

## ПЕРСПЕКТИВЫ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ХВОЙНЫХ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ЧЕРЕЗ СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ

И.Н. Третьякова, Е.В. Ворошилова, Д.Н. Шуваев, М.Э. Пак

Учреждение Российской академии наук Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН  
660036 Красноярск, Академгородок, 50; e-mail: [culture@ksc.krasn.ru](mailto:culture@ksc.krasn.ru)

Эксперименты по культивированию незрелых зиготических зародышей сибирских видов хвойных (*Larix sibirica*, *L. gmelinii*, *L. sukaczewii*, *Pinus sibirica*, *P. pumila*, *Picea ajaensis*) были проведены на средах LV, DCR и AI с разной концентрацией гормонов и в разном соотношении их друг с другом. Для индукции эмбриогенного каллуса каждый вид нуждался в оптимизации среды, дополненной глютамином, гидрализатом казеина и аскорбиновой кислотой. Активная пролиферация эмбриональной массы (ЭМ) шла на тех же средах с уменьшенной концентрацией цитокининов. Соматические зародыши вызревали на базальной среде с АБК и ПЭГ. Несмотря на видовую специфику, морфогенез эмбриогенных структур шел по одной схеме: растяжение соматических клеток, и их асинхронное деление, образование глобулярных и торпедообразных зародышей и формирование их биполярной структуры. Экспланты только единичных донорских растений формировали эмбриогенный каллус. Успех соматического эмбриогенеза зависел от стадии развития экспланта, компонентов среды, гормональной регуляции и генотипа дерева.

**Ключевые слова:** соматический эмбриогенез, питательная среда, гормоны, *Larix*, *Pinus sibirica*

Experiments of culturing the immature isolated embryos of Siberian coniferous species (*Larix sibirica*, *L. gmelinii*, *L. sukaczewii*, *Pinus sibirica*, *P. pumila*, *Picea ajaensis*) were carried out on media LV, DCR AI and with different hormone concentrations and their different proportions. For induction of embryogenic callus every species needs the optimized medium supplemented with L-glutamine, casein hydrolysate, ascorbate acid and hormones. The active proliferation of embryonal mass (EM) is observed on the same medium with reduced concentration of cytokinins. The somatic embryos from embryonal mass mature on basal medium with ABA and PEG. In spite of species specificity the morphogenesis of embryogenic structures had the same scheme: elongation of somatic cells and its, assimetric division. development of globular, torpedo and bipolar somatic embryos. However, not all donor-plants of coniferous species can form morphogenic callus and somatic embryos. The success of the somatic embryogenesis is due to the stage of explant development, medium components, hormonal regulation and tree genotypes

**Key words:** somatic embryogenesis medium, hormones, *Larix*, *Pinus sibirica*

### ВВЕДЕНИЕ

Соматический эмбриогенез - уникальная способность растительных клеток передавать имеющуюся у них генетическую информацию и давать начало целым организмам является одним из перспективных направлений в лесной биотехнологии микроклонального размножения в культуре *in vitro* за последние 20 лет. При этом соматические клетки растений становятся на путь эмбриогенеза и формируют массовые растения, идентичные материнскому генотипу.

К настоящему времени регенерация растений через соматический эмбриогенез у хвойных получена у 16 видов рода *Pinus*, у 11 видов рода *Picea*, у 4 видов и 2 гибридов рода *Abies*, у 6 видов и гибридов рода *Larix*, а также у *Pseudotsuga menziesii* (Klimaszewska, Суг, 2002). Для индукции соматического эмбриогенеза у хвойных используют мегагаметофиты, зрелые и незрелые зародыши, отдельные органы (семядоли и гипокотиль), хвоя молодых растений (Lelu et al., 1994; Lelu-Walter, Pagues, 2009; Stasolla, Yeung, 2003; Carneros et al., 2009), а также сегменты вегетативных побегов взрослых деревьев (Malabadi, Van Staden, 2005).

Исследования по соматическому эмбриогенезу у хвойных видов в России начали проводиться в

начале XXI века в Институте леса СО РАН (г. Красноярск). Были индуцированы соматические зародыши у лиственницы сибирской (Белоруссова, Третьякова, 2008), лиственницы Гмелина и лиственницы Сукачева, кедра сибирского (Третьякова, Ижболдина, 2009). Выявлено, что первым цитологическим маркером соматического эмбриогенеза у лиственницы сибирской является растяжение соматических клеток зиготического зародыша, их неравное деление и образование инициальных клеток и клеток трубок. В дальнейшем инициальные клетки делились и формировали глобулы соматических зародышей (Белоруссова, Третьякова, 2008).

Однако, несмотря на активные исследования по соматическому эмбриогенезу у хвойных за рубежом и в России (Красноярск), регенерация растений путем соматического эмбриогенеза все еще остается не решенной для ряда видов. Критическим моментом является переключение соматических клеток на путь соматического эмбриогенеза и созревание соматических зародышей, а также получение полноценных зародышей, способных к прорастанию и продуцированию растений.

Цель настоящего изучения заключалась в оптимизации протоколов получения соматических зародышей и растений у видов хвойных, произрастающих на территории Сибири и выявление механизмов индукции и регуляции соматического эмбриогенеза у представителей данных видов.

## ОБЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служили 25 деревьев лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb), 10 деревьев лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* Rupr.) и 4 дерева лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Dylis), произрастающих на территории Хакасии и дендрария Института леса СО РАН (г. Красноярск), а также 13 деревьев сосны сибирской, кедра сибирского (*Pinus sibirica* Du Tour), произрастающих в естественном древостое Западного Саяна и 7 клонов (каждый включает 12-15 рамет), произрастающих на клоновой прививочной плантации Западно-Саянского опытного лесного хозяйства. Кроме того, в качестве объекта исследования использовали деревья кедрового стланика *P. pumila*, (Rall Regel) из естественных насаждений из окрестностей поселка Новая Чара Кадырского района Читинской области и ели сибирской и ели аянской из дендрария Погорельского ОЭП.

На клонах кедра сибирского проводили опыты по контролируемому опылению, с использованием в качестве опылителей пыльцы четырех плюсовых деревьев (№ 492, 277, 1кш и 2кш) и двух уникальных деревьев с однолетним развитием женской шишки (№106 и 107).

В качестве материала для индукции соматического эмбриогенеза были взяты семена, зиготические зародыши которых находились на стадии развития глобулы и семядолей. Собранные семена очищали от покровных чешуй, поверхностно стерилизовали 5 % спиртовым раствором йода в течение 3 минут. После 3-х кратной промывки в стерильной дистиллированной воде, мегагаметофиты обрабатывали перекисью водорода в течение 5-10 минут. Зародыши извлекали из мегагаметофитов в стерильных условиях, помещали на увлажненную фильтровальную бумагу в чашках Петри и затем переносили на питательную среду.

**Индукция эмбриональной массы** Для инициации эмбриогенного каллуса у видов лиственницы использовали минеральные основы базовых сред АИ (патент № 2010114891), у кедра сибирского и кедрового стланика  $\frac{1}{2}$  LV, ели аянской DCR с добавлением мезоинозита (0,1 – 1 г/л), аскорбиновой кислоты (0,4 г/л), казеина (1 г/л), L-глутамин (0,5 г/л), сахарозы (30 г/л) и агара (7 г/л). В качестве регуляторов роста использовали 2,4-Д (2 -3 мг/л) и БАП (1 мг/л). рН среды приводили к 5.8 до автоклавирования при 121°C, 110 кПа в течение 20 мин. В каждой чашке Петри культивировали 5 зародышей на 20 мл индукционной среды в темноте при 25±1°C.

**Пролиферация эмбриональной массы** Для пролиферации эмбриогенного каллуса применяли указанные базовые среды содержащие 2,4-Д (2 мг/л), БАП (0,5 мг/л) и сахарозу (20 г/л). Культуры инкубировали в темноте при температуре 24 ± 1°C. Пересадки на свежую питательную среду проводили каждые 14 дней.

**Предсозревание соматических зародышей** Через 7 дней после субкультивирования на пролиферационной среде, кусочки активно растущей эм-

бриональной массы, весом 100-300 мг, переносили на безгормональную базовую среду с активированным углем (10 г/л) и повышенным содержанием сахарозы (34 г/л), для остановки пролиферации и перехода соматических зародышей к вызреванию. Экспланты культивировали в течение 1 недели на свету малой интенсивности (10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) при 16ти часовом фотопериоде.

**Созревание соматических зародышей** Эксперименты по созреванию соматических зародышей лиственницы выполняли на базовой среде АИ, содержащей сахарозу (40-60 г/л), АБК (40-60  $\mu\text{M}$ ), ИМК (1  $\mu\text{M}$ ) и ПЭГ (5-10 %) в различных вариациях. В качестве желирующего агента использовали Gelrite (3-4 г/л). Культивирование осуществляли на свету малой интенсивности (20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) при 16ти часовом фотопериоде, при 25±1°C. Регуляторы роста растений (АБК и ИМК) и L-глутамин стерилизовали фильтрованием и добавляли в охлажденную питательную среду после автоклавирования.

**Прорастание соматических зародышей** Для прорастания соматических зародышей использовали базовую питательную среду свободную от растительных регуляторов роста, дополненную активированным углем (10 г/л) и сахарозой (34 г/л). Соматические зародыши считали проросшими, как только наблюдалось появление корешка. Полученные растения-регенеранты помещали в увлажненную экочуву (песок:вемикулит:торф=1:1:1).

**Цитологический анализ** Для проведения цитологического анализа использовали давленные препараты. Для приготовления давленных препаратов экспланты помещали на предметное стекло и 1-2 мин выдерживали в красителе (сафранин с добавлением метиленового синего). Далее добавляли глицерин, и накрывали препарат покровным стеклом.

Просмотр микроскопических образцов осуществляли на микроскопе МИКМЕД-6. Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам при помощи Microsoft Excel. Для оценки достоверности полученных данных использовался однофакторный дисперсионный анализ. Морфологические изменения фиксировались цифровой фотокамерой Fudjifilm.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Соматический эмбриогенез видов лиственницы

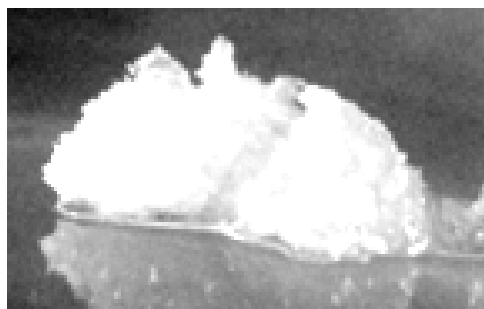
**Индукция эмбриогенного каллуса (ЭК) и пролиферация эмбриональной массы (ЭМ)**

При введении в культуру *in vitro* эксплантов зародышей семян видов лиственницы (на глобулярной стадии развития, на стадии инициации семядолей, стадии развитых семядолей и зрелых зародышей), наиболее интенсивно образование эмбриогенного каллуса происходило на стадии развитых семядолей (96-98 %). Морфологические наблюдения за формированием ЭК показали, что его индукция происходила на 8-14-е сутки культивирования. Образование ЭК происходило равномерно по всей поверхности экспланта или в области корешка и

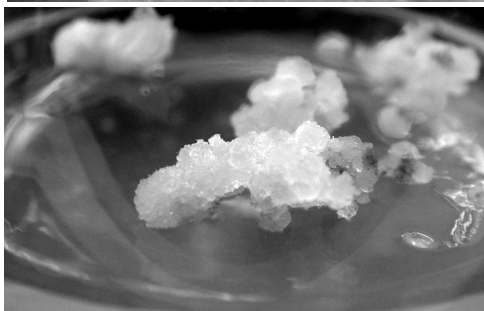
гипокотыля. Полученный каллус имел белый цвет, рыхлую бугристую структуру (рис. 1а).

Активная пролиферация ЭК была обнаружена только у лиственницы Сукачева генотипа С<sub>нп1</sub> на среде АИ у 18 % эксплантов (рис. 2) У данного генотипа лиственницы Сукачева были получены четыре клеточные линии, в которых шло активное образование соматических зародышей:

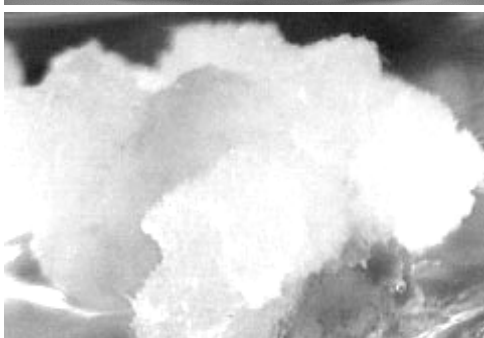
- клеточная линия 1 (08-03-00-01) – получена в 2008 году на среде АИ в результате свободного опыления лиственницы Сукачева (С<sub>нп1</sub>);
- клеточные линии 2 (09-03-00-02), 3 (09-03-00-03) и 4 (09-03-00-04) - получены в 2009 году на среде АИ в результате свободного опыления лиственницы Сукачева (С<sub>нп1</sub>).



а



б



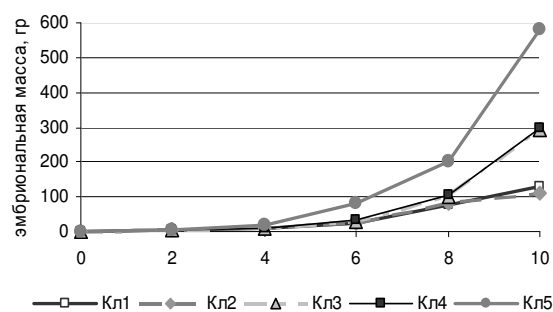
в

Рисунок 1 - Эмбрионные каллусы а – лиственницы Сукачева, б – кедр сибирского, в – кедрового стланика

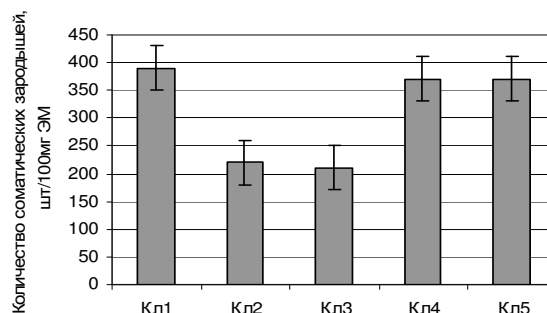
Кроме того, в 2009 г. на среде АИ была получена гибридная клеточная линия 5 в результате опыления лиственницы Сукачева пыльцой лиственницы сибирской.

Клеточные линии отличались по пролиферационной активности. Вес ЭМ у лиственницы Сукачева от одного экспланта Кл1 через 4 недели пролиферации достиг – 12,2 г, у Кл3 – 16,5 г (рис. 3). Интенсивность прироста ЭК лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина была значительно ниже: у лиственницы Гмелина от  $0,165 \pm 0,005$  до  $0,467 \pm 0,005$  у разных деревьев, у лиственницы

сибирской от  $0,150 \pm 0,005$  до  $0,350 \pm 0,005$ . Через шесть недель культивирования вес ЭМ лиственницы Сукачева превышал массу ЭК лиственницы Гмелина более чем в 77 раз. Спада пролиферационной активности за 36 месяцев культивирования у лиственницы Сукачева не наблюдалось. Число соматических зародышей в 100мг пролиферирующей эмбриональной массы лиственницы Сукачева варьировало (рис. 3) от 210шт ЭМ (Кл3) до 390 шт. ЭМ (Кл1). Число соматических зародышей в эмбрионных каллусах у лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина было значительно ниже: в 185 раз ( $1 \pm 1,6$  у лиственницы Гмелина) и в 5 раз ( $75 \pm 5,6$  у лиственницы сибирской).



А



Б

Рисунок 2 - Клеточные линии (Кл) у лиственницы в культуре in vitro. А – число соматических зародышей, Б - эмбрионная масса, гр.

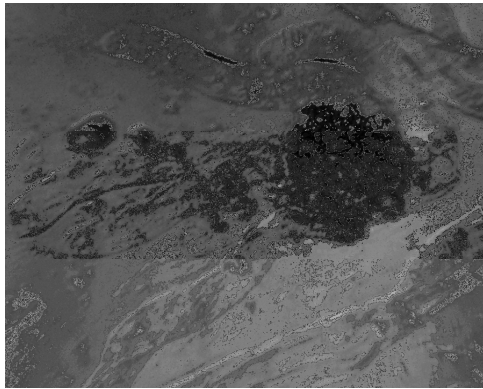
#### Цитоэмбриологический контроль соматического эмбриогенеза

Цитоэмбриологический контроль соматического эмбриогенеза показал, что формирование каллуса у всех исследуемых видов лиственницы идет одинаково и начинается с удлинения клеток экспланта и их неравного деления. Именно неравное деление клеток является ключевым моментом, запускающим весь процесс соматического эмбриогенеза. В результате, такого деления происходит образование длинной эмбриональной трубки (длиной 200 мкм) и прилегающей к ней на одном из концов эмбриональной инициали. Подобно зиготическому эмбриогенезу клетки эмбриональной инициали активно делятся и формируют глобулярную структуру зародыша (рис. 3).

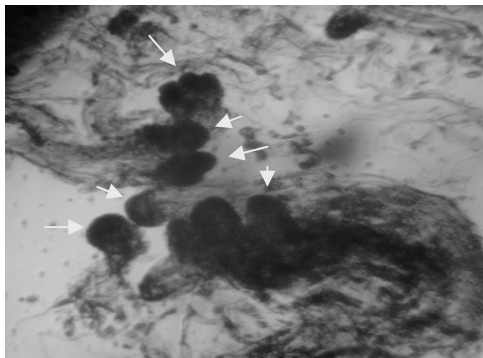
#### Созревание соматических зародышей

Введение ЭК лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина на питательные среды для созре-

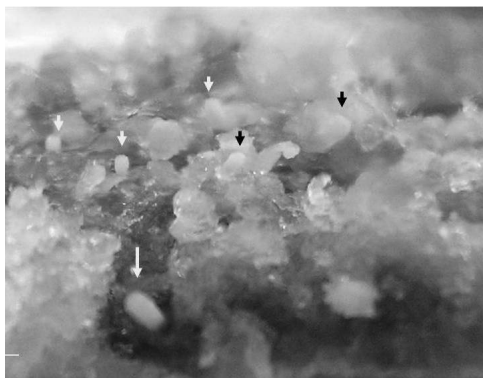
вания соматических зародышей не привело к формированию зрелых зародышей. Использование среды с небольшой концентрацией АБК (5 мг/л), приводило к потере эмбриогенной способности и переходу ЭК к автотрофному типу питания - культуры приобретали зеленую окраску. На питательных средах с более высокими концентрациями АБК (15-24 мг/л), созревания соматических зародышей также не происходило.



а



б



в

**Рисунок 3 - Формирование каллуса у лиственницы: а – формирование эмбриональных глобул и трубок, б – торпедообразные структуры зародышей; в – зрелые соматические зародыши**

Таким образом, формирования зрелых соматических зародышей у лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина на используемых средах, рекомендуемых зарубежными авторами для созревания соматических зародышей лиственницы европейской и ее гибридов (Lelu-Walter et al., 2009), не происходило.

Созревания соматических зародышей лиственницы Сукачева проводили на среде АИ с использованием различных концентраций АБК, ПЭГ,

Gelrite и сахарозы. При этом на среде, содержащей АБК (16 мг/л), повышенное содержание сахарозы (60 г/л) и желирующего агента (7 г/л Gelrite), развитие соматических зародышей не происходило. Наблюдалось иссушение ЭМ, соматические зародыши не переходили к созреванию и погибали. Применение в качестве осмотического агента ПЭГ, оказалось более продуктивным. Однако низкие его концентрации (5-7,5 %) все же были малоприспособными для достижения созревания соматических зародышей, в этом случае наблюдались обводнение и деградация ЭМ, соматические зародыши распадались на отдельные клетки.

Оптимальной для развития соматических зародышей оказалась среда, содержащая 60 мкМ АБК, 10 % ПЭГ, 40 г/л сахарозы и 4 г/л Gelrite. На данной среде уже через три-четыре недели культивирования происходило формирование семядольных соматических зародышей. Эмбриональная масса к этому времени уже состояла из глобулярных зародышей, а также зародышей на стадии торпеды, длина которых достигала 400 мкм. Через две недели культивирования соматические зародыши увеличивались в размерах до 0,7-0,4 мм. Происходили закладка и формирование семядольного кольца. На 50 сутки культивирования на среде для созревания соматические зародыши достигали размера 1,1 – 1,5 мм, имели хорошо выраженную биполярную структуру тела.

Сроки появления зрелых соматических зародышей сильно варьировали в зависимости от экспланта. Так, для созревания соматических зародышей у Кл1 требовалось 38-41 день, для Кл2 – 48-55 дней и для Кл3 – 60 и более дней. У Кл4 созревания соматических зародышей даже спустя три месяца культивирования на среде МА не происходило.

#### *Проращение соматических зародышей*

Соматические зародыши с хорошо развитыми семядолями переносили на среду для проращения (АИ базового состава, без растительных регуляторов роста с добавлением активированного угля (10 мг/л)). Через 7-10 дней культивирования происходило удлинение гипокотыля и развитие семядолей. Еще через несколько дней наблюдалось развитие корешка (на свету гипокотиль и корешок приобретали красный оттенок). Однако в 90 % случаев нормального развития растений не происходило – гипокотиль изгибался или утолщался, а вместо корня формировался каллус. Такие проростки были нежизнеспособными и погибали.

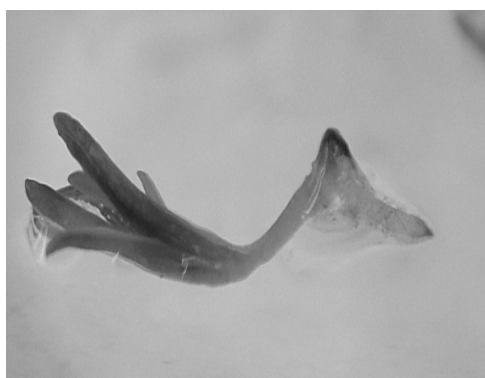
Снижение концентрации макро-, микроэлементов и железа (в два раза), а также исключение источников органического азота и витаминов положительно сказывались на проращении соматических зародышей - в 70 % происходило нормальное развитие соматических зародышей в проростки. На данной среде на пятые-седьмые сутки культивирования отмечены удлинение гипокотыля и появление корешка (рис. 4 а).

Появление эпикотыля происходило через две-три недели культивирования на среде для проращения. Соматические зародыши с хорошо развитым

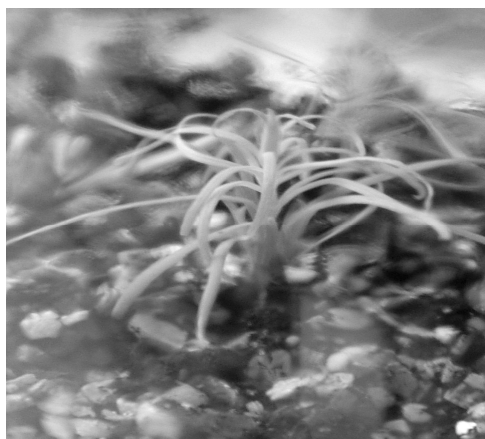
корешком и эпикотилем считали полноценными растениями и переносили в экочуву (рис. 4 б). Таким образом, впервые были получены пять клеточных эмбрионных линии лиственницы Сукачева и ее гибрида с лиственницей сибирской, способных продуцировать массовые соматические зародыши.

*Соматический эмбриогенез кедр сибирского*

При введении в культуру незрелых изолированных зародышей сосны сибирской на среду 1/2 LV наиболее активное формирование каллуса (75-80 %), так же как у видов лиственницы, шло на предсемядольной и более поздних стадиях развития, когда длина зиготического зародыша составляла 3-4мм, т.е. зародыш занимал 1/2 длины коррозийной полости (конец июля - начало августа).



а



б

**Рисунок 4 - Соматический проросток лиственницы Сукачева а- на пятые-седьмые сутки, б- через 2-3 недели культивирования**

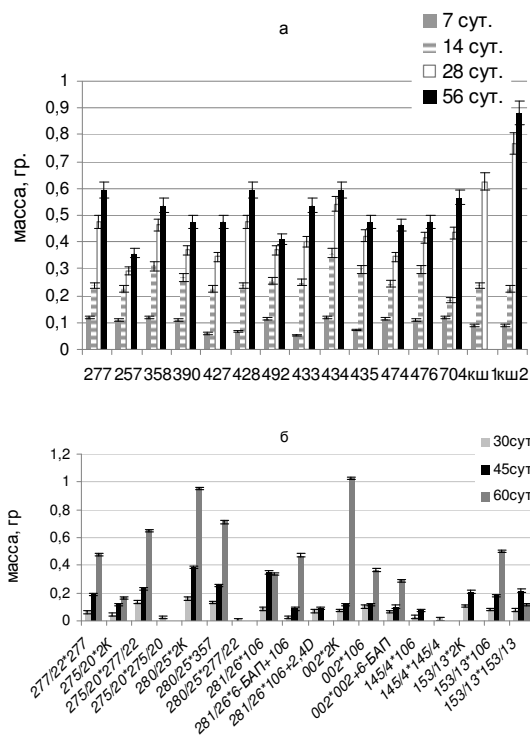
Наблюдения за динамикой роста каллуса на среде LV показали, что процессы инициации и пролиферации каллуса у зародышей семян деревьев сосны сибирской, произрастающих в естественном древостое и на клоновой плантации идут неодинаково (рис. 5).

Через 1 месяц пролиферации вес эмбрионного каллуса у большинства деревьев сосны сибирской из естественного древостоя составил от 0,3 г до - 0,76 г., на клоновой плантации.

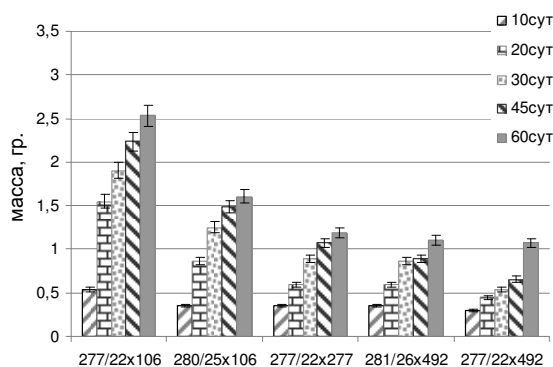
Введение в культуру *in vitro* зародышей гибридных семян полученных в результате контролируемого опыления двух (из семи) клонов сосны сибирской пыльцой дерева акселерата с однолетним циклом развития женской шишки позволило получить активно растущий ЭК. Вес такого каллуса

в 5-6 раз превышал вес ЭК деревьев из естественного древостоя (рис. 6).

Цитологический контроль формирующегося каллуса сосны сибирской показал, что на 7-10 сутки культивирования происходило удлинение соматических клеток, их ассиметричное деление и образование глобул соматических зародышей. Также как у видов лиственницы, у сосны сибирской на среде LV был получен каллус, однако дальнейшее развитие эмбрионных структур не происходило.



**Рисунок 5 - Динамика роста каллусов у зародышей семян кедр сибирского: а – естественный древостой, б – клоновая плантация**



**Рисунок 6 - Динамика роста каллусов, полученного из эксплантов зародышей семян кедр сибирского клонов в результате контролируемого опыления на клоновой прививочной плантации (2007 г.)**

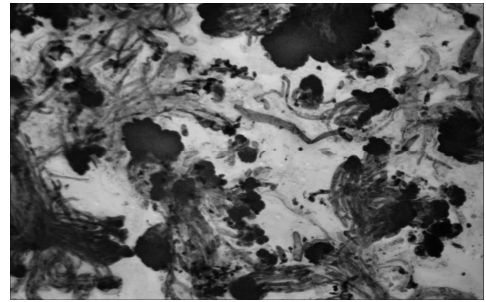
**Соматический эмбриогенез кедрового стланика** Культивирование семядольных зародышей кедрового стланика на среде 1/2 LV показало, что каллусогенез наблюдался у 90-94 % эксплантов, из которых только 48 % характеризовались, как эмбрионные каллусы (рис. 7). Через 2-5 мес. куль-

тивирования активная пролиферация происходила у 1-3% эксплантов. Клеточные линии имели характеристики эмбрионально-суспензорной масс (ЭМ) и состояли из соматических зародышей на стадиях от

ранней глобулы до предсемядольной стадии (рис. 7). В настоящее время проводится подбор условий и технологических приемов по созреванию и прорастанию соматических зародышей.



а



б

Рисунок 7 - Формирование каллуса у кедрового стланника

**Соматический эмбриогенез или аянской**

Исследования показали, что у эксплантов ели аянской (2 генотипа) на среде DCR происходило формирование эмбриогенного каллуса. Активная пролиферация ЭК была обнаружена у эксплантов генотипа Ea2. Цитологический анализ показал, что эмбриогенный каллус состоял из эмбрионально-суспензорной массы и в нем образовывались глобулярные и торпедообразные соматические зароды-

ши. Опыты по культивированию клеточных линий продолжаются. Образование эмбриогенного каллуса и развитие соматических зародышей у видов *Larix* и *Pinus* в основном идет по схеме, описанной для других видов хвойных (von Arnold, Hakman, 1988; Lelu et al., 1994; Klimaszewska et al., 2001; Stasolla, Yeung, 2003; Lelu-Walter, Pagues, 2009). Соматические зародыши проходят фазу инициации, пролиферации, созревания и прорастания.

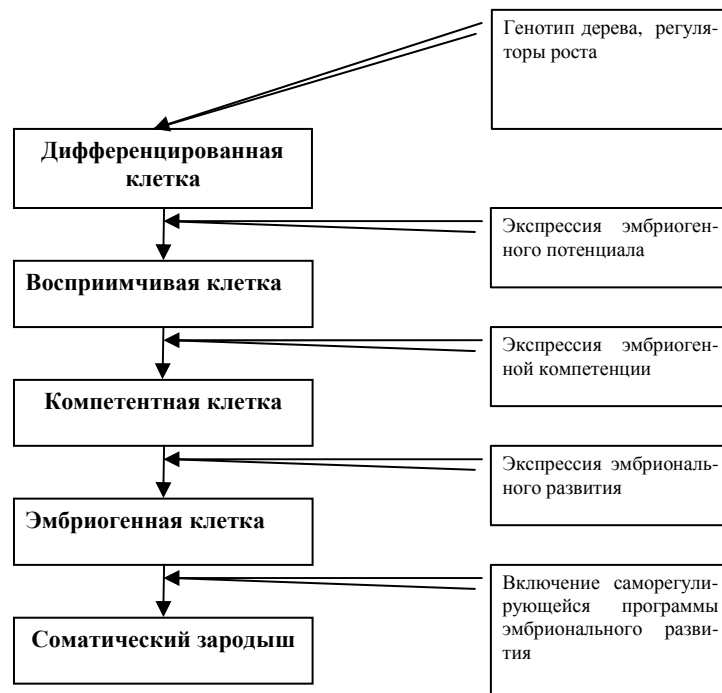


Рисунок 8 - Модель инициации соматического эмбриогенеза у хвойных

На основании проведенных исследований впервые была построена цитофизиологическая модель индукции соматического эмбриогенеза у хвойных видов. Согласно данной модели, только единичные деревья-доноры с высоким эмбриогенным потенциалом обладают способностью запускать процесс соматического эмбриогенеза. Первая морфогенетическая реакция клеток эксплантов, введенных в культуру, идет под действием гормонов - происходит экспрессия эмбриогенного потенциала и клетки становятся восприимчивыми, что выражается в их

удлинении. Следующим этапом является экспрессия эмбриогенной компетенции – клетки подвергается асинхронному делению с образованием инициалей и клеток – трубок. Далее, осуществляется экспрессия эмбриогенного развития, которое проявляется в том, что эмбриогенные клетки (инициали) подвергается многочисленным делениям и формируют глобулы зародышей. На данном этапе происходит включение саморегулирующейся программы эмбрионального развития - идет формирование соматических зародышей.

Таким образом, у представителей сибирских видов хвойных путем подбора состава питательных сред на клеточном уровне были получены морфогенные каллусы различного генетического происхождения, способные продуцировать эмбрионально-суспензорную массу, в которой формировались соматические зародыши и растения.

Соматический эмбриогенез проходил под строгим генетическим контролем. Только экспланты зародышей семян, полученные от донорских материнских деревьев с высоким эмбриогенным потенциалом формировали эмбриогенный каллус, соматические зародыш и растения.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- 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.
- Третьякова, И.Н. Индукция соматического эмбриогенеза у кедра сибирского /И.Н. Третьякова, М.С. Ижболдина // Лесоведение. - 2009. - Т. 5. - С. 41-47.
- Бесвар, М.Р. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*) / M.R. Beswar, R. Nagmani, S.R. Wann // Can. J. For. Res. - 1990 - V. 20. - P. 810-817.
- Cairney, J. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis / J. Cairney, G. Pullman // New phytologist. - 2007. - V. 176. - P. 511-536.
- Carneros, E. Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis / E. Carneros, C. Celestino, K. Klimaszewska, Y.-S. Park, M. Toribio, J.M. Bonga // Plant Cell Tiss. Organ Cult. - 2009. - V. 98. - P. 165-178.
- Hakman, I. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce) / I. Hakman, L.C. Fowke, S. Von Arnold // Plant Sci. - 1985. - V. 38. - P 53-59.
- Klimaszewska, K. Conifer somatic embryogenesis: I. Development/ K. Klimaszewska, D.R. Cyr // Dendrobiology. - 2002. - V. 48. - P 31-39.
- Klimaszewska, K. Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. / K. Klimaszewska, Y.-S. Park, C. Overton, I. MacEachern, J. M. Bonga // In vitro cell. Dev. Biol.-Plant. - 2001. - V. 37 - P. 392-399.
- Lelu, M.-A. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix* / M.A. Lelu, K. Klimaszewska, P.J. Charest // Can. J. For. Res. - 1994. - V. 24. - № 1. - P. 100-106.
- Lelu-Walter, M-A. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x marschlinsii*). Perspectives for breeding / M-A. Lelu-Walter, L.E. Paques // Ann. For. Sci. - 2009. - V. 66. - P. 104.
- Malabadi, R.B. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patul* / R. B. Malabadi, J. Van Staden // Tree Physiology. - 2005. - V. 25. - P. 11-16.
- Park, Y.-S. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations / Y.-S. Park // Ann. For. Sci. - 2002. - V. 59. - P. 651-656.
- Park, Y.-S. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster* and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France /Y.-S. Park, M.-A. Lelu-Walter, L. Harvenget et al. // Plant Cell Tiss. Organ. Cult.- 2006.-V. 86.- P. 87-101.
- Stasolla, C. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology / C. Stasolla, L. Kong, E.C. Yeung, T.A. Thorpe // In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. - 2002. - V. 38. - P. 93-105.
- Stasolla, C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality / C. Stasolla, E.C. Yeung // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. - 2003. - V. 74. - P. 15-35.
- Von Arnold, S. Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA) / S. Von Arnold, I. Hakman // J. Plant Physiol. - 1988. - V. 132 - P. 164-169.

Поступила в редакцию 16 декабря 2011 г.  
Принята к печати 03 февраля 2011 г.