

## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.3:576.5

### СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА, ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕСНОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Е. В. Новичонок<sup>1,2</sup>, Н. А. Галибина<sup>1,2</sup>, Б. В. Раевский<sup>1,2</sup>, М. А. Ершова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Отдел комплексных научных исследований ФИЦ «Карельский научный центр РАН»,  
Петрозаводск, Россия

<sup>2</sup> Институт леса КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

В обзоре представлена информация об особенностях селекции и селекционного семеноводства сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) как одного из наиболее хозяйственно ценных древесных видов Евразии. Соматический эмбриогенез – перспективный биотехнологический метод, позволяющий массово размножать ценные особи, полученные в процессе реализации селекционных программ. На примере разных представителей рода *Pinus* описаны основные этапы соматического эмбриогенеза. Рассмотрено влияние условий и срока культивирования на эффективность соматического эмбриогенеза и последующее развитие соматических зародышей в растения-регенеранты. Особое внимание уделено рассмотрению особенностей роста и физиологии клонов сосны в полевых условиях.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris*; плюсовая селекция; лесосеменные плантации; генетическая оценка; полевые испытания; соматические зародыши; условия культивирования.

#### **E. V. Novichonok, N. A. Galibina, B. V. Raevsky, M. A. Ershova. SOMATIC EMBRYOGENESIS IN SCOTS PINE: STATE OF KNOWLEDGE, AND PROSPECTIVE APPLICATIONS IN FORESTRY**

This review provides information on the approaches to selection and seed-orchard breeding of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) as a key commercial tree species in Eurasia. Somatic embryogenesis is an emerging biotechnique allowing for mass propagation of valuable specimens obtained through implementation of selection programs. The main stages of somatic embryogenesis are described for different species of the genus *Pinus*. The influence of the conditions and duration of cultivation on the performance of somatic embryogenesis and the subsequent transformation of somatic embryos into plants are considered. Special focus is on the growth and physiology of pine clones in the field.

Keywords: *Pinus sylvestris*; plus tree selection; seed orchards; genetic assessment; field testing; somatic embryos; culture conditions.

## Введение

Сосна обыкновенная является одним из ключевых видов лесных экосистем бореальной зоны Евразии и одной из наиболее хозяйственно ценных древесных пород мира. Ее древесина широко востребована, особенно в странах Северной Европы [Durrant et al., 2016]. Сосновые леса занимают 64,5 % всей покрытой лесом площади Республики Карелия и играют важнейшую эколого-экономическую роль в региональном масштабе [Ананьев, Сорока, 2009].

Система селекционного семеноводства основных лесообразующих пород, базирующаяся на современных достижениях биотехнологии, лесной генетики и плюсовой селекции, представляет собой наиболее наукоемкое и высокотехнологическое направление лесного хозяйства [Указания..., 2000; Jansson et al., 2017]. В настоящее время для размножения и селекции сосны обыкновенной наряду с традиционными начинают применять и биотехнологические методы, которые позволяют наиболее полно реализовать потенциал размножения данного растительного организма [Aronen et al., 2009; Третьякова, 2013; Thompson, 2014]. Одним из перспективных методов в лесной биотехнологии, позволяющим ускоренно получать посадочный материал основных лесообразующих пород, является соматический эмбриогенез (СЭ).

СЭ – вегетативный способ массового размножения растений, основанный на присущей клеткам растений тотипотентности и способности к регенерации, т. е. восстановлению целого организма из его части. СЭ включает четыре этапа: (1) инициация – клетки экспланта дедифференцируются и превращаются в эмбриональные; (2) пролиферация – формирование соматических эмбриоидов из эмбриональных клеток; (3) созревание – рост и развитие соматических зародышей и (4) прорастание соматических зародышей.

Возможность получения растений путем СЭ для *Pinus sylvestris* была впервые показана К. Keinonen-Mettälä с коллегами [1996]. Несмотря на то что для сосны обыкновенной разработаны подробные протоколы для введения в культуру и получения соматических клонов [Park et al., 2006, 2016; Lelu-Walter et al., 2008; Abrahamsson et al., 2018], она, по сравнению с другими представителями рода *Pinus*, остается трудным для размножения путем СЭ видом. К настоящему моменту соматические зародыши или растения-регенеранты получены для 34 видов рода *Pinus* [Шуклина, Третьякова, 2019]. Несмотря на активные исследования в этом

направлении, как в России (группа исследователей под руководством профессора И. Н. Третьяковой, Институт леса СО РАН, Красноярск), так и за рубежом (Т. Aronen, Н. Häggman, К. Niemi коллегами, Finnish Forest Research Institute, Finland; М.-А. Lelu-Walter, INRA, France), оптимизация протоколов получения соматических зародышей для сосны обыкновенной до сих пор актуальна.

В настоящей работе обобщена информация об особенностях селекции и семеноводства сосны обыкновенной, особое внимание уделено описанию соматического эмбриогенеза как перспективного биотехнологического метода ускоренного получения посадочного материала.

## Создание лесосеменных плантаций

Система плюсовой селекции основных лесообразующих видов, в том числе сосны обыкновенной, практикуется на территории России с конца 60-х годов XX века [Раевский и др., 2018]. К традиционным способам массового получения ценных по наследственным свойствам семян лесных растений относят создание лесосеменных плантаций (ЛСП). В зависимости от этапа селекции ЛСП делятся на категории [Указания..., 2000].

**ЛСП первого порядка (ЛСП I)** – это плантации, создаваемые вегетативным или семенным материалом от плюсовых деревьев, отобранных по фенотипическим признакам и не прошедших генетическую оценку по семенному потомству в испытательных культурах.

Генетическую ценность плюсовых деревьев и лучших деревьев ЛСП I определяют по общей (ОКС) или специфической (СКС) комбинационной способности. ОКС представляет собой величину превышения показателя исследуемого признака над контролем у семенного потомства, полученного от свободного опыления лучших деревьев. СКС рассчитывается как величина превышения целевого показателя у потомства, полученного от конкретной комбинации контролируемого скрещивания с определенным партнером того же или другого вида [Указания..., 2000]. Согласно Правилам создания и выделения объектов лесного семеноводства, утвержденным приказом Минприроды России от 20.10.2015, оценка семенных потомств в испытательных культурах включает несколько этапов. Предварительная оценка осуществляется по достижении потомствами половины II класса возраста (для сосны 21–40 лет), а окончательная оценка – в возрасте потомств не менее ½ возраста рубки в зависимости от класса бонитета (для сосны 80–100 лет). Деревья, облада-

ющие высокой комбинационной способностью, выделяют в качестве элитных.

**ЛСП повышенной генетической ценности (ЛСП I,5)** – это плантации, создаваемые по результатам предварительной генетической оценки (не менее 5–7 лет) потомств лучших деревьев ЛСП I с учетом данных по репродуктивной способности материнских клонов. Их создают в качестве промежуточного этапа между ЛСП I и II порядков в целях сохранения непрерывности селекционного процесса и использования первичного селекционного эффекта в практических целях.

**ЛСП второго порядка (ЛСП II)** – плантации, создаваемые вегетативным потомством элитных деревьев, обладающих высокой ОКС по результатам окончательной оценки в испытательных культурах. Считается, что ЛСП II позволяют повысить продуктивность искусственных насаждений на 20–30 % за счет высокого коэффициента наследуемости.

**ЛСП третьего порядка (ЛСП III)** – плантации, материалом для создания которых служат родительские пары элитных деревьев, обладающих высокой СКС. Семена, полученные с таких плантаций, можно назвать суперэлитными.

Семена лесных растений в зависимости от наследственных свойств подразделяют на категории: нормальные, улучшенные и сортовые. Согласно европейской терминологии семена, заготовленные с деревьев в насаждениях (в том числе на лесосеках), относят к нормальной селекционной категории (Source-identified); на ЛСП I – к улучшенной селекционной категории (Qualified); на ЛСП I,5 и II порядка – к сортовым (Tested).

Создание прививочных лесосеменных плантаций в Скандинавии и Финляндии началось с конца 1940-х годов. В настоящее время в Швеции создаются ЛСП III, в Финляндии – I,5 порядка [Jansson et al., 2017]. Основными объектами селекционных программ в Швеции и Финляндии являются *Pinus sylvestris* и *Picea abies*. Доля саженцев, выращенных из семян ЛСП, в Финляндии составляет для сосны обыкновенной свыше 60 %, для ели европейской – от 20 до 70 % в зависимости от колебания урожайности семян; в Швеции – 95 и 67 % соответственно [Jansson et al., 2017]. Многолетние наблюдения при проведении полевых испытаний позволили выбрать наиболее эффективный период их проведения, когда наследуемые черты интересующих признаков проявляются в полной мере [Review..., 2011]. Имеющийся опыт показывает, что измерения можно проводить в возрасте, составляющем ~ 20 % от возраста рубки главного пользования

(80–100 лет). Подобный подход к испытательным культурам сокращает общий срок генетической оценки до 16–20 лет.

Оценки, приведенные для Финляндии и Швеции, показывают, что использование саженцев *Pinus sylvestris* и *Picea abies*, выращенных из семян с ЛСП I, может дать увеличение производительности насаждения ( $\text{м}^3/\text{га}$ ) до 10 %, а из семян с ЛСП III – до 25 %. Использование генетически улучшенного материала может привести к сокращению оборота рубки на срок до 25 лет для *Pinus sylvestris* и на 5–10 лет для *Picea abies*. Таким образом, использование генетически улучшенного материала приводит к увеличению скорости роста деревьев при относительно низких объемах инвестиций [Simonssen et al., 2010]. Внутренняя норма прибыли при этом составляет 5,2–8,3 и 4,6–8,9 % для *Pinus sylvestris* и *Picea abies* соответственно [Jansson, 2007; Kvaalen, 2010; Simonssen et al., 2010; Ahtikoski et al., 2013; Haapanen et al., 2016, цит. по: Jansson et al., 2017].

В Карелии в последней четверти XX века при реализации системы плюсовой селекции основных лесобразующих видов (сосны обыкновенной и ели финской) были созданы 6 прививочных ЛСП I общей площадью около 454 га, в том числе сосны обыкновенной – 365 га [Ильинов, Раевский, 2015]. В настоящее время назрел переход к ЛСП I,5 и II порядка, которые должны стать источником существенно улучшенных генетически семян [Раевский и др., 2018]. Однако, как уже было сказано выше, согласно действующим нормативно-правовым документам, общий срок генетической оценки плюсовых деревьев с ЛСП I очень велик и составляет в среднем 40–50 лет, что делает невозможным его практическое выполнение.

Существенно ускорить генетико-селекционные исследования и увеличить количество посадочного материала, получаемого в процессе селекционной работы, возможно с привлечением современного биотехнологического метода – СЭ [Aronen, 2009; Thompson, 2014]. Подобный подход актуален для медленно растущих хвойных древесных видов, в частности для сосны обыкновенной, которая в отличие от других хвойных не поддается вегетативному размножению укорененными черенками.

## **Основные этапы соматического эмбриогенеза**

### *Инициация эмбриогенных культур*

Инициация, первый этап СЭ, – введение в культуру эксплантов (зародышей из семян)

и формирование эмбрионного каллуса. У видов рода *Pinus* в качестве эксплантов обычно используют незрелые зиготические зародыши до стадии дифференцировки семядолей, при этом используют либо целые мегагаметофиты, либо изолированные зародыши [Abrahamsson et al., 2018]. Низкая частота инициации эмбрионной культуры, характерная для *Pinus sylvestris* [Lelu-Walter et al., 2016], остается одной из центральных проблем, не позволяющих использовать СЭ для массового размножения этого вида. Значения данного показателя варьируют от 0,2 до 42 % [Krakau et al., 2013] и сильно зависят от стадии развития зиготического зародыша и генотипа деревьев-доноров [Häggman et al., 1999; Lelu et al., 1999; Park et al., 2006; Lelu-Walter et al., 2008; Aronen et al., 2009; Krakau et al., 2013]. Считается, что у *Pinus sylvestris* инициация соматического эмбриогенеза возможна только из изолированных незрелых зародышей [Keinonen-Mettälä et al., 1996; Park et al., 2006; Lelu-Walter et al., 2008; Abrahamsson et al., 2018]. При этом ведущее влияние оказывает генотип материнского растения [Niskanen et al., 2004]. Отмечается, что существуют генотипы, не поддающиеся введению в культуру и не формирующие эмбрионного каллуса [Aronen et al., 2009].

После сбора шишек либо зародыши сразу вводятся в культуру *in vitro*, либо шишки могут храниться при низкой положительной температуре (+3...+5 °C) как минимум 40 суток без потери способности зародышей формировать эмбрионный каллус [Häggman et al., 1999; Park, 2002]. При этом хранение шишек может положительно влиять на процесс СЭ. Показано увеличение частоты инициации СЭ и количества соматических эмбрионов при хранении шишек в течение 1–2 месяцев при температуре 4 °C [Montalbán et al., 2015]. Хранение шишек в течение длительного времени (более 2 месяцев) и при более низкой температуре (–3 °C) приводит к снижению частоты инициации [Park, 2002; Montalbán et al., 2015].

Для инициации СЭ хвойных, в том числе видов рода *Pinus*, используют базовые среды – LM [Litvay et al., 1985], MS [Murashige, Skoog, 1962] и DCR [Gupta, Durzan, 1985; Montalbán et al., 2016; Abrahamsson et al., 2018; Bonga et al., 2018]. Обычно на стадии инициации в среду в качестве регуляторов роста добавляют ауксины (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, 2,4-D) и цитокинины (6-бензиладенин, BA). Проблема низкой частоты инициации может быть решена путем модификации состава используемых сред и условий культивирования. Снижение концентрации ауксинов и цитокини-

нов (2,2 вместо 9,5 µM для 2,4-D и 2,2 вместо 4,5 µM для BA) в среде привело к увеличению частоты инициации *Pinus sylvestris* [Lelu-Walter et al., 2008]. М.-А. Lelu с коллегами [1999] выявили, что для определенных генотипов *Pinus sylvestris* для инициации СЭ лучше подходит среда без регуляторов роста. Park с соавторами [2006] показали увеличение частоты инициации эмбрионных культур *Pinus banksiana* при добавлении в среду форхлорфенурона (CPPU, сильнодействующий цитокинин) вместо 2,4-D и BA. Однако положительного влияния CPPU на инициацию эмбрионных культур *Pinus sylvestris* отмечено не было [Park et al., 2006].

Условия окружающей среды (температура и доступность воды) существенно влияют на успешность инициации [Montalbán et al., 2016]. При этом влияние факторов среды определяется видовыми особенностями. Для *Pinus halapensis* максимальная частота инициации отмечалась при температуре 23 °C [Pereira et al., 2016], для *Pinus radiata* – при температуре 18 °C [García-Mendiguren et al., 2016]. Более низкая доступность воды (более высокая концентрация геллановой камеди в среде, 4 г · л<sup>-1</sup>) приводит к увеличению частоты инициации у *Pinus radiata* и *Pinus halapensis* [García-Mendiguren et al., 2016; Pereira et al., 2016]. В то же время М. R. Весвар с коллегами [1995] для многих видов рода *Pinus* отмечают противоположное влияние геллановой камеди на частоту инициации.

Показателем успешной инициации служит формирование белого или прозрачного волокнистого эмбрионного каллуса, состоящего из отдельных клеток, клеточных скоплений или даже ранних соматических зародышей [Шуклина, Третьякова, 2019].

#### Пролиферация эмбрионных культур

После инициации эмбрионные культуры, состоящие из глобулярных зародышей и суспензоров (эмбрионально-суспензорная масса), перемещают на среду пролиферации или среду поддержания. Эмбрионные культуры видов рода *Pinus* можно поддерживать в пролиферирующем состоянии на твердой, полутвердой (гелеобразной) или в жидкой среде в виде суспензионных культур [Весвар, Pullman, 2015]. При этом необходимы пересадки пролиферирующих культур каждые 12–21 сутки. Однако при длительном субкультивировании отмечается снижение эмбрионного потенциала [Весвар, Pullman, 2015; Шуклина, Третьякова, 2019].

Скорость пролиферации, число и качество формирующихся в дальнейшем соматических зародышей зависит от состава среды и типа культивирования. Для *Pinus sylvestris* было показано влияние состава пролиферационной среды на морфологию эмбрионов [Keinonen-Mettälä et al., 1996]. Хорошо развитые соматические эмбрионы были получены на DCR-среде, в то время как на DG-среде [Durzan, Gupta, 1987] зародыши полностью дегенерировали в течение четырех недель. Aronen с соавторами [2009] предложили проводить пролиферацию на фильтровальной бумаге. При таком способе образуется меньше эмбрионов, чем при пролиферации в виде скопления ткани на твердой среде, но формируются преимущественно зародыши «тонкого» типа, для которых характерно лучшее созревание и прорастание (см. ниже). Полученные результаты могут быть связаны с более равномерным осмотическим, питательным и энергетическим статусом эмбрионально-суспензорной массы в тонком слое по сравнению со скоплениями ткани [Aronen et al., 2009]. М.-А. Lelu-Walter с коллегами [2008] предлагают культивировать культуру на фильтровальной бумаге на поверхности полутвердой среды.

К. Niemi с коллегами [1998] показали возможность увеличения скорости пролиферации медленно растущих клеточных линий *Pinus sylvestris* при их культивировании вместе с грибами-микоризообразователями *Laccaria proxima* и *Suillus variegatus*. Причина индукции пролиферации точно не известна, но может быть связана с поставкой в среду фитогормонов, в частности ауксинов, которые производят эктомикоризные грибы. В то же время культивирование быстро пролиферирующих линий вместе с эктомикоризными грибами приводило к снижению скорости роста. Авторы предполагают, что использование штаммов грибов, которые показывают положительную реакцию с пролиферирующими культурами, может быть полезным при работе на более поздних стадиях процесса СЭ (прорастание и укоренение) [Niemi et al., 1998].

#### *Созревание и прорастание соматических зародышей*

Созревание соматических зародышей – это процесс гистологической дифференциации незрелых (ранних) зародышей, в результате чего происходит формирование семядолей, зародышевого корешка и других органов и тканей, характерных для зрелого зародыша. Чтобы остановить пролиферацию и запустить пере-

ход от глобулярных зародышей эмбрионально-суспензорной массы к соматическим зародышам, необходимо предварительное культивирование эксплантов на безгормональной среде с добавлением активированного угля. Затем эмбриогенные культуры переносят на базовые питательные среды без ауксинов и цитокининов, но с добавлением абсцизовой кислоты (АБК). Важное значение в этом процессе приобретает снижение водного потенциала и высушивание пролиферирующей ткани [Шуклина, Третьякова, 2019].

Добавление активированного угля контролирует гормональный баланс и адсорбирует нежелательные компоненты [Шуклина, Третьякова, 2019]. Покрытие культур сосны обыкновенной активированным углем привело к увеличению числа соматических зародышей в 2,1 раза у 24-недельной культуры. На 8-недельную культуру эта обработка не оказывала влияния [Lelu-Walter et al., 2008]. Высокая концентрация геллановой камеди в среде уменьшала доступность воды и оказывала положительное влияние на созревание соматических зародышей *Pinus sylvestris* [Klimaszewska, Smith, 1997; Lelu et al., 1999].

АБК регулирует процессы созревания соматических зародышей как у покрытосеменных, так и у голосеменных растений [Rai et al., 2011]. Оптимальное время воздействия и концентрации АБК в среде, применяемые для созревания эмбрионов, у видов рода *Pinus* значительно различаются и должны быть определены опытным путем [Aronen et al., 2009]. Совместное применение АБК и ПЭГ стало обычным методом стимуляции созревания соматических зародышей различных видов хвойных растений [Bozhkov, Arnold, 2002].

Было показано положительное влияние высокого содержания АБК в среде на созревание соматических зародышей *Pinus sylvestris* [Lelu et al., 1999; Lelu-Walter et al., 2008; Aronen et al., 2009]. Сходные результаты были получены и для других хвойных. Добавление в среду АБК в концентрации 60  $\mu\text{M}$  приводит к увеличению числа семядольных соматических зародышей, по сравнению с аномальными по строению зародышами в культуре *Pinus sylvestris* [Lelu et al., 1999]. Впоследствии зародыши с аномальным строением не прорастали. Частота прорастания семядольных соматических зародышей составила 72 % [Lelu et al., 1999]. Влияние концентрации АБК в среде на созревание соматических зародышей зависит от концентрации сахарозы. При содержании в среде 0,2 М сахарозы количество зрелых соматических зародышей на 30 % выше при 80  $\mu\text{M}$  АБК, чем



Прорастание зародышей сосны обыкновенной «тонкого» (А) и «толстого» (В) типа на MB5 среде. Формирование хорошо развитого корня у зародышей «тонкого» типа и прекращение развития зародышей «толстого» типа после переноса прорастающих зародышей на MB6 среду (С) [по: Aronen et al., 2009]

Regeneration of Scots pine plants through somatic embryogenesis. Germination of (A) slim-type and (B) stub-type embryos on MB5 tissue culture medium. (C) Formation of well-developed root in the slim embryos and stagnation of development of the stub embryos after the transfer of germinating embryos on the MB6 medium [after: Aronen et al., 2009]

при 120  $\mu$ M. Однако при концентрации сахара в среде 0,1 М АБК не оказывает влияние на созревание соматических зародышей [Lelu-Walter et al., 2008]. Несмотря на важную роль АБК в процессе созревания, для сосны обыкновенной было отмечено спонтанное созревание соматических зародышей на среде без регуляторов роста и дальнейшее их прорастание с частотой 40 % [Lelu et al., 1999]. Помимо состава среды процесс созревания соматических зародышей *Pinus sylvestris* зависит от возраста культуры и генотипа [Lelu-Walter et al., 2008].

На прорастание зародышей и их дальнейший рост могут оказывать влияние обработки, проводимые во время фазы *in vitro* и во время фазы адаптации *ex vitro* [Högberg et al., 2001]. Для *Picea abies* показано отрицательное влияние добавления ПЭГ в среду на стадии созревания на прорастание соматических зародышей в дальнейшем, а также на рост зародышевого корня и формирование боковых корней в условиях *ex vitro* [Bozhkov, Arnold, 2002]. Продолжительность контакта с АБК во время созревания соматического зародыша и продолжительность непрерывного освещения в течение периода адаптации отрицательно влияют на выживаемость и рост растений-регенерантов *Picea abies* [Högberg et al., 2001].

Для *Pinus sylvestris* этот вопрос практически не изучен экспериментально. Результаты, полученные финскими исследователями, не согласуются с данными, полученными для *Picea abies*. Aronen с соавторами [2009] показали положительное влияние высокого содержания АБК в среде на созревание соматических зародышей, их качество, прорастание и выживаемость. В среде с высоким содержанием АБК формировалось больше зародышей «тонкого»

типа (рис.). Зародыши «тонкого» типа, по сравнению с зародышами «толстого» типа, быстро прорастают, их выживаемость в течение первого года значительно выше, в то время как зародыши «толстого» типа развиваются медленно и часто не формируют корней. Авторы отмечают, что контроль качества соматических зародышей, выбранных для прорастания, является одним из ключевых факторов, определяющих успешность применения метода СЭ для размножения *Pinus sylvestris* [Aronen et al., 2009]. Однако даже хорошо развитые эмбрионы «тонкого» типа плохо прорастают, если они долго находятся на среде для созревания. Это связано с накоплением этилена в среде, который отрицательно влияет на прорастание зародышей, и уменьшением количества запасных белков [Aronen et al., 2009].

Культивирование вместе с грибом *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker и Couch способно улучшить прорастание соматических зародышей *Pinus sylvestris* [Niemi, Häggman, 2002]. При этом мицелий не находится в непосредственном контакте с прорастающими зародышами, что указывает на связь улучшения прорастания с соединениями, синтезируемыми грибами, возможно, индолилуксусной кислотой и диаминами. Инокуляция с эктомикоризным грибом *Pisolithus tinctorius* *in vitro* улучшает адаптацию растений, полученных путем СЭ, хотя формирование микоризных структур не отмечалось [Niemi, Häggman, 2002].

После прорастания соматические растения *Pinus sylvestris* помещают в сосуды с торфом и вермикулитом (в соотношении 1:3) и держат 2–3 недели в условиях высокой влажности воздуха. Затем влажность постепенно снижают [Keinonen-Mettälä et al., 1996; Lelu-Walter et al.,

2008]. Для растений *Pinus sylvestris* выживаемость через 4 месяца варьировала от 59 до 84 % [Lelu-Walter et al., 2008]. После акклиматизации растения пересаживают в питомник [Lelu-Walter et al., 2008].

### Криоконсервация

Генетическая оценка клонов в конечном итоге может быть дана только путем полевых испытаний, на которые требуется минимум 5–10 лет. После создания эмбриогенных культур для поддержания высокого пролиферационного потенциала и их способности формировать эмбрионы требуется периодическое субкультивирование. Повторные субкультивирования не только являются трудоемкими, но также увеличивают риск потери эмбриогенных культур в результате загрязнения и ошибок [Lambardi et al., 2008]. Кроме этого, при длительном субкультивировании отмечается снижение эмбриогенного потенциала [Весвар, Pullman, 2015]. Длительное субкультивирование, особенно в присутствии регуляторов роста, также приводит к генетическим изменениям [Sarmast, 2016]. Для видов рода *Pinus* была отмечена генетическая нестабильность в культуре *in vitro* и показано, что уровень соматической изменчивости (изменчивость, возникающая в культуре клеток) варьирует среди разных генотипов [O'Brien et al., 1996; Burg et al., 2007; Marum et al., 2009].

Решить проблемы, связанные с субкультивированием и генетической нестабильностью, и поддерживать культуру, способную к пролиферации и формированию зародышей, на протяжении полевых испытаний позволяет криоконсервация. Криоконсервация – хранение материала при очень низкой температуре, обычно в жидком азоте при  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  – основана на уменьшении и последующем прекращении метаболической активности клеток [Latutrie, Aronen, 2013].

Для видов рода *Pinus*, в том числе для *Pinus sylvestris*, были разработаны эффективные методы криоконсервации [Häggman et al., 1998; Lambardi et al., 2008] и показана зависимость способности клеточных линий к восстановлению и созреванию от применяемого протокола [Ford et al., 2000; Carneros et al., 2017; Lineros et al., 2018]. С использованием RAPD-анализа показано сохранение генетической стабильности культур *Pinus sylvestris* в процессе криоконсервации [Häggman et al., 1998]. Возможность длительного криосохранения культур и их хорошее восстановление после как минимум 10 лет показана при использовании ДМСО в качестве

криопротектора [Latutrie, Aronen, 2013]. После 2–10 лет криосохранения от 80 до 93 % линий были способны к пролиферации. Однако более длительная криоконсервация (в течение 12 лет) привела к снижению способных к пролиферации линий до 59 %. При этом время криоконсервации не оказывало влияния на скорость пролиферации и способность линий формировать зрелые соматические зародыши. Количество соматических зародышей на 1 г эмбрионально-суспензорной массы уменьшалось с увеличением времени хранения: от 326 шт.  $\cdot\text{ г}^{-1}$  через 2 года до 107–111 шт.  $\cdot\text{ г}^{-1}$  через 9–10 лет. Однако эти различия были недостоверны [Latutrie, Aronen, 2013].

Таким образом, криоконсервация позволяет восстанавливать растения из генотипов, которые были отобраны в результате длительных клональных и полевых испытаний, и дает возможность массово производить клоны элитных линий для использования в лесном хозяйстве.

### Полевые испытания клонов, полученных СЭ

Перед тем как использовать СЭ для массового размножения, необходимо оценить рост и развитие клонов в полевых условиях и сравнить эти показатели с растениями, полученными из семян. Такая оценка позволит охарактеризовать пригодность клонов для потенциального использования в программах лесовосстановления.

Работы, посвященные полевым испытаниям клонов видов рода *Pinus*, немногочисленны. Для *Pinus sylvestris* было показано, что после шести лет роста в полевых условиях 95 % клонов и 97 % контрольных саженцев, выращенных из семян свободного опыления, были живы. Саженцы хорошо развивались и имели нормальный габитус. Через шесть лет контрольные саженцы были выше, чем клоны, в трех из четырех протестированных семейств. Частично разница в высоте может быть объяснена более крупным размером контрольных саженцев на момент посадки [Aronen, 2016]. Сходные данные получены для других видов хвойных [Grossnickle, Major 1994a; Högberg et al., 2003]. Были показаны отличия в скорости роста саженцев разных эмбриогенных линий, что обусловлено генотипическими различиями. Качество зародышей (см. раздел «Созревание и прорастание соматических зародышей») не оказывало влияния на высоту и диаметр саженцев через 6 лет [Aronen, 2016]. Однако автор отмечает, что было исследовано очень мало эмбриогенных линий (13 линий, полученных от 4 деревьев-доноров), и это не позволяет делать окончательных выводов.

Основные различия в скорости роста и производительности СЭ-растений связаны с межклональной изменчивостью. Так, например, для *Picea glauca* и гибрида ели (*Picea glauca* (Moench) Voss × *Picea engelmannii* Parry) было показано, что растения, полученные путем СЭ, имели большую скорость фотосинтеза по сравнению с зиготическими саженцами. При этом отмечались значительные межклональные различия в скорости фотосинтеза, которые были связаны с более сильным развитием корней и биомассой новых корней и NUE фотосинтеза [Grossnickle, Major, 1994b; Lamhamedi et al., 2000]. Наличие межклональной изменчивости позволяет в процессе полевых испытаний отбирать для массового размножения наиболее подходящие под заданные условия клоны.

Помимо межклональной изменчивости для растений, полученных путем СЭ, характерна высокая внутриклональная изменчивость по показателям роста, различным морфологическим и физиологическим переменным [Lamhamedi et al., 2000; Högberg et al., 2003]. Для *Picea sitchensis* показаны существенные различия в скорости роста и высоте растений, полученных путем СЭ от одних родителей. Различия по высоте между клонами достигали 23,3%. В связи с этим необходимо вводить в культуру как можно больше клеточных линий и проводить отбор клеточных линий, которые являются лучшими клонами [Thompson, 2014].

При использовании метода СЭ для массового размножения важна низкая внутриклональная изменчивость. Было показано, что внутриклональная изменчивость может быть уменьшена путем отбора растений-регенерантов по определенным морфологическим показателям [Högberg et al., 2003]. Для *Picea abies* показана прямая зависимость роста растений в полевых условиях от морфологических характеристик растений-регенерантов: длины эпикотила и наличия боковых корней. В то же время длина основного корня не оказывала существенного влияния на рост растений в течение первого года роста в теплице и второго года роста в питомнике [Högberg et al., 2003].

В целом исследования, проведенные на разных видах хвойных, не выявили отрицательного влияния процесса СЭ на рост и развитие растений в дальнейшем. Рост и развитие растений, полученных путем СЭ, различные физиологические и морфологические признаки были сходны со значениями, полученными для растений, выращенных из семян [Grossnickle, Major, 1994b; Lamhamedi et al., 2000; Benowicz et al., 2002; Högberg, 2003].

## Заключение

Для создания ЛСП с целью получения улучшенных и сортовых семян требуется длительный промежуток времени. СЭ, как перспективный биотехнологический метод, позволяет ускорить генетико-селекционные работы и может служить основой для создания ЛСП сосны обыкновенной с генетически улучшенным посадочным материалом. На сегодняшний день, однако, некоторые вопросы остаются малоизученными. Поскольку генотип растения-донора может определять способность эксплантов формировать соматические зародыши, важным этапом исследований является расширенный поиск растений-доноров, обладающих высоким репродуктивным потенциалом. Условия культуры, продолжительность культивирования, применение регуляторов роста могут приводить к различным изменениям в кариотипе растений, в частности к увеличению частоты мутаций. Для выявления соматической изменчивости особое внимание следует уделять цитогенетическому исследованию эмбрионных клеточных линий. Таким образом, этапы протекания СЭ у сосны обыкновенной требуют дальнейшего исследования с привлечением современных знаний в области молекулярно-генетических механизмов роста древесных растений, опыта генной инженерии и микроклонального размножения.

*Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0185-2019-0093).*

## Литература

Ананьев В. А., Сорока А. Н. Структура лесного фонда, динамика и перспективы лесопользования в Карелии // Лесные ресурсы таежной зоны России: проблемы лесопользования и лесовосстановления: Материалы Всерос. науч. конф. с междунар. участием (Петрозаводск, 30 сент. – 3 окт. 2009 г.). Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2009. С. 15–17.

Ильинов А. А., Раевский Б. В. Сравнительная оценка генетического разнообразия естественных популяций и клоновых плантаций сосны обыкновенной и ели финской в Карелии // Экологическая генетика. 2015. Т. 13, № 4. С. 55–67.

Раевский Б. В., Щурова М. Л., Чепик Ф. А. Некоторые результаты селекционно-генетической оценки плюсовых деревьев сосны обыкновенной в испытательных культурах Карелии // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. 2018. Вып. 224. С. 6–20.

Третьякова И. Н. Эмбрионные клеточные линии и соматический эмбриогенез в культуре *in vitro*



- у лиственницы сибирской // ДАН. 2013. Т. 450, № 1. С. 1–4. doi: 10.7868/S0869565213130306
- Указания по лесному семеноводству в Российской Федерации. М., 2000. 197 с.
- Шуклина А. С., Третьякова И. Н. Соматический эмбриогенез видов рода *Pinus* в культуре *in vitro* // Успехи современной биологии. 2019. Т. 139, № 2. С. 184–195. doi: 10.1134/S004213241902008X
- Abrahamsson M., Clapham D., von Arnold S. Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants / Eds. S. M. Jain, P. Gupta. Cham, Switzerland: Springer, 2018. Vol. I. P. 123–133.
- Ahtikoski A., Salminen H., Ojansuu R., Hynynen J., Kärkkäinen K., Haapanen M. Optimizing stand management involving the effect of genetic gain: preliminary results for Scots pine in Finland // Can. J. For. Res. 2013. Vol. 43, no. 3. P. 299–305. doi: 10.1139/cjfr-2012-0393
- Aronen T. Vegetative propagation of forest trees / Eds. Y.-S. Park, J. M. Bonga, H.-K. Moon. Seoul, Korea: Nat. Inst. of Forest Sci., 2016. P. 515–527.
- Aronen T., Pehkonen T., Rynnänen L. Enhancement of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Pinus sylvestris* // Scan. J. For. Res. 2009. Vol. 24, no. 5. P. 372–383. doi: 10.1080/02827580903228862
- Becwar M. R., Levis E. C., Handley W. III, Rutter M. R. Method for regeneration of coniferous plants by somatic embryogenesis // US Patent 5,413,930. 1995.
- Becwar M. R., Pullman G. S. Somatic embryogenesis in woody plants. Forestry Sciences / Eds. S. M. Jain, P. K. Gupta, R. J. Newton. Dordrecht Högborg: Springer, 2015. Vol. 44–46. P. 287–301. doi: 10.1007/978-94-011-0960-4\_18
- Benowicz A., Grossnickle S. C., El-Kassaby Y. A. Field assessment of Douglas-fir somatic and zygotic seedlings with respect to gas exchange, water relations, and frost hardiness // Can. J. For. Res. 2002. Vol. 32, no. 10. P. 1822–1828. doi: 10.1139/x02-093
- Bonga J., Park Y.-S., Ding C. What technical improvements are needed to achieve industrial application of conifer somatic embryogenesis? // Proceed. the Fifth Int. Conf. of the IUFRO Unit 2.09.02: Somatic Embryogenesis and Other Vegetative Propagation Technologies (Coimbra, Portugal, September 10–15, 2018). 2018. P. 4–24.
- Bozhkov P. V., von Arnold S. Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos // Physiol. Plantarum. 2002. Vol. 104, no. 2. P. 211–224. doi: 10.1034/j.1399-3054.1998.1040209.x
- Burg K., Helmersson A., Bozhkov P., von Arnold S. Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine // J. Exp. Bot. 2007. Vol. 58, no. 3. P. 687–698. doi: 10.1093/jxb/erl241
- Carneros E., Hernández I., Toribio M., Díaz-Sala C., Celestino C. Effect of different cryoprotectant procedures on the recovery and maturation ability of cryopreserved *Pinus pinea* embryogenic lines of different ages // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 2017. Vol. 53, no. 5. P. 469–477. doi: 10.1007/s11627-017-9833-6
- Durrant T., de Rigo D., Caudullo G. European atlas of forest tree species / Eds. J. Ayanz, D. de Rigo, G. Caudullo, T. Houston Durrant, A. Mauri. Luxembourg e012300p: Publications Office of the European Union, 2016. P. 132–133.
- Durzan D. J., Gupta P. K. Somatic polyembryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures // Plant Sci. 1987. Vol. 52, no. 3. P. 229–235. doi: 10.1016/0168-9452(87)90056-2
- Ford C. S., Jones N. B., van Staden J. Cryopreservation and plant regeneration from somatic embryos of *Pinus patula* // Plant Cell Reports. 2000. Vol. 19, no. 6. P. 610–615. doi: 10.1007/s002990050781
- García-Mendiguren O., Montalbán I. A., Goicoa T., Ugarte M. D., Moncaleán P. Environmental conditions at the initial stages of *Pinus radiata* somatic embryogenesis affect the production of somatic embryos // Trees. 2016. Vol. 30, no. 3. P. 949–958. doi: 10.1007/s00468-015-1336-7
- Grossnickle S. C., Major J. E. Interior spruce seedlings compared with emblings produced from somatic embryogenesis. II. Stock quality assessment prior to planting // Can. J. For. Res. 1994a. Vol. 24, no. 7. P. 1385–1396. doi: 10.1139/x94-179
- Grossnickle S. C., Major J. E. Interior spruce seedlings compared with emblings produced from somatic embryogenesis. II. Stock quality assessment prior to planting // Can. J. For. Res. 1994b. Vol. 24, no. 7. P. 1397–1407. doi: 10.1139/x94-180
- 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. Vol. 4, no. 4. P. 177–179. doi: 10.1007/BF00269282
- Haapanen M., Hynynen J., Ruotsalainen S., Siipilehto J., Kilpeläinen M. Realised and projected gains in growth, quality and simulated yield of genetically improved Scots pine in southern Finland // Eur. J. For. Res. 2016. Vol. 35, no. 6. P. 997–1009. doi: 10.1007/s10342-016-0989-0
- Häggman H. M., Rynnänen L. A., Aronen T. S., Krajnakova J. Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine // PCTOC. 1998. Vol. 54, no. 1. P. 45–53. doi: 10.1023/A:1006104325426
- Häggman H., Jokela A., Krajnakova J., Kauppi A., Niemi K., Aronen T. Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction // J. Exp. Bot. 1999. Vol. 50, no. 341. P. 1769–1778. doi: 10.1093/jxb/50.341.1769
- Högberg K.-A., Bozhkov P. V., Grönroos R., von Arnold S. Critical factors affecting ex vitro performance of somatic embryo plants of *Picea abies* // Scand. J. For. Res. 2001. Vol. 16, no. 4. P. 295–304. doi: 10.1080/02827580116772
- Högberg K.-A., Bozhkov P. V., von Arnold S. Early selection improves clonal performance and reduces intraclonal variation of Norway spruce plants propagated by somatic embryogenesis // Tree Physiology. 2003. Vol. 23, no. 3. P. 211–216. doi: 10.1093/treephys/23.3.211
- Jansson G. Gains from selecting *Pinus sylvestris* in southern Sweden for volume per hectare // Scand. J. For. Res. 2007. Vol. 22, no. 3. P. 185–192. doi: 10.1080/02827580701330894
- Jansson G., Hansen J. K., Haapanen M., Kvaalen H., Steffenrem A. The genetic and economic gains from

forest tree breeding programmes in Scandinavia and Finland // *Scand. J. For. Res.* 2017. Vol. 32, no. 4. P. 273–286. doi: 10.1080/02827581.2016.1242770

Keinonen-Mettälä K., Jalonen P., Eurola P., von Arnold S., von Weissenberg K. Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris* // *Scand. J. For. Res.* 1996. Vol. 11, no. 1–4. P. 242–250. doi: 10.1080/02827589609382933

Klimaszewska K., Smith D. R. Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum // *Physiol. Plantarum.* 1997. Vol. 100. P. 947–957. doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb00022.x

Krakau U. K., Liesebach M., Aronen T., Lelu-Walter M. A., Schneck V. Forest tree breeding in Europe: Current State-of-the-Art and Perspectives / Eds. L. E. Pagues. Dordrecht: Springer, 2013. P. 267–323. doi: 10.1007/978-94-007-6146-9\_6

Kvaalen H. Bruk av foredla plantemateriale. God økonomi for skogeigaren og samfunnet. Stiftelsen det norske Skogfrøverk. Artikler skrevet i anledning Skogfrøverkets “Strategi for skogplanteforedling 2010–2040” [Improved forest reproductive materials. Good economy for forest owner and society]. Norwegian, The Norwegian Forest Seed Center. Append. to proposed “Strategy for tree breeding 2010–2040. 2010. P. 16–18.

Lambardi M., Ozudogru E. A., Benelli C. Plant cryopreservation: a practical guide / Eds. B. M. Reed. New York: Springer, 2008. P. 177–210. doi: 10.1007/978-0-387-72276-4\_9

Lamhamedi M. S., Chamberland H., Bernier P., Tremblay F. M. Clonal variation in morphology, growth, physiology, anatomy and ultrastructure of container-grown white spruce somatic plants // *Tree Physiology.* 2000. Vol. 20. P. 869–880.

Latutrie M., Aronen T. Long-term cryopreservation of embryogenic *Pinus sylvestris* cultures // *Scand. J. For. Res.* 2013. Vol. 28, no. 2. P. 103–109. doi: 10.1080/02827581.2012.701325

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 growth regulator // *Physiologia Plantarum.* 1999. Vol. 105, no. 4. P. 719–728. doi: 10.1034/j.1399-3054.1999.105417.x

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 // *PCTOC.* 2008. Vol. 92, no. 1. P. 31–45. doi: 10.1007/s11240-007-9300-x

Lelu-Walter M.-A., Klimaszewska K., Miguel C., Aronen T., Hargreaves C., Teyssier C. Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications / Eds. V. Loyola-Vargas, N. Ochoa-Alejo. Cham: Springer, 2016. P. 319–365. doi: 10.1007/978-3-319-33705-0\_19

Lineroy Y., Balocchi C., Muñoz X., Sánchez M., Ríos D. Cryopreservation of *Pinus radiata* embryogenic tissue: effects of cryoprotective pretreatments on maturation ability // *PCTOC.* 2018. Vol. 135, no. 2. P. 357–366. doi: 10.1007/s11240-018-1469-7

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 embryoge-

nesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.) // *Plant Cell Reports.* 1985. Vol. 4, no. 6. P. 325–328. doi: 10.1007/BF00269890

Marum L., Rocheta M., Maroco J., Oliveira M. M., Miguel C. Analysis of genetic stability at SSR loci during somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*) // *Plant Cell Reports.* 2009. Vol. 28, no. 4. P. 673–682. doi: 10.1007/s00299-008-0668-9

Montalbán I. A., García-Mendiguren O., Goicoa T., Ugarte M. D., Moncaleán P. Cold storage of initial plant material affects positively somatic embryogenesis in *Pinus radiata* // *New Forests.* 2015. Vol. 6, no. 2. doi: 10.1007/s11056-014-9457-1

Montalbán I. A., García-Mendiguren O., Moncaleán P. In vitro embryogenesis in higher plants. Methods in molecular biology. Vol. 1359 / Eds. M. A. Germanà, M. Lambardi. New York: Springer, 2016. P. 405–415. doi: 10.1007/978-1-4939-3061-6\_21

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum.* 1962. Vol. 15, no. 3. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Niemi K., Häggman H. *Pisolithus tinctorius* promotes germination and forms mycorrhizal structures in Scots pine somatic embryos in vitro // *Mycorrhiza.* 2002. Vol. 12, no. 5. P. 263–267. doi: 10.1007/s00572-002-0181-x

Niemi K., Krajnakova J., Häggman H. Interaction between embryogenic cultures of Scots pine and ectomycorrhizal fungi // *Mycorrhiza.* 1998. Vol. 8, no. 2. P. 101–107. doi: 10.1007/s005720050219

Niskanen A.-M., Lu J., Seitz S., Keinonen K., Von Weissenberg K., Pappinen A. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*) // *Tree Physiology.* 2004. Vol. 24, no. 11. P. 1259–1265. doi: 10.1093/treephys/24.11.12592004

O’Brien I. E. W., Smith D. R., Gardner R. C., Murray B. G. Flow cytometric determination of genome size in *Pinus* // *Plant Science.* 1996. Vol. 115, no. 1. P. 91–99. doi: 10.1016/0168-9452(96)04356-7

Park Y. S. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations // *Ann. For. Sci.* 2002. Vol. 59, no. 5–6. P. 651–656. doi: 10.1051/forest:2002051

Park Y. S., Lelu-Walter M. A., Harvengt L., Trontin J. F., MacEacheron I., Klimaszewska K., Bonga J. M. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France // *PCTOC.* 2006. Vol. 86, no. 1. P. 87–101. doi: 10.1007/s11240-006-9101-7

Park Y.-S., Beaulieu J., Bousquet J. Vegetative propagation of forest trees. Eds. Y.-S. Park, J. M. Bonga, H.-K. Moon. Seoul, Korea: National Institute of Forest Science (NiFos), 2016. P. 302–322.

Pereira C., Montalbán I. A., García-Mendiguren O., Goicoa T., Ugarte M. D., Correia S., Canhoto J. M., Moncaleán P. *Pinus halepensis* somatic embryogenesis is affected by the physical and chemical conditions at the initial stages of the process // *J. For. Res.* 2016. Vol. 21, no. 3. P. 143–150. doi: 10.1007/s10310-016-0524-7

Rai M. K., Shekhawat N. S. H., Gupta A. K., Phulwaria M., Ram K., Jaiswal U. The role of abscisic

acid in plant tissue culture: a review of recent progress // PCTOC. 2011. Vol. 106, no. 2. P. 179–190. doi: 10.1007/s11240-011-9923-9

Review of the Swedish tree breeding programme / Ed. O. Rosvall. Skogforsk, 2011. 88 p.

Sarmast M. K. Genetic transformation and somaclonal variation in conifers // Plant Biotechnology Reports. 2016. Vol. 10, no. 6. P. 309–325. doi: 10.1007/s11816-016-0416-5

Simonsen R., Rosvall O., Gong P., Wibe S. Profitability of measures to increase forest growth

// For. Pol. Econ. 2010. Vol. 12, no. 6. P. 473–482. doi: 10.1016/j.forpol.2010.03.002

Thompson D. Challenges for the large-scale propagation of forest trees by somatic embryogenesis – a review // Proceed. of the Third Int. Conf. of the IUFRO Unit 2.09.02 on Woody Plant Production Integrating Genetic and Vegetative Propagation Technology (Vitoria-Gasteiz, Spain, September 18–12, 2014). 2014. P. 81–91.

Поступила в редакцию 01.08.2019

## References

Anan'ev V. A., Soroka A. N. Struktura lesnogo fonda, dinamika i perspektivy lesopol'zovaniya v Karelii [The structure of the forest fund, the dynamics and prospects of forest management in Karelia]. *Lesnye resursy taezhnoi zony Rossii: probl. lesopol'zovaniya i lesovostanovleniya: Mat. Vseros. nauch. konf. s mezhdunarod. uchastiem (Petrozavodsk 30.09–03.10.2009 g.)* [Forest resources of the taiga zone in Russia. Issues of forest exploitation and restoration: Proceed. All-Russ. sci. conf. with int. part. (Petrozavodsk, 30.09 – 03.10.2009)]. Petrozavodsk: KarRC RAS, 2009. P. 15–17.

Il'inov A. A., Raevskii B. V. Sravnitel'naya otsenka geneticheskogo raznoobraziya estestvennykh populyatsii i klonovykh plantatsii sosny obyknovnoy i eli finskoi v Karelii [Genetic diversity comparative evaluation of *Pinus sylvestris* L. and *Picea x Fennica* (regel) kom. native populations and clonal seed orchards in Russian Karelia]. *Ekol. genetika* [Ecol. Genetics]. 2015. Vol. 13, no. 4. P. 55–67.

Raevskii B. V., Shurova M. L., Chepik F. A. Nekotorye rezul'taty selektsionno-geneticheskoi otsenki plyusovykh derev'ev sosny obyknovnoy v ispytatel'nykh kul'turakh Karelii [Some results of Scots pine plus trees breeding assessment in progeny trial in Karelia]. *Izvestiya Sankt-Peterburgskoi lesotekh. akad.* [News of the St. Petersburg State Forest Tech. Acad.]. 2018. Vol. 224. P. 6–20.

Shuklina A. S., Tret'yakova I. N. Somaticheskii embriogenez vidov roda *Pinus* v kul'ture *in vitro* [Somatic embryogenesis of species of the genus *Pinus* in culture *in vitro*]. *Uspekhi sovr. biol.* [Biol. Bull. Reviews]. 2019. Vol. 139, no. 2. P. 184–195. doi: 10.1134/S004213241902008X

Tret'yakova I. N. Embriogeny kletochnye linii i somaticheskii embriogenez v kul'ture *in vitro* u listvennitsy sibirskoi [Embryogenic cell lines and somatic embryogenesis in *in vitro* culture of the Siberian larch]. *DAN* [Dokl. Biol. Sci.]. 2013. Vol. 450, no. 1. P. 122–125. doi: 10.7868/S0869565213130306

Ukazaniya po lesnomu semenovodstvu v Rossijskoi Federatsii [Guidance on forest seed production in the Russian Federation]. Moscow, 2000. 197 pp.

Abrahamsson M., Clapham D., von Arnold S. Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants. Cham, Switzerland: Springer, 2018. Vol. I. P. 123–133.

Ahtikoski A., Salminen H., Ojansuu R., Hynynen J., Kärkkäinen K., Haapanen M. Optimizing stand management involving the effect of genetic gain: preliminary

results for Scots pine in Finland. *Can. J. For. Res.* 2013. Vol. 43, no. 3. P. 299–305. doi: 10.1139/cjfr-2012-0393

Aronen T. Vegetative propagation of forest trees. Seoul, Korea: Nat. Inst. For. Sci., 2016. P. 515–527.

Aronen T., Pehkonen T., Ryyänen L. Enhancement of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Pinus sylvestris*. *Scan. J. For. Res.* 2009. Vol. 24, no. 5. P. 372–383. doi: 10.1080/02827580903228862

Becwar M. R., Levis E. C., Handley W. III, Rutter M. R. Method for regeneration of coniferous plants by somatic embryogenesis. US Patent 5,413,930. 1995.

Becwar M. R., Pullman G. S. Somatic embryogenesis in woody plants. Forestry sciences. Dordrecht Högberg: Springer, 2015. Vol. 44–46. P. 287–301. doi: 10.1007/978-94-011-0960-4\_18

Benowicz A., Grossnickle S. C., El-Kassaby Y. A. Field assessment of Douglas-fir somatic and zygotic seedlings with respect to gas exchange, water relations, and frost hardiness. *Can. J. For. Res.* 2002. Vol. 32, no. 10. P. 1822–1828. doi: 10.1139/x02-093

Bonga J., Park Y.-S., Ding C. What technical improvements are needed to achieve industrial application of conifer somatic embryogenesis? Proceed. the Fifth Int. Conf. of the IUFRO Unit 2.09.02: Somatic Embryogenesis and Other Vegetative Propagation Technologies (Coimbra, Portugal, September 10–15, 2018). 2018. P. 4–24.

Bozhkov P. V., von Arnold S. Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiologia Plantarum*. 2002. Vol. 104, no. 2. P. 211–224. doi: 10.1034/j.1399-3054.1998.1040209.x

Burg K., Helmersson A., Bozhkov P., von Arnold S. Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine. *J. Exp. Bot.* 2007. Vol. 58, no. 3. P. 687–698. doi: 10.1093/jxb/erl241

Carneros E., Hernández I., Toribio M., Díaz-Sala C., Celestino C. Effect of different cryoprotectant procedures on the recovery and maturation ability of cryopreserved *Pinus pinea* embryogenic lines of different ages. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2017. Vol. 53, no. 5. P. 469–477. doi: 10.1007/s11627-017-9833-6

Durrant T., de Rigo D., Caudullo G. European atlas of forest tree species. Luxembourg e012300p: Publications Office of the European Union, 2016. P. 132–133.

Durzan D. J., Gupta P. K. Somatic polyembryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspen-

- sion cultures. *Plant Sci.* 1987. Vol. 52, no. 3. P. 229–235. doi: 10.1016/0168-9452(87)90056-2
- Ford C. S., Jones N. B., van Staden J. Cryopreservation and plant regeneration from somatic embryos of *Pinus patula*. *Plant Cell Reports*. 2000. Vol. 19, no. 6. P. 610–615. doi: 10.1007/s002990050781
- García-Mendiguren O., Montalbán I. A., Goicoa T., Ugarte M. D., Moncaleán P. Environmental conditions at the initial stages of *Pinus radiata* somatic embryogenesis affect the production of somatic embryos. *Trees*. 2016. Vol. 30, no. 3. P. 949–958. doi: 10.1007/s00468-015-1336-7
- Grossnickle S. C., Major J. E. Interior spruce seedlings compared with emblings produced from somatic embryogenesis. II. Stock quality assessment prior to planting. *Can. J. For. Res.* 1994a. Vol. 24, no. 7. P. 1385–1396. doi: 10.1139/x94-179
- Grossnickle S. C., Major J. E. Interior spruce seedlings compared with emblings produced from somatic embryogenesis. II. Stock quality assessment prior to planting. *Can. J. For. Res.* 1994b. Vol. 24, no. 7. P. 1397–1407. doi: 10.1139/x94-180
- 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. Vol. 4, no. 4. P. 177–179. doi: 10.1007/BF00269282
- Haapanen M., Hynynen J., Ruotsalainen S., Siipilehto J., Kilpeläinen M. Realised and projected gains in growth, quality and simulated yield of genetically improved Scots pine in southern Finland. *Eur. J. For. Res.* 2016. Vol. 35, no. 6. P. 997–1009. doi: 10.1007/s10342-016-0989-0
- Häggman H. M., Ryyänen L. A., Aronen T. S., Krajinakova J. Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine. *PCTOC*. 1998. Vol. 54, no. 1. P. 45–53. doi: 10.1023/A:1006104325426
- Häggman H., Jokela A., Krajinakova J., Kauppi A., Niemi K., Aronen T. Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. *J. Exp. Bot.* 1999. Vol. 50, no. 341. P. 1769–1778. doi: 10.1093/jxb/50.341.1769
- Högberg K.-A., Bozhkov P. V., Grönroos R., von Arnold S. Critical factors affecting ex vitro performance of somatic embryo plants of *Picea abies*. *Scand. J. For. Res.* 2001. Vol. 16, no. 4. P. 295–304. doi: 10.1080/02827580116772
- Högberg K.-A., Bozhkov P. V., von Arnold S. Early selection improves clonal performance and reduces intracolonial variation of Norway spruce plants propagated by somatic embryogenesis. *Tree Physiology*. 2003. Vol. 23, no. 3. P. 211–216. doi: 10.1093/treephys/23.3.211
- Jansson G. Gains from selecting *Pinus sylvestris* in southern Sweden for volume per hectare. *Scand. J. For. Res.* 2007. Vol. 22, no. 3. P. 185–192. doi: 10.1080/02827580701330894
- Jansson G., Hansen J. K., Haapanen M., Kvaalen H., Steffenrem A. The genetic and economic gains from forest tree breeding programmes in Scandinavia and Finland. *Scand. J. For. Res.* 2017. Vol. 32, no. 4. P. 273–286. doi: 10.1080/02827581.2016.1242770
- Keinonen-Mettälä K., Jalonen P., Eurola P., von Arnold S., von Weissenberg K. Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris*. *Scand. J. For. Res.* 1996. Vol. 11, no. 1–4. P. 242–250. doi: 10.1080/02827589609382933
- Klimaszewska K., Smith D. R. Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiologia Plantarum*. 1997. Vol. 100. P. 947–957. doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb00022.x
- Krakau U. K., Liesebach M., Aronen T., Lelu-Walter M. A., Schneck V. Forest tree breeding in Europe: Current State-of-the-Art and Perspectives. Dordrecht: Springer, 2013. P. 267–323. doi: 10.1007/978-94-007-6146-9\_6
- Kvaalen H. Bruk av foredla plantemateriale. God økonomi for skogeigaren og samfunnet. Stiftelsen det norske Skogfrøverk. Artikler skrevet i anledning Skogfrøverkets “Strategi for skogplanteforedling 2010–2040” [Improved forest reproductive materials. Good economy for forest owner and society.] Norwegian, The Norwegian Forest Seed Center. Append. to proposed “Strategy for tree breeding 2010–2040. 2010. P. 16–18.
- Lambardi M., Ozudogru E. A., Benelli C. Plant cryopreservation: a practical guide. York: Springer, 2008. P. 177–210. doi: 10.1007/978-0-387-72276-4\_9
- Lamhamedi M. S., Chamberland H., Bernier P., Tremblay F. M. Clonal variation in morphology, growth, physiology, anatomy and ultrastructure of container-grown white spruce somatic plants. *Tree Physiology*. 2000. Vol. 20. P. 869–880.
- Latutrie M., Aronen T. Long-term cryopreservation of embryogenic *Pinus sylvestris* cultures. *Scand. J. For. Res.* 2013. Vol. 28, no. 2. P. 103–109. doi: 10.1080/02827581.2012.701325
- Lelu M.-A., Bastien C., Dugeault A., Gouez M.-L., Klimaszewska K. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulator. *Physiologia Plantarum*. 1999. Vol. 105, no. 4. P. 719–728. doi: 10.1034/j.1399-3054.1999.105417.x
- 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. *PCTOC*. 2008. Vol. 92, no. 1. P. 31–45. doi: 10.1007/s11240-007-9300-x
- Lelu-Walter M.-A., Klimaszewska K., Miguel C., Aronen T., Hargreaves C., Teyssier C. Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications. Cham: Springer, 2016. P. 319–365. doi: 10.1007/978-3-319-33705-0\_19
- Lineroy Y., Balocchi C., Muñoz X., Sánchez M., Ríos D. Cryopreservation of *Pinus radiata* embryogenic tissue: effects of cryoprotective pretreatments on maturation ability. *PCTOC*. 2018. Vol. 135, no. 2. P. 357–366. doi: 10.1007/s11240-018-1469-7
- 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 Reports*. 1985. Vol. 4, no. 6. P. 325–328. doi: 10.1007/BF00269890
- Marum L., Rocheta M., Maroco J., Oliveira M. M., Miguel C. Analysis of genetic stability at SSR loci during somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*). *Plant Cell Reports*. 2009. Vol. 28, no. 4. P. 673–682. doi: 10.1007/s00299-008-0668-9

Montalbán I. A., García-Mendiguren O., Goicoa T., Ugarte M. D., Moncaleán P. Cold storage of initial plant material affects positively somatic embryogenesis in *Pinus radiata*. *New Forests*. 2015. Vol. 6, no. 2. doi: 10.1007/s11056-014-9457-1

Montalbán I. A., García-Mendiguren O., Moncaleán P. In vitro embryogenesis in higher plants. *Methods in molecular biology*. Vol. 1359. New York: Springer, 2016. P. 405–415. doi: 10.1007/978-1-4939-3061-6\_21

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15, no. 3. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Niemi K., Häggman H. *Pisolithus tinctorius* promotes germination and forms mycorrhizal structures in Scots pine somatic embryos in vitro. *Mycorrhiza*. 2002. Vol. 12, no. 5. P. 263–267. doi: 10.1007/s00572-002-0181-x

Niemi K., Krajinakova J., Häggman H. Interaction between embryogenic cultures of Scots pine and ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 1998. Vol. 8, no. 2. P. 101–107. doi: 10.1007/s005720050219

Niskanen A.-M., Lu J., Seitz S., Keinonen K., Von Weissenberg K., Pappinen A. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Tree Physiology*. 2004. Vol. 24, no. 11. P. 1259–1265. doi: 10.1093/treephys/24.11.12592004

O'Brien I. E. W., Smith D. R., Gardner R. C., Murray B. G. Flow cytometric determination of genome size in *Pinus*. *Plant Science*. 1996. Vol. 115, no. 1. P. 91–99. doi: 10.1016/0168-9452(96)04356-7

Park Y. S. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann. For. Sci.* 2002. Vol. 59, no. 5–6. P. 651–656. doi: 10.1051/forest:2002051

Park Y. S., Lelu-Walter M. A., Harvengt L., Trontin J. F., MacEacheron I., Klimaszewska K., Bonga J. M.

Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *PCTOC*. 2006. Vol. 86, no. 1. P. 87–101. doi: 10.1007/s11240-006-9101-7

Park Y.-S., Beaulieu J., Bousquet J. Vegetative propagation of forest trees. Seoul, Korea: National Institute of Forest Science (NiFos), 2016. P. 302–322.

Pereira C., Montalbán I. A., García-Mendiguren O., Goicoa T., Ugarte M. D., Correia S., Canhoto J. M., Moncaleán P. *Pinus halepensis* somatic embryogenesis is affected by the physical and chemical conditions at the initial stages of the process. *J. For. Res.* 2016. Vol. 21, no. 3. P. 143–150. doi: 10.1007/s10310-016-0524-7

Rai M. K., Shekhawat N. S. H., Gupta A. K., Phulwaria M., Ram K., Jaiswal U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *PCTOC*. 2011. Vol. 106, no. 2. P. 179–190. doi: 10.1007/s11240-011-9923-9

*Review of the Swedish tree breeding programme*. Ed. O. Rosvall. Skogforsk, 2011. 88 p.

Sarmast M. K. Genetic transformation and somaclonal variation in conifers. *Plant Biotechnology Reports*. 2016. Vol. 10, no. 6. P. 309–325. doi: 10.1007/s11816-016-0416-5

Simonsen R., Rosvall O., Gong P., Wibe S. Profitability of measures to increase forest growth. *For. Pol. Econ.* 2010. Vol. 12, no. 6. P. 473–482. doi: 10.1016/j.forpol.2010.03.002

Thompson D. Challenges for the large-scale propagation of forest trees by somatic embryogenesis – a review. *Proceed. of the Third Int. Conf. of the IUFRO Unit 2.09.02 on Woody Plant Production Integrating Genetic and Vegetative Propagation Technology* (Vitoria-Gasteiz, Spain, September 18–12, 2014). 2014. P. 81–91.

Received August 01, 2019

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

### Новичонок Елена Валентиновна

старший научный сотрудник лаб. биотехнологии растений, к. б. н.

Отдел комплексных научных исследований

научный сотрудник лаб. физиологии и цитологии древесных растений

Институт леса КарНЦ РАН,

Федеральный исследовательский центр

«Карельский научный центр РАН»

ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,

Россия, 185910

эл. почта: enovichonok@inbox.ru

тел.: +79062092156

### Галибина Наталия Алексеевна

ведущий научный сотрудник лаб. биотехнологии растений, д. б. н.

Отдел комплексных научных исследований

зам. директора по научной работе

Институт леса КарНЦ РАН,

Федеральный исследовательский центр

«Карельский научный центр РАН»

ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,

Россия, 185910

эл. почта: galibina@krc.karelia.ru

тел.: +79062095199

## CONTRIBUTORS:

### Novichonok, Elena

Department for Multidisciplinary Scientific Research, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences

Forest Research Institute, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences

11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia

e-mail: enovichonok@inbox.ru

tel.: +79062092156

### Galibina, Natalia

Department for Multidisciplinary Scientific Research, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences

Forest Research Institute, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences

11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia

e-mail: galibina@krc.karelia.ru

tel.: +79062095199

**Раевский Борис Владимирович**

старший научный сотрудник, д. с.-х. н.  
Отдел комплексных научных исследований

ведущий научный сотрудник, руководитель лаб. лесных биотехнологий  
Институт леса КарНЦ РАН,  
Федеральный исследовательский центр  
«Карельский научный центр РАН»  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: borisraevsky@gmail.com  
тел.: +79114014890

**Ершова Мария Алексеевна**

младший научный сотрудник лаб. биотехнологии растений  
Отдел комплексных научных исследований,  
Федеральный исследовательский центр  
«Карельский научный центр РАН»  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: maria\_ershova\_karnc@mail.ru  
тел.: +79535473065

**Raevsky, Boris**

Department for Multidisciplinary Scientific Research,  
Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: borisraevsky@gmail.com  
tel.: +79114014890

**Ershova, Maria**

Department for Multidisciplinary Scientific Research,  
Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: maria\_ershova\_karnc@mail.ru  
tel.: +79535473065