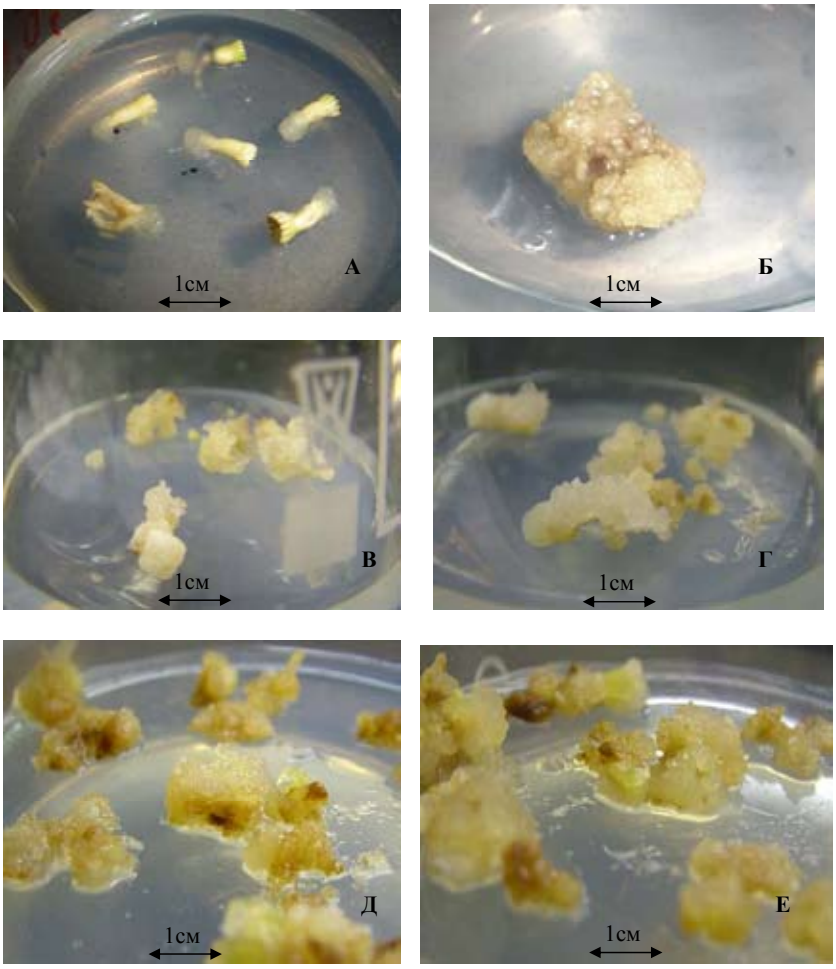

Рис. 1. Образование каллуса из эксплантов зародышей семян кедра сибирского на среде 1/2 LV: А – индукция каллуса в области зародышевого корешка (7-10-е сутки культивирования); Б – образование каллуса по всей длине гипокотиля (30-е сутки культивирования); В, Г – пролиферирующие каллусы на 50-60-е сутки; Д, Е – появление некрозов в каллусе (60-е сутки культивирования)

30-е сутки культивирования каллусы образовывались по всей длине гипокотиля (рис. 1Б). Каллусы развивались у значительного большинства эксплантов (75-80 %), введенных в культуру на предсемядольной и семядольной стадиях развития зиготического зародыша, когда его длина составляла 2 мм (I-III декады июля).

Наблюдения за динамикой роста эмбриогенного каллуса на среде 1/2LV показали, что процесс инициации каллусообразования у зародышей семян, собранных с 15 деревьев кедра сибирского, произрастающих в естественном древостое, варьировал по активности образования каллусной массы. На 28-е сутки культивирования (конец стадии инициации) у большинства эксплантов масса каллуса колебалась от 0,29 до 0,79 г (рис. 2). При пересадке каллусов на пролиферационную среду рост их продолжался. Через 60 дней культивирования активный каллусогенез был отмечен у эксплантов дерева 358, масса каллуса которого составила 0,98 г. Различия по активности каллусогенеза у эксплантов дерева 358 по сравнению с другими деревьями-донорами являлись статистически значимыми ($F=16,87$; $p < 0,05$).

При последующих пересадках прирост каллуса у эксплантов из естественного древостоя замедлился и в нем появлялись некротические образования (рис. 1Д, Е). У эксплантов трех деревьев – 277, 257 и 358 – каллусогенез продолжался в течение 7-10 месяцев, после чего каллусы бурели и отмирали. Таким образом, у эксплантов кедра сибирского из естественного древостоя формировались неэмбриогенные каллусы.

Каллусогенез у зародышей семян, собранных у клонов

В 2010 г. на клоновой плантации урожай шишек практически отсутствовал. Лишь у четырех клонов отмечалось образование шишек, зародыши семян которых были введены в культуру *in vitro* на стадии инициации и развития семядолей (первая – третья декады

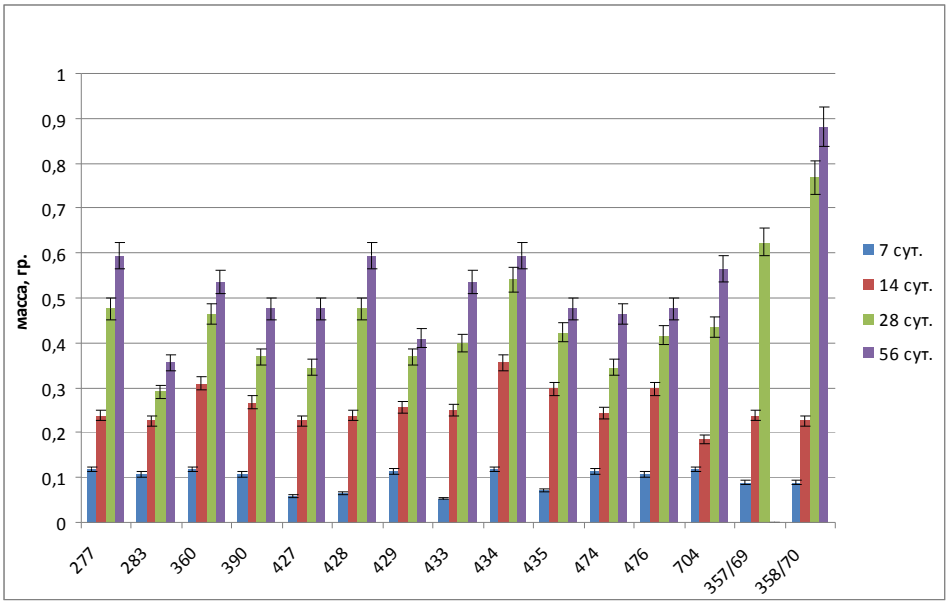

Рис. 2. Динамика роста каллуса, полученного из эксплантов зародышей семян кедра сибирского из естественного древостоя, 2009 г.

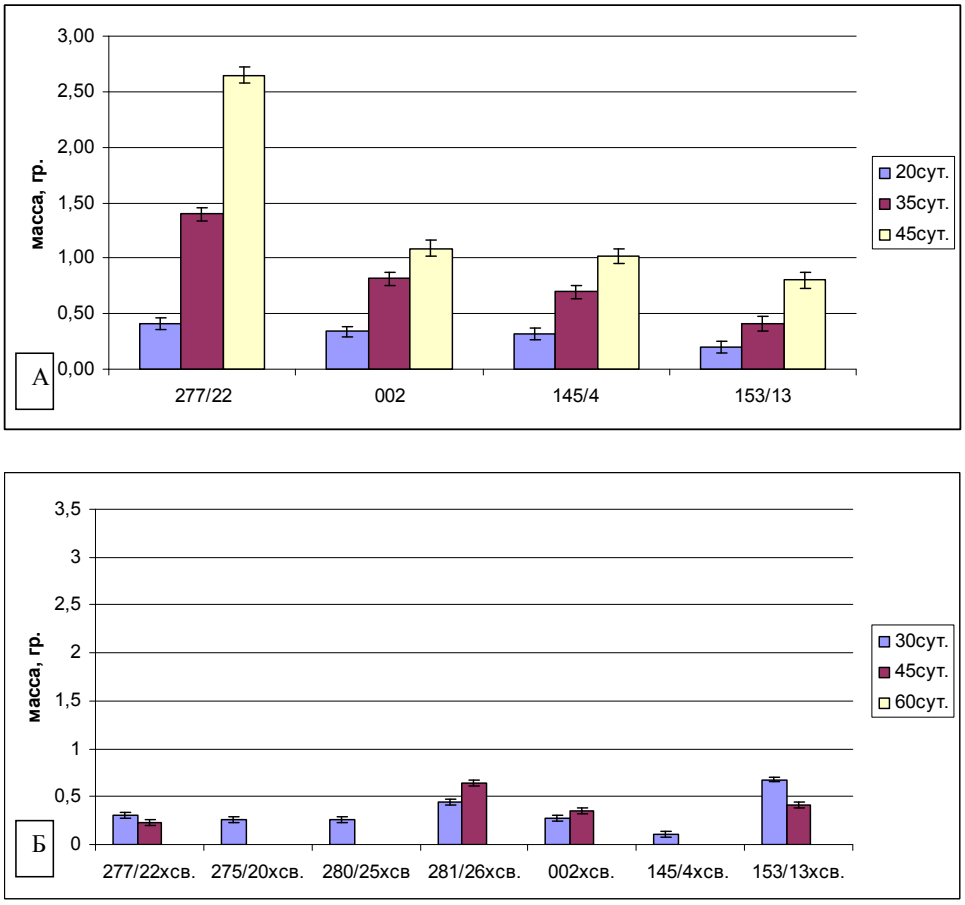

Рис. 3. Динамика роста каллуса, полученного из эксплантов зародышей семян клонов кедра сибирского (свободное опыление), А – 2010 г., Б – 2011 г.

июля). У эксплантов зародышей семян культивируемых клонов образование каллуса не отличалось от вышеописанных каллусов, полученных от деревьев из естественного древостоя. Наиболее активный рост каллуса шел у клона 277/22. За 1 месяц инициации масса каллуса этого клона составила 1,96 г, а через две недели на пролиферационной среде его масса увеличилась в 2 раза (рис. 3А). У трех других клонов нарастание массы каллуса шло значительно слабее и на 60-е сутки культивирования каллусы бурели и некротизировали. У клона 277/22 рост каллуса при регулярных пересадках продолжался в течение 12 месяцев, затем каллус отмирал. Влияние варианта клона на регенерационную способность в культуре *in vitro* являлось статистически значимым ($F=5,5$; $p < 0,05$).

В 2011 г. в культуру *in vitro* были введены зародыши семян на стадии инициации семядолей (первая декада июля), полученных от свободноопыленных материнских клонов кедра сибирского. Наблюдения за образованием каллусов из эксплантов зародышей показали, что формирование их шло слабо. Масса каллуса к концу стадии инициации (30-е сутки) у эксплантов от разных клонов колебалась от 0,01 до 0,66 г (рис. 3А). Лишь у клона 153/13 через 1 месяц культивирования масса каллуса составила 0,7 г. На стадию пролиферации

вышли только три из семи свободноопыленных клонов (277/22, 002 и 153/13). К концу второго пассажа на пролиферационной среде каллусы от свободноопыленных эксплантов некротизировались.

Каллусогенез у зародышей гибридных семян

В 2007 г. были введены в культуру *in vitro* гибридные зародыши на стадии инициации семядолей (первая декада июля), полученные в результате контролируемого опыления клонов. Рост каллусов гибридных семян, полученных в результате опыления клонов 277/22, 280/25 и 281/26, шел разным темпом (рис. 4). Наиболее активный прирост каллусной массы был отмечен у данных клонов в вариантах контролируемого опыления с использованием пыльцы дерева-акселерата 106. После первого пассажа на пролиферационной среде каллусы данного варианта распадались на кусочки и активно пролиферировали. Формировался эмбриогенный каллус (рис. 1В, Г). Масса каллуса, полученного от дерева 106, в 2 раза превышала массу каллуса «отцовских» деревьев из естественного древостоя (рис. 4). Положительное влияние пыльцы дерева-акселерата (106) на регенерационную способность в культуре *in vitro* по сравнению с другими опылителями являлось статистически значимым. Оценку влияния проводили для клона 277/22 между вариантами опыления 277/22x106 и 277/22x492.

В 2009-2011 гг. в культуру *in vitro* были введены экспланты зародышей семян, полученных в результате контролируемого опыления клонов пыльцой деревьев-акселератов 106 и 107, трех плюсовых деревьев и самоопыленных клонов.

В 2009 г. каллусогенез у эксплантов 18 вариантов гибридных семян, зародыши которых были введены в культуру на стадии развитых семядолей (август), шел слабо по сравнению с таковым в 2007 г. К концу периода инициации (30-е сутки) масса каллуса у различных клонов колебалась от 0,07 до 0,38 г.

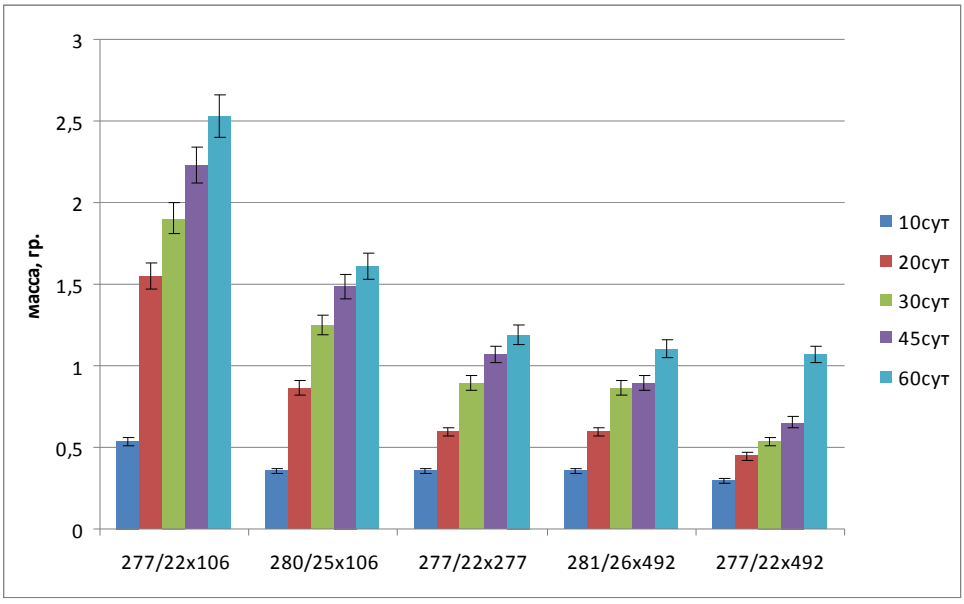

Рис. 4. Динамика роста каллуса из эксплантов зародышей семян клонов кедра сибирского, полученных в результате контролируемого опыления на клоновой прививочной плантации, 2007 г.

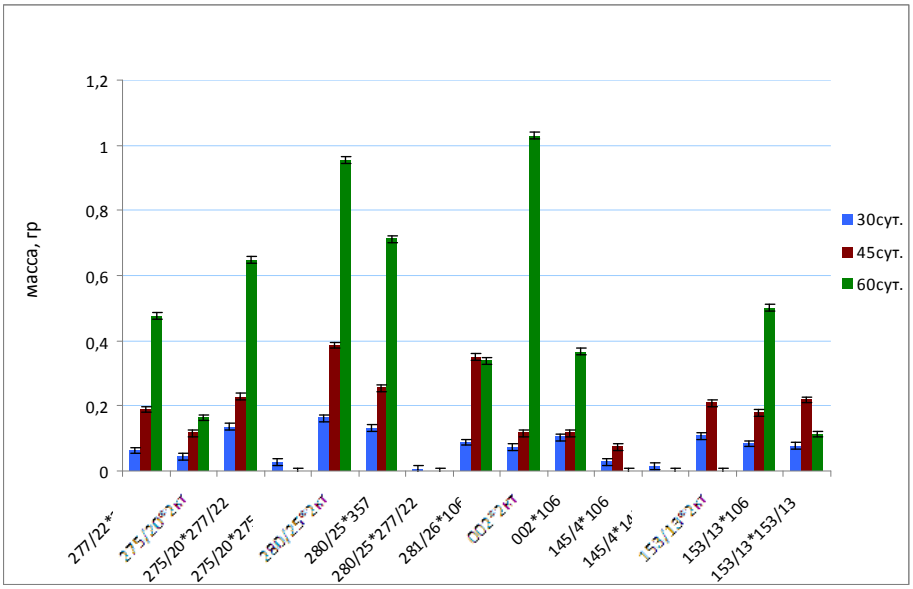

Рис. 5. Динамика роста каллуса, полученного из эксплантов зародышей семян клонов кедра сибирского в результате контролируемого опыления на клоновой прививочной плантации, 2009 г.

Пролиферация происходила лишь у эксплантов, полученных от двух клонов 280/25 и 002, опыленных пыльцой плюсового дерева 2кш. Слабый каллусогенез наблюдался лишь у эксплантов самоопыленных клонов (рис. 5). Различия регенерационной способности в культуре *in vitro* для разных вариантов опыления были статистически значимы ($F=311,7$; $p < 0,05$). Слабый каллусогенез у эксплантов в 2009 г., вероятно, можно объяснить поздним сроком сбора семян и введением зародышей в культуру на стадии зрелых семядолей.

В 2011 г. в культуру *in vitro* были введены экспланты зародышей семян на стадии инициации семядолей (первая декада июля) от 18 вариантов контролируемого опыления, опыленных пыльцой двух кедров-акселератов 106 и 107 с однолетним циклом развития и пыльцой плюсового дерева 2кт, а также самоопыленных клонов. Результаты исследования показали, что на стадии инициации масса каллуса у эксплантов нарастала слабо и колебалась от 0,08 (вариант опыления 153/13х107) до 0,5-0,6 г (вариант 145/4х1кт, 153/13х1кт, 153/13х106, 153/13х153/13). Однако при перенесении каллусов на среду с пониженным содержанием 6-БАП рост каллусов заметно увеличился. Так, у варианта контролируемого опыления 277/22х107 на 45-е сутки масса каллуса составила 1,74 г, а на 60-е сутки она увеличилась до 2,75 г; у варианта 275/20х106 соответственно 0,81 и 2,9 г и т.д. Наиболее активный каллусогенез был выявлен у эксплантов, полученных в результате опыления клонов пыльцой деревьев-акселератов. В 2011 г. различия в активности каллусогенеза при опылении клонов пыльцой деревьев-акселератов не являлись статистически значимыми. При дальнейшем культивировании каллусогенез шел наиболее интенсивно у клона 153/13, особенно в варианте контролируемого опыления 153/13х107 (дерева-акселерата) (рис. 6). Каллусы данного варианта приобрели рыхлую структуру, характерную для эмбриогенной ткани, и в них происходило активное образование эмбриогенной массы (ЭМ).

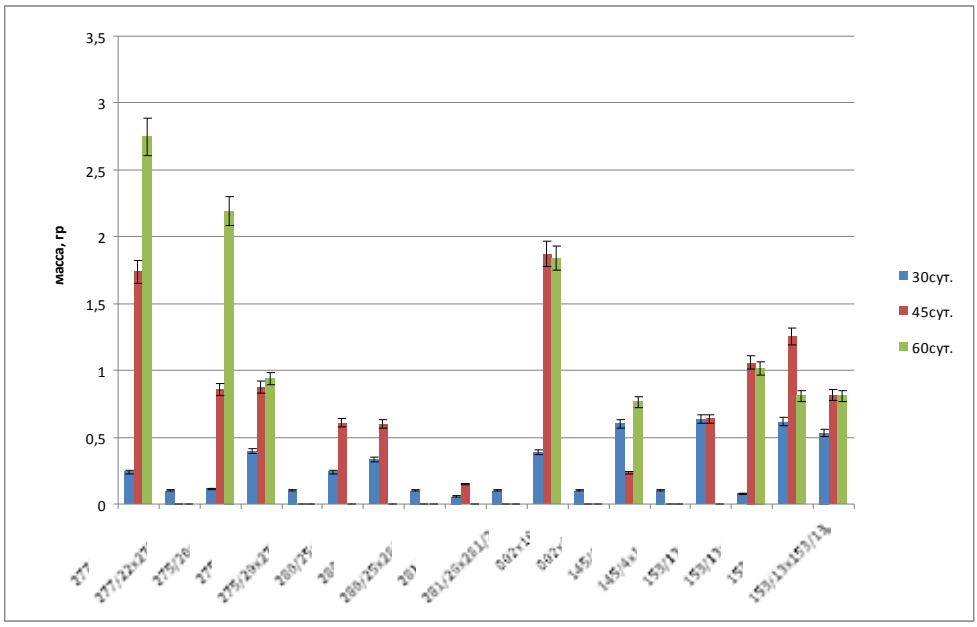

Рис. 6. Динамика роста каллуса кедра сибирского, полученного из эксплантов зародышей семян клонов кедра сибирского в результате контролируемого опыления на клоновой прививочной плантации, 2011 г.

Экспланты от самоопыленных клонов, введенные в культуру, характеризовались слабым каллусообразованием. К концу стадии инициации масса каллуса у зародышей самоопыленных клонов составила всего 0,1 г, за исключением клона 153/13, у которого масса каллуса самоопыленного варианта к этому сроку увеличилась до 0,5 г. Следует отметить, что только у этого клона в каллусе наблюдалось формирование ЭМ. Каллусы остальных пяти самоопыленных клонов некротизировались после первого же пассажа стадии пролиферации.

Таким образом, контролируемое опыление клонов кедра сибирского на клоновой прививочной плантации положительно сказалось на росте каллусных культур. Наиболее высокие показатели роста каллуса были отмечены в вариантах контролируемого опыления клонов 002 и 153/13, опыленных пыльцой кедров-акселератов, но данные различия не являлись статистически значимыми.

Цитогистологическое исследование образования каллуса и соматических зародышей

Цитологические исследования показали, что на 20-й день культивирования все соматические клетки растягивались до 200-300 мкм (рис. 7А). Удлиненные клетки каллуса оставались без изменения до конца инициации. При пересадке каллусов на пролиферационную среду у отдельных клонов 277/22 и 153/13 (2007, 2011 г.) и 002 (2011 г.), опыленных пыльцой деревьев кедров-акселератов, удлиненные клетки претерпевали асимметричное деление и формировали маленькую клетку – эмбриональную инициаль – и длинную клетку – эмбриональную трубку. Оба типа клеток активно делились: из инициальных клеток образовывались глобулы соматических зародышей, а из эмбриональных трубок формировались сложные вытянутые структуры с множественными перегородками (рис. 7Б, В). Каждая глобула окружалась множествен-

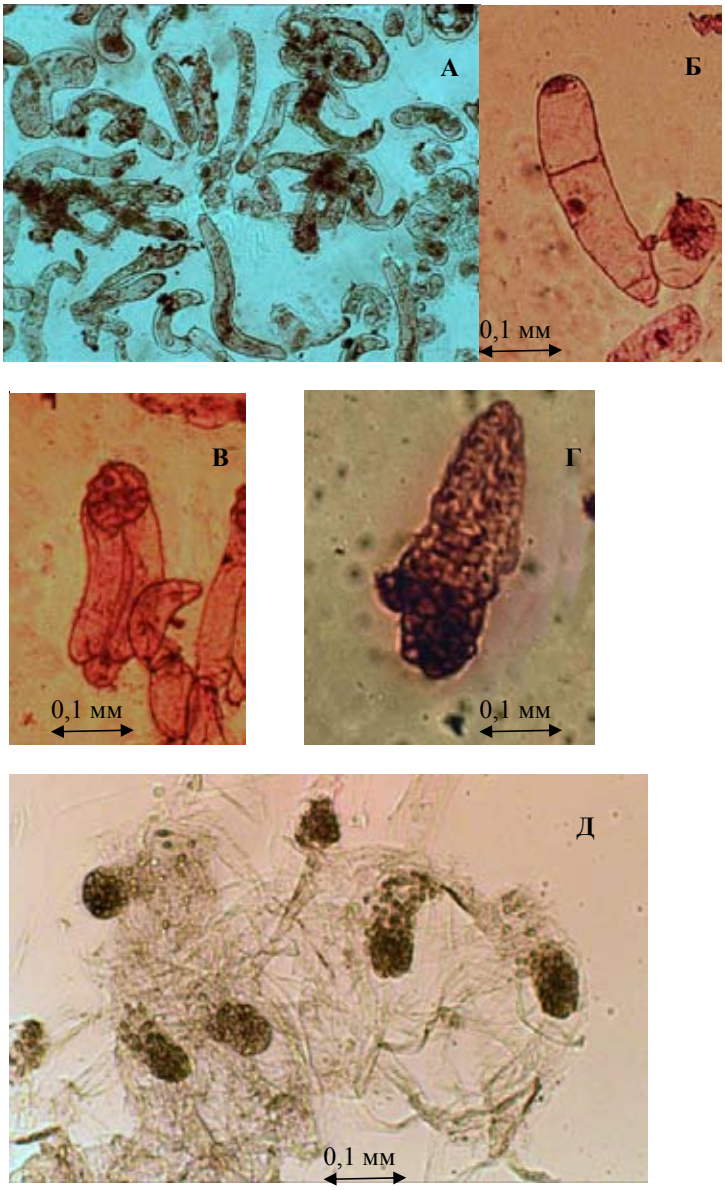

Рис. 7. Формирование соматических зародышей: А – удлинение соматических клеток гипокотиля; Б – эмбриональная трубка с перегородками; В – глобула соматического зародыша с эмбриональными трубками на дистальном конце; Г – кливаж соматических зародышей на стадии глобулы; Д – торпедообразные соматические зародыши

ными эмбриональными трубками. Формировалась ЭМ, которая состояла из глобул соматических зародышей и эмбриогенных трубок – суспензоров. Эмбриональные глобулы подвергались кливажу (рис. 7Г). На 50-60-е сутки культивирования (1-й месяц пролиферации) в единичных каллусах возникали торпедообразные соматические зародыши (рис. 7Д).

Таким образом, цитогистологическое исследование показало, что активное образование эмбрионально-суспензорной массы и формирование в ней соматических зародышей наблюдалось лишь в варианте контро-

лируемого опыления клонов пыльцой кедра-акселерата.

Обсуждение

Эмбриогенный каллус и соматические зародыши были индуцированы зарубежными учеными у 16 видов сосен: *P. sylvestris, P. pinaster* (Lelu et al., 1999, 2008; Nikanen et al., 2004; Park et al., 2006), *P. strobus* (Garin et al., 1998; Park et al., 2006) и *P. banksiana* (Park et al., 1993, 1998, 2006), *P. caribae* (Laine, David, 1990), *P. radiata* (Smith, 1996), *P. nigra* (Salajova et al., 1999), *P. roxburghii* (Arya et al., 2000), *P. monticola* (Persy et al., 2000), *P. pinea* (Carnerous et al., 2009), *P. taeda* (Bercwar et al., 1990; MacKay et al., 2006) и др. Частота инициации эмбриогенного каллуса зависела от дерева-донора, стадии введения экспланта в культуру, состава питательной среды, введения в среду гормонов, желирующих агентов и других факторов (Park et al., 2006). При этом на средах с ауксинами и цитокининами частота регенерации эмбриогенного каллуса у разных видов *Pinus* колебалась от 2 до 76 % (Bercwar et al., 1990; Klimaszewska et al., 2001; MacKay et al., 2006; Carneros et al., 2009).

У кедра сибирского инициация каллуса на среде ½ LV шла у 75-80 % зародышей от деревьев, произрастающих в естественном древостое, на клоновой плантации и подвергнутых контролируемому опылению. Процесс каллусогенеза опытных вариантов в культуре *in vitro* осуществлялся разными темпами. Наиболее интенсивное образование каллуса было отмечено у зародышей, полученных в разных вариантах контролируемого опыления у трех клонов: 277/22, 002 и 153/13. Однако полученные каллусы имели, как правило, плотную матовую структуру в течение 6-10 месяцев культивирования и затем подвергались некрозу. Формирование каллусов с рыхлой белой структурой было обнаружено у зародышей семян, введенных в культуру от двух клонов (002 и 153/13), опыленных пыльцой деревьев-акселератов. Данные каллусы образовывались в области между корневым чехликом и стелой гипокотиля, активно росли, и в них происходило формирование пролиферирующей ЭМ.

Известно, что образование ЭК и соматических зародышей у видов хвойных идет под строгим генетическим контролем (Pullman, 2007; Carneros et al., 2007). Зародыши семян только единичных деревьев-доноров оказались способными образовывать эмбриогенный каллус и соматические зародыши (Klimaszewska et al., 2009; Lelu-Walter et al., 2008; Tretyakova, Barsukova, 2010). Генетический контроль инициации соматического эмбриогенеза был выявлен у *Picea glauca* (Park et al., 1993), *Pinus sylvestris* (Niskanen et al., 2004; Lelu-Walter et al., 2008), *Pinus taeda* (MakKay, 2006). Опыты по контролируемому опылению *P. sylvestris*, где в качестве родительских особей были использованы материнские и отцовские деревья с разным откликом их эксплантов на соматический эмбриогенез, показали влияние материнского эффекта на индукцию соматического эмбриогенеза. Эмбриогенные линии и соматический эмбриогенез были получены только для деревьев, используемых в контролируемом опылении как материнские. При самоопылении данных деревьев наблюдалась либо только инициация соматического эмбриогенеза, а образование сеянцев не происходило (Nikanen et al., 2004), или данный процесс успешно завершался с образованием соматических сеянцев, рост которых не отличался от вариантов с перекрестным опылением.

У кедра сибирского каллусогенез шел у значительного большинства эксплантов. Однако у зародышей семян, полученных от самоопыленных клонов, рост каллуса был

очень слабым или образования каллуса вообще не происходило. Эмбриогенный каллус и образование соматических зародышей было обнаружено только у двух клонов, опыленных пыльцой деревьев-акселератов. Данные клоны обладали высоким репродуктивным потенциалом. Вероятно, что у кедра сибирского образование соматических зародышей обусловлено генотипом дерева.

Образование ЭМ и развитие в ней соматических зародышей у кедра сибирского в основном шло по схеме, описанной для других видов хвойных (von Arnold, Hakman, 1988; Lelu et al., 1994; Klimaszewska et al., 2001; Stasolla, Yeung, 2003; Lelu-Walter, Pagues, 2009). Соматические зародыши проходили фазы инициации и пролиферации. Прежде всего запуск соматического эмбриогенеза кедра сибирского, как и у других видов хвойных, происходит в результате асимметричного деления соматических клеток гипокотиля, которое вызвано действием ауксина (2,4-Д) и цитокинина (6-БАП) (von Arnold, Hakman, 1988; Stasolla et al., 2003; Белоруссова, Третьякова, 2008). Точно такое же асимметричное деление лежит в основе зиготического эмбриогенеза всех видов растений (Батыгина, 1999). Известно, что асимметричное деление заложено уже в первом делении зиготы, которое приводит к образованию двух неравных клеток: маленькой терминальной, которая дает начало зародышу, и большой базальной клетке, дающей начало клетке трубки и суспензору. При этом полярность, заложенная в зиготе, в результате ее деления поддерживается и передается дочерним клеткам. Не исключено, что асимметричное деление и полярность являются основными критериями, определяющими переход клеток на путь эмбриогенеза: соматического или зиготического.

У кедра сибирского эмбриональные инициали подвергались многочисленным делениям и формировали глобулы соматических зародышей, окруженные суспензорами, состоящими из клеток-трубок. На глобулярной стадии развития образования соматических зародышей идет активный кливаж. Далее глобулы соматических зародышей кедра сибирского превращались в торпедообразные структуры. Эмбриогенные каллусы активно росли.

Феномен кливажной полиэмбрионии ярко выражен у сосен, в том числе у кедра сибирского. У последнего эмбриональные инициали зародыша, полученные от одной оплодотворенной яйцеклетки, распадаются на четыре идентичных эмбриональных единицы, каждая из которых дает начало четырем зародышам-близнецам (Третьякова, 1990). Кроме того, у кедра сибирского встречаются деревья с высокой степенью полиэмбрионии. 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 одной семяпочки у кедра сибирского могут развиваться 12-16 зародышей (Третьякова, 1990). Можно предположить, что в клетках сосен архивировано наличие кливажа, который в силу тотипотентности клеток реализуется в культуре *in vitro* в пролиферирующую эмбриональную массу путем активного деления и растяжения эмбриональных клеток (глобул) и эмбриональных трубок под действием гормонов. Следует отметить, что деревья с высокой степенью полиэмбрионии имеют крупные семена и многочисленные крупные шишки, т.е. такие деревья имеют высокий репродуктивный потенциал. Можно предположить, что экспланты таких деревьев могут служить кандидатами в качестве материала для получения соматических зародышей и растений.

Заключение

В результате культивирования кедра сибирского в культуре *in vitro* впервые были получены эмбриогенный каллус и соматические зародыши из незрелых половых зародышей гибридных семян, опыленных пыльцой кедров-акселератов. Успех получения соматических зародышей был связан с генотипом клона. Следовательно, для инициации эмбриогенного каллуса и получения соматических зародышей необходимо проведение прежде всего отбора генотипов, обладающих повышенной способностью к регенерации. Не исключено, что такими генотипами являются деревья с высоким репродуктивным потенциалом, как это было показано нами для видов лиственницы (Третьякова и др., 2011). При этом наиболее перспективным направлением считаем проведение работ по гибридизации с использованием пыльцы кедров-акселератов с однолетним циклом развития женских шишек. Проведение работ по введению гибридных зародышей в культуру *in vitro*, получение из них эмбриогенного каллуса, соматических зародышей и растений-регенерантов будут способствовать получению высокопродуктивных чистых линий у сосны сибирской, из которых будут получены сеянцы для создания орехоплодных плантаций данного вида.

Список литературы

1. Батыгина Т.Б. (1999) Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей. Физиология растений. 46(6): 884-898.
2. Белоруссова А.С., Третьякова И.Н. (2008) Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты. Онтогенез 39(2): 1-10.
3. Бутенко Р.Г. (1964) Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 146 с.
4. Ирошников А.И. (1974) Полиморфизм популяции кедра сибирского. В: Изменчивость древесных растений Сибири. Красноярск, с. 77–103.
5. Минина Е.Г., Ларионова Н.А. (1979) Морфогенез и проявление пола у хвойных. М.: Наука, 216с.
6. Третьякова И.Н. (1990) Эмбриология хвойных: физиологические аспекты. Новосибирск: Наука, 157 с.
7. Третьякова И.Н., Новоселова Н.В., Череповский Ю.Н. (2004) Особенности эмбрионального развития у кедра сибирского (*Pinus sibirica* Du Tour) с однолетним циклом развития женской шишки в горах Западного Саяна. Физиология растений 51(1): 134–141.
8. Третьякова И.Н., Ижболдина М.С. (2009) Индукция соматического эмбриогенеза у кедра сибирского. Лесоведение 5: 41-47.
9. Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Шуваев Д.Н. (2011) Соматический эмбриогенез и формирование клеточных линий в культуре *in vitro* у хвойных в Сибири. VII Международный Съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений- фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий». Материалы докладов. Ч. 2. Нижний Новгород, с. 703-704.
10. Arya S., Kalia R.K., Arya I.D. (2000) Induction of somatic embryogenesis in *Pinus roxburghii* Sarg. Plant Cell Reports 19: 775-780.
11. Becwar M.R., Nagmani R., Wann S.R. (1990) Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). Can. J. For. Res. 20: 810-817.

12. Bercetche J., Paques M. (1995) Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*). In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Jain S., Gupta P., Newton R., Eds. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: 269-285.
13. Carneros E., Celestino C., Klimaszewska K., Park Y.-S., Toribio M., Bonga J.M. (2009) Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 98: 165-178.
14. Garin E., Isabel N., Plourde A. (1998) Screening of large numbers of seed families of *Pinus strobus* L. for somatic embryogenesis from immature zygotic embryos. Plant Cell Rep. 18: 37–43.
15. Finer J.J., Kriebel H.B., Becwar M.R. (1989) Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). Plant Cell Rep. 8: 203-206.
16. Hakman I., Fowke L.C., von Arnold S. (1985) The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). Plant Sci. 38: 53-59.
17. Klimaszewska K., Park Y.S., Overton C., Mac Eacheron I., Bonga J.M. (2001) Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. in vitro cell. Dev. Biol.-Plant. 37: 392-399.
18. Klimaszewska K., Cyr D.R. (2002) Conifer somatic embryogenesis: I. Development. Dendrobiology 48: 31-39.
19. Laine E., David D. (1990) Somatic embryogenesis in immature embryos and protoplasts of *Pinus caribaea*. Plant Sci. 69: 215-224.
20. Lelu M.A., Klimaszewska K., Charest P.J. (1994) Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix*. Can. J. For. Res. 24: 100-106.
21. Lelu M.A., Bastien C., Drugeault A., Gouez M.L., Klimaszewska K. (1999) Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without plant growth regulators. Physiol. Plant. 105: 719–728.
22. Lelu-Walter M.A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. (2008) Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 92: 31–45.
23. Lelu-Walter M.A., Pagues L.E. (2009) Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix* x *eurolepis* and *Larix* x *marschlinsii*). Perspectives for breeding. Ann. For. Sci. 66 (1): 104.
24. Laine E., David A. (1990) Somatic embryogenesis in immature embryos and protoplasts of *Pinus caribaea*. Plant Sci. 69: 215–224.
25. MacKay J.J., Becwa M.R., Park Y.-S., Corderro J.P., Pullman G.S. (2006) Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding. Tree Genet. Genom. 2: 1–9.
26. Nagmani R., Diner A.M., Sharma G.C. (1993) Somatic embryogenesis in longleaf pine (*Pinus palustris*). Can. J. For. Res. 23: 873-876.
27. Newton R.J., Marek-Swize K.A., Magallanes-Cedeno M.E., Dong N., Sen S., Jain S.M. (1995) Somatic embryogenesis in Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.). In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Jain S., Gupta P., Newton R., Eds. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: 183-195.

28. Niskanen A-M., Lu J., Seitz S., Keinonen K., von Weissenberg K., Pappinen A. (2004) Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in *Scots pine* (*Pinus sylvestris*). Tree Physiology 24: 1259–1265.
29. Park Y.S., Pond S.E., Bonga J. (1993) Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control, culture treatment effects, and implications for tree breeding. Theor. Appl. Genet. 86: 427-436.
30. Park Y.S., Bonga J.M., Cameron S.I., Barrett J.D., Forbes K., De-Verno L.L., Klimaszewska K. (1998) Somatic embryogenesis in jack pine (*Pinus banksiana* Lamb). In: Somatic embryogenesis in woody plants. Jain S., Gupta P., Newton R., Eds. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: 491–504.
31. Park Y.-S., Lelu-Walter M.A., Harvengt L., Trontin J.F., MacEacheron I., Klimaszewska K., Bonga J.M. (2006) 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. 86: 87-101.
32. Percy R.E., Klimaszewska K., Cyr D.R. (2000) Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of western white pine. Can. J. For. Res. 30: 1867–1876.
33. Pullman G.S., Skryabina A. (2007) Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. Plant Cell Rep. 26: 873–887.
34. Salajova T., Jasik J., Kormutak A. (1995) Somatic embryogenesis in *Pinus nigra* Arn. Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Jain S., Gupta P., Newton R., Eds. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 207-220.
35. Stasolla C., Yeung E. (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 15–35.
36. Smith D.R. (1996) Growth medium, US Pat., p. 5, 565, 355
37. Tretyakova I.N., Barsukova A. (2010) Somatic embryogenesis of Siberian larch. Abstract of conference «Advances in somatic embryogenesis of trees and its application for the future forests and plantations», August 19-21, Suwon, Korea, p. 80.
38. von Arnold S., Hakman I. (1988) Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA) J. Plant Physiol. 132: 164–169.

Formation of Callus and Induction of Somatic Embryos *in vitro* Culture in *Pinus sibirica* Du Tour

Iraida N. Tretyakova[a], Elena V. Voroshilova[b], Denis N. Shuvaev[b] and Anastasya S. Lukina[a]

[a] V.N. Sukachev Institute of Forest SB RAS, 50/28 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia

[b] Siberian Federal University, 79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia

In culture in vitro nonembriogenic callus was inducted from immature zygotic embryos of seeds of Siberian pine trees (Pinus sibirica), growing in natural stands of West Sayan and in a clonal plantation. The active callus development goes in explants hybrid seeds, getting as results of control pollination of clones by pollen of Siberian pine trees with annual cycle development of female cones. Cytological study shows that the strong elongation in hypocotyl cells goes at the stage of callus induction. Only explants of embryo seeds of some clones, which were pollination of pollen trees-accelerate reached the stage of proliferation and formed embrygenic mass. Globules of somatic embryos and embryonal tubes are developed from embryonal initiales.

Keywords: Siberian pine, pollen of annual cedar, zygotic embryos, hybrid embryos, callus, embryogenic mass, somatic embryos.