

ИНИЦИАЦИЯ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ЛИСТВЕННИЦЫ ЧЕКАНОВСКОГО

Н. С. Помыткин, М. Э. Пак, А. М. Шемберг, И. Н. Третьякова

Институт леса им. В. Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук –
 обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН (ИЛ СО РАН)
 Российская Федерация, 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, 50/28

Аннотация. Размножение хвойных с помощью технологии соматического эмбриогенеза является в настоящий момент перспективной технологией и уже применяется для ряда видов. Однако, для лиственницы Чекановского (*Larix czekanowskii*), которая является гибридом лиственницы сибирской (*Larix sibirica*) и лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii*), эта технология до сих пор не применялась. Учитывая, что виды рода *Larix* характеризуются неравномерностью урожаев и низким качеством семян, технология размножения лиственницы Чекановского через соматический эмбриогенез является актуальной. Целью данной работы является инициация эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) лиственницы Чекановского. Шишки лиственницы Чекановского собирали в третьей декаде июля недалеко от г. Северобайкальск. Для инициации эмбрионально-суспензорной массы зародыши семян лиственницы Чекановского помещали на питательные среды DCR, MSGm и АИ. Образование каллуса при культивировании, наблюдалось у 13,1 % эксплантов, что меньше, чем у лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина. Из числа образовавших каллус, 42,9 % эксплантов образовали удлинённые клетки, 14,3 % образовали эмбрионально-суспензорную массу. Лиственница Чекановского уступает по проценту образования ЭСМ другим видам лиственницы: сибирской, Гмелина, западной (*Larix decidua*) и её гибридов с лиственницей Кемпфера (*Larix leptolepis*), лиственнице принца Рупрехта (*Larix principis-rupprechtii*).

Ключевые слова: соматический эмбриогенез, лиственница Чекановского, культура *in vitro*.

Conifers of the boreal area. 2026, Vol. XLIV, No. 3, P. 71–74

INITIATION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN CZEKANOWSKI'S LARCH

N. S. Pomytkin, M. E. Park, A. M. Shemberg, I. N. Tretyakova

Sukachev Forest Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences –
 a separate division of the Federal Research Center «Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS»
 50/28, Akademgorodok str., 660036, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Reproduction of conifers using somatic embryogenesis is currently a promising approach and is already applied for a number of species. However, for Czekanowski's larch (*Larix czekanowskii*), which is a natural hybrid between Siberian larch (*Larix sibirica*) and Dahurian larch (*Larix gmelinii*), this biotechnology has not yet been applied. Considering that species of the genus *Larix* are characterized by irregular yields and low seed quality, the development of a propagation method for Czekanowski's larch via somatic embryogenesis is highly relevant. The aim of this study was to initiate embryonal-suspensor mass (ESM) in Czekanowski's larch. Cones were collected in the third decade of July near the city of Severobaikalsk. To initiate ESM, immature zygotic embryos of Czekanowski's larch were placed on DCR, MSGm, and AI nutrient media. Callus formation during culturing was observed in 13.1 % of explants, which is lower than in Siberian larch and Dahurian larch. Of the explants that formed callus, 42.9 % developed elongated cells and 14.3 % produced ESM. Czekanowski's larch shows a lower percentage of ESM formation compared to other larch species: Siberian larch, Dahurian larch, European larch (*Larix decidua*), its hybrids with Japanese larch (*Larix leptolepis*), and Prince Rupprecht's larch (*Larix gmelinii* var. *principis-rupprechtii*).

Keywords: somatic embryogenesis, Czekanowski's larch, *in vitro* culture.

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология соматического эмбриогенеза имеет большое значение для лесовыращивания, так как позволяет массово размножать хозяйственно ценные генетически тестированные генотипы, в том числе устойчивые к патогенам. С помощью этой технологии можно сохранять генетические ресурсы видов хвой-

ных на долгие годы. В России биотехнология клонирования хвойных через соматический эмбриогенез была разработана и применена для видов лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина – основных лесообразователей Сибири [1; 2]. Лиственница сибирская и лиственница Гмелина, занимают обширный ареал и обладают чрезвычайно высокой пластично-

стью, отличающей их от других представителей семейства *Pinaceae*. Этот признак связан с периодическим сбрасыванием хвои, переключением брахибластов на генеративный путь развития и, наоборот, генеративных структур на спорофитный путь развития, наличием толстой оболочки, окружающей пыльцевое зерно, не позволяющей пыльце прорасти при неблагоприятных условиях, отсутствием органического покоя у генеративных и вегетативных органов в зимний период, и, в целом, большим морфогенетическим потенциалом, позволяющим видам лиственницы адаптироваться к неблагоприятным экологическим факторам [3].

Вместе с тем, виды лиственницы характеризуются неравномерностью урожаев в многолетнем цикле и низким качеством семян, и даже полным отсутствием их в отдельные неурожайные годы [4; 5; 6].

Между лиственницей сибирской (*Larix sibirica*) и лиственницей Гмелина (*Larix gmelinii*) был описан гибрид – лиственница Чекановского (*Larix czekanowskii*) [7]. Этот гибрид характеризуется промежуточными значениями большинства признаков лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина [6]. Выявлено, что в степных условиях деревья лиственницы Чекановского растут быстрее, чем лиственница Гмелина [8].

Биотехнология соматического эмбриогенеза позволит размножить гибридную лиственницу Чекановского без сложных программ контролируемого опыления. Как правило, введение в культуру лиственницы с наибольшей эффективностью производится с использованием в качестве экспланта незрелых соматических зародышей [1; 9]. Экспланты лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина были введены в культуру *in vitro* с использованием сред 1/2 MS MSG/MSGm, АИ [1; 10]. При этом образование эмбриогенных культур у лиственницы Гмелина значительно уступало лиственнице сибирской [1]. Исследования по изучению способности к соматическому эмбриогенезу лиственницы Чекановского отсутствуют.

Целью данной работы является введение лиственницы Чекановского в культуру *in vitro* для инициации соматического эмбриогенеза (эмбрионально-суспензорной массы).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Деревья лиственницы Чекановского произрастают в республике Бурятия, в окрестностях г. Северобайкальск, на мысе Лударь и у Большого Слюдяного озе-

ра (Республика Бурятия). В третьей декаде июля (24.07.2025) с деревьев лиственницы Чекановского были собраны шишки. Шишки хранили в условиях холодильной камеры при температуре +4 °С. Зародыши находились на предсемядольной стадии развития.

Введение в культуру *in vitro* происходило с 31 июля по 13 августа. Семена извлекали из шишек, стерилизацию проводили коммерческим средством Domestos в течение 10 минут, затем троекратно промывали в стерильной дистиллированной воде. Семена освобождали от семенных чешуй в условиях ламинар бокса и помещали на питательную среду. Инициацию проводили в течение 40–50 дней, затем полученный каллус помещали на питательные среды для пролиферации.

Для инициации соматического эмбриогенеза использовали среды АИ [10], DCR [11] и модифицированную среду MSG – MSGm [1]. В среду вводились регуляторы роста (2,4 D 2 мг/л и 6-БАП, 1 мг/л), 500 мг/л глутамина и 30 г/л сахарозы. Для пролиферации концентрацию БАП снижали вдвое, концентрацию сахарозы снижали до 20 г/л.

Цитологический анализ проводили через 2 месяца культивирования методом давленных препаратов, окрашивание проводили сафранином в течение 5 минут, затем добавляли глицерин и накрывали предметным стеклом.

Частотный анализ проводили с использованием анализа произвольных таблиц сопряженности с использованием критерия хи-квадрат с поправкой Бонферрони-Холма на множественные сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В культуру *in vitro* (см. таблицу) было введено 107 эксплантов, из них 13,1 % образовали каллус (рис. 1), из половины образцов которого формировались культуры с эмбрионально-суспензорной массой (рис. 2). Низкая частота образования, удлинённых клеток и ЭСМ не позволяет установить достоверных различий между питательными средами. При этом многие экспланты образовавшие удлинённые клетки и ЭСМ не обладали светло белой окраской и рыхлой структурой, которая является типичной для ЭСМ.

Таким образом, в результате исследования впервые была получена эмбрионально-суспензорная масса из эксплантов лиственницы Чекановского, что потенциально расширяет возможности применения технологии соматического эмбриогенеза для различных видов и гибридов хвойных деревьев.

Результаты введения в культуру *in vitro* лиственницы Чекановского. В скобках указан процент от количества эксплантов (для каллуса) и от количества каллусов (для культур с удлинёнными клетками и ЭСМ). Статистически значимо различающиеся значения для разных питательных сред при $p < 0,05$ отмечены разными буквами

Среда	Количество эксплантов	Каллус	Культуры с удлинёнными клетками	ЭСМ
DCR	31	4 (12,9) ^a	3 (75) ^a	2 (50) ^a
MSGm	43	7 (16,3) ^a	2 (28,6) ^a	0 (0) ^a
АИ	33	3 (9,1) ^a	1 (33,3) ^a	0 (0) ^a
Итого	107	14 (13,1)	6 (42,9)	2 (14,3)

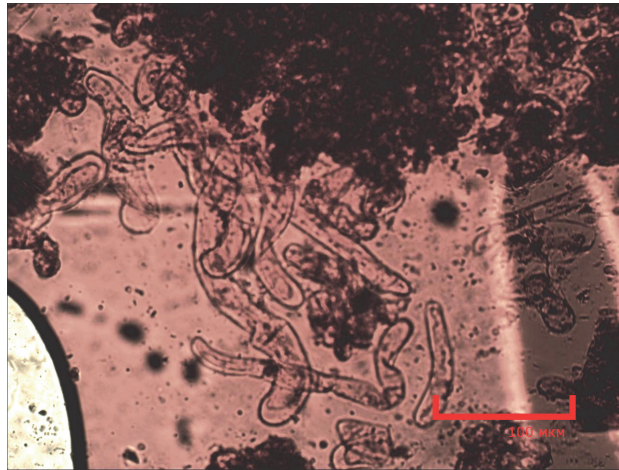


Рис. 1. Удлиненные клетки полученные из каллуса лиственницы Чекановского

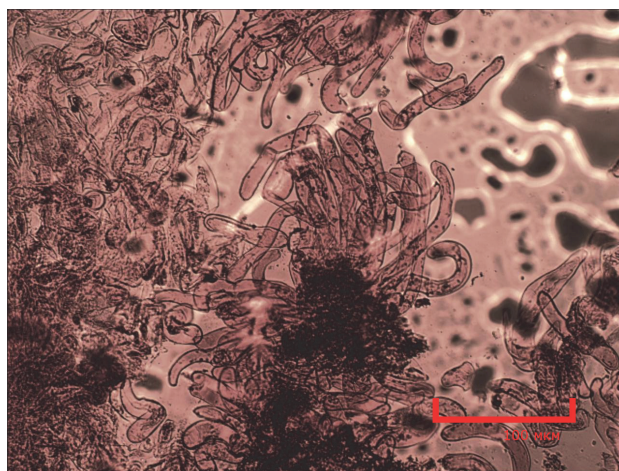


Рис. 2. Эмбрионально-суспензорная масса лиственницы Чекановского

Однако лиственница Чекановского имеет низкий процент каллусообразования из эксплантов (13 %). В исследовании [1] процент каллусообразования составил 53–93 % для лиственницы сибирской и 50–81 % для лиственницы Гмелина.

В исследовании *Larix decidua* и её гибридов с *Larix leptolepis* частота образования ЭСМ составила от 2 % до 62 % [12], В исследовании *Larix decidua* процент образования эмбрионного каллуса из незрелых зародышей составил 0–8,6 %, а из незрелых зародышей с мегагаметофитом 0–35,7 % [13]. У *Larix principis-rupprechtii* Мауг. частота образования эмбрионной ткани составила 0–30 %. Индукция эмбрионного каллуса у *Larix kaempferi* 3х *Larix gmelinii* 9 [14] составила 0–5,83 %. Лиственница Чекановского имеет низкий процент каллусообразования, из-за чего (13,1 %) получается низкий выход линий с удлинёнными клетками (4,7 %) и ЭСМ (1,9 %) от общего числа эксплантов. Однако, более высокий процент образования удлинённых клеток (35,7) и ЭСМ (14,3) от количества эксплантов образовавших каллус (Таблица).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процент каллусообразования у лиственницы Чекановского является низким, однако у эксплантов образовавших каллус процент образования удлинённых

клеток и ЭСМ значительно выше. Необходимы дополнительные исследования по индукции эмбрионного каллуса у лиственницы Чекановского, расширение выборки, числа деревьев, расширение периода и географии сбора материала для введения в культуру *in vitro*.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Третьякова И. Н., Барсукова А. В. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы // Онтогенез. 2012. Т. 43, № 6. С. 425–425.
2. Tretyakova I. N., Park M. E. Collectible cell lines of *Larix sibirica* obtained by somatic embryogenesis and their ability to regenerate // Forests. 2023. Т. 14, № 9. С. 1920.
3. Третьякова И. Н. и др. Особенности формирования генеративных органов лиственницы сибирской и их морфогенетический потенциал // Успехи современной биологии. 2006. Т. 126, № 5. С. 472–481.
4. Тренин В. В. Цитоэмбриология лиственницы. 1986.
5. Милютин Л. И. Биоразнообразие лиственниц России // Хвойные бореальной зоны. 2003. Т. 21, № 1. С. 6–9.
6. Ирошников А. и др. Лиственницы России. Биоразнообразие и селекция. 2004.

7. Круклис М. В., Милютин Л. И. Лиственница Чекановского. 1977.

8. Пак Л. Н., Бобринев В. П., Банщикова Е. А. Особенности выращивания культур лиственницы Чекановского в Забайкальском крае // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015. № 2-1. С. 91–95.

9. Третьякова И. Н., Пак М. Э. Размножение лиственницы сибирской с использованием биотехнологии соматического эмбриогенеза // Лесоведение. 2023. № 5. С. 526–536.

10. Третьякова И. Н. Способ микроклонального размножения лиственницы сибирской в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез на среде АИ для плантационного лесовыращивания. 2012.

11. Gupta P. K., Durzan D. J. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*) // Plant Cell Reports. 1985. Т. 4, № 4. С. 177–179.

12. 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* // Canadian Journal of Forest Research. 1994. Т. 24, № 1. С. 100–106.

13. Szczygiel K., Hazubska-Przybyl T., Bojarczuk K. Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of the genera *Picea*, *Abies* and *Larix* // Acta Societatis Botanicorum Poloniae. 2007. Т. 76, № 1.

14. Zhang S. et al. Embryogenic callus induction from immature zygotic embryos and genetic transformation of *Larix kaempferi* 3x *Larix gmelinii* 9 // PloS one. 2021. Т. 16, № 10. С. e0258654.

REFERENCES

1. Tret'yakova I. N., Barsukova A. V. Somaticheskii embriogenez v kul'ture in vitro trekh vidov listvennitsy // Ontogenez. 2012. Т. 43, № 6. С. 425–425.

2. Tret'yakova I. N., Park M. E. Collectible cell lines of *Larix sibirica* obtained by somatic embryogenesis and their ability to regenerate // Forests. 2023. Т. 14, № 9. С. 1920.

3. Tret'yakova I. N. i dr. Osobennosti formirovaniya generativnykh organov listvennitsy sibirskoi i ikh morfo-

geneticheskii potentsial // Uspekhi sovremennoi biologii. 2006. Т. 126, № 5. С. 472–481.

4. Trenin V. V. Tsitoembriologiya listvennitsy. 1986.

5. Milyutin L. I. Bioraznoobrazie listvennitsy Rossii // Khvoynye boreal'noi zony. 2003. Т. 21, № 1. С. 6–9.

6. Iroshnikov A. i dr. Listvennitsy Rossii. Bioraznoobrazie i selektsiya. 2004.

7. Krukliis M. V., Milyutin L. I. Listvennitsa Chekanovskogo. 1977.

8. Pak L. N., Bobrinev V. P., Banshchikova E. A. Osobennosti vyrashchivaniya kul'tur listvennitsy Chekanovskogo v Zabaikal'skom krae // Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy. 2015. № 2-1. С. 91–95.

9. Tret'yakova I. N., Pak M. E. Razmnzhenie listvennitsy sibirskoi s ispol'zovaniem biotekhnologii somaticheskogo embriogeneza // Lesovedenie. 2023. № 5. С. 526–536.

10. Tret'yakova I. N. Spособ mikroklonal'nogo razmnzheiya listvennitsy sibirskoi v kul'ture in vitro cherez somaticheskii embriogenez na srede AI dlya plantatsionnogo lesovyrashchivaniya. 2012.

11. Gupta P. K., Durzan D. J. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*) // Plant Cell Reports. 1985. Т. 4, № 4. С. 177–179.

12. 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* // Canadian Journal of Forest Research. 1994. Т. 24, № 1. С. 100–106.

13. Szczygiel K., Hazubska-Przybyl T., Bojarczuk K. Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of the genera *Picea*, *Abies* and *Larix* // Acta Societatis Botanicorum Poloniae. 2007. Т. 76, № 1.

14. Zhang S. et al. Embryogenic callus induction from immature zygotic embryos and genetic transformation of *Larix kaempferi* 3x *Larix gmelinii* 9 // PloS one. 2021. Т. 16, № 10. С. e0258654.

© Помыткин Н. С., Пак М. Э.,
Шемберг А. М., Третьякова И. Н., 2026

Поступила в редакцию 09.12.2025
Принята к печати 26.06.2026