

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 57.085.23:581.3
doi: 10.17223/19988591/39/9

О.В. Горячкина, М.Э. Пак, И.Н. Третьякова

*Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, обособленное подразделение
ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия*

Цитогенетические особенности эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica* Ledeb. в культуре *in vitro*

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научных проектов № 16-44-243068 и № 16-44-240509.

*В результате цитогенетического исследования эмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской в культуре *in vitro* впервые для данного вида выявлена соматональная изменчивость по числу хромосом. Среди длительно пролиферирующих клеточных линий выявлены как цитогенетически стабильные линии (КЛ 6 и КЛ 16.28), содержащие в кариотипе нормальное для данного вида диплоидное число хромосом ($2n = 24$), так и нестабильные (КЛ 5), с разбросом хромосомных чисел от 24 до 30, большим количеством патологий митоза и клеток с микроядрами. Вероятно, некоторые клеточные линии лиственницы сибирской могут сохранять цитогенетическую стабильность в течение многих лет, что позволяет успешно использовать их для получения растений-регенерантов. Очевидно, что для успешного размножения хвойных растений с помощью соматического эмбриогенеза необходимо проводить цитогенетический контроль эмбрионных культур, что позволит существенно улучшить качество получаемых растений-регенерантов и увеличить количество получаемого посадочного материала хвойных растений с селекционно-значимыми признаками, пригодного для плантационного лесовыращивания в Сибири.*

Ключевые слова: *Larix sibirica*; эмбрионально-суспензорная масса; соматический эмбриогенез; число хромосом; геномные мутации, митоз, микроядра.

Введение

Соматический эмбриогенез – вегетативный способ массового тиражирования растений, позволяющий существенно ускорить генетико-селекционные исследования и увеличить масштабы получаемого посадочного материала важных лесохозяйственных объектов с селекционно-значимыми признаками. Это особенно актуально для медленно растущих хвойных растений. Известно, что условия культуры, продолжительность культивиро-

вания, применение регуляторов роста могут приводить к различным изменениям в кариотипе растений, в частности к увеличению частоты мутаций [1]. Для успешного размножения хвойных через соматический эмбриогенез необходимо проводить оценку генетической стабильности полученных эмбрионных культур.

В литературе данные по генетической стабильности эмбрионных культур хвойных растений противоречивые. Изменение числа хромосом отмечалось в эмбрионных культурах некоторых видов хвойных, в частности *Abies alba* [2], *Pinus nigra* [3], *Larix × eurolepis* [4], *Pinus radiata* [5]. Анеуплоидия и несколько вариантов хромосомного мозаицизма выявлены в клеточных культурах и полученных из них клонах *Picea mariana*, *P. glauca*, *P. abies* [6, 7]. В то же время другими авторами показана генетическая стабильность *P. abies* в культуре *in vitro* [8–10].

В настоящей работе приводятся результаты цитогенетического исследования эмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) разной продолжительности культивирования из коллекционного банка эмбрионных культур лаборатории лесной генетики и селекции Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (г. Красноярск). Цитогенетический контроль проводился с целью оценки уровня генетической стабильности клеточных линий в зависимости от длительности культивирования и, следовательно, определения качества получаемых растений-регенерантов.

Материалы и методики исследования

Для проведения цитогенетических исследований из коллекционного банка эмбрионных культур лиственницы сибирской [11] отобраны три разновозрастные длительно пролиферирующие эмбрионные клеточные линии: КЛ 5, КЛ 6 и КЛ 16.28. Для получения данных клеточных линий от донора А4 в культуру вводились зиготические зародыши, полученные в результате свободного опыления (КЛ 6 в 2011 г., КЛ 16.28 в 2016 г.), а также контролируемого опыления пыльцой лиственницы Сукачева (КЛ 5 в 2009 г.). Возраст опытных деревьев составляет 50–70 лет, все они произрастают в дендрарии Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (г. Красноярск, Академгородок). Контролируемое опыление лиственницы сибирской с целью получения материала для ввода в культуру *in vitro* (зиготических зародышей) проводили в конце третьей декады апреля – в период созревания микростробилов и начала пыления.

Введение в культуру, инициация и пролиферация эмбрионных культур у лиственницы сибирской проводились на среде АИ (патент 2456344; <http://www.freepatent.ru/images/patents/5/2456344/patent-2456344.pdf>) и описывались в работах авторов статьи ранее [11, 12]. Проллиферирующие эмбрионные культуры субкультивировали на свежую питательную среду АИ через каждые 14 дней. Культуры инкубировали в темноте при температу-

ре (24 ± 1)°С. Продуктивность эмбриогенных клеточных линий оценивали путем подсчета числа соматических зародышей в 1 г сырой эмбрионально-суспензорной массы через неделю после пересадки. Величина выборки составляла 25–30 для каждой клеточной линии.

Цитогенетический анализ глобулярных соматических зародышей проводили на этапе пролиферации с использованием существующих методик кариологического и цитогенетического исследования растений [13, 14] с собственными модификациями. При анализе хромосомных чисел использовались разные варианты обработки материала для сокращения хромосом и разрушения веретена деления. Наилучшие результаты для большинства клеточных линий получены при обработке материала 0,2%-ным раствором колхицина в течение 18–20 ч при комнатной температуре.

Материал фиксировали спиртово-уксусной смесью (3:1) в течение 24 ч. Часть материала фиксировали без обработки колхицином для анализа митотических делений. Перед окраской небольшой кусочек эмбрионально-суспензорной массы отмывали от фиксатора, протравливали 2–4 мин в 4%-ном растворе железоаммонийных квасцов, затем помещали в 1%-ный раствор ацетогематоксилина и окрашивали в термостате при 50°С в течение 10–15 мин. Затем с помощью препаровальной иглы и пинцета отделяли несколько соматических зародышей, помещали их в каплю насыщенного раствора хлоралгидрата и мацерировали лезвием бритвы 2–3 мин до получения однородной суспензии. Фильтровальной бумагой убирали излишек жидкости и готовили давленный препарат стандартным способом. Просмотр препаратов осуществляли при помощи микроскопа «МИКМЕД-6» («ЛОМО», Россия) и цифровой камеры МС-12 («ЛОМО», Россия). Число хромосом определяли не менее чем в 100 метафазных пластинках для каждой клеточной линии.

Результаты исследования и обсуждение

Пролиферирующая эмбриогенная культура хвойных представляет собой полупрозрачную массу незрелых соматических (глобулярных) зародышей – эмбрионально-суспензорную массу (*embryonal suspensor masses* – ЭСМ), или волокнистый зародыш (*filamentous embryos*) [15]. В ЭСМ листовницы сибирской обнаруживались полиэмбриональные комплексы, состоящие из нескольких эмбрионов, наряду с самостоятельными отдельными зародышами. Клеточные деления локализованы в глобулах зародышей. В эмбриогенной культуре постоянно происходит мультипликация зародышей [16], этим объясняется тот факт, что зародыши находятся на разных стадиях развития и представляют собой глобулы размером от двух до нескольких десятков клеток.

Используемые в работе разновозрастные эмбриогенные клеточные линии листовницы сибирской (КЛ 5, КЛ 6 и КЛ 16.28) отличались между собой по жизнеспособности, пролиферативной активности, по числу соматических зародышей, их размерам и способности созреть. Длительно

пролиферирующие КЛ 5 и КЛ 6 сохраняли эмбрионный потенциал в течение 8 и 6 лет соответственно и характеризовались массовым образованием соматических зародышей. Подобная пролиферативная активность эмбрионных культур описана ранее в культуре мегагаметофитов *Larix decedua* и культуре зародышей гибридов лиственницы *L. x eurolepis* и *L. x marschlinsii* [17, 18], где образование ЭСМ шло в течение 9–17 лет.

Цитологический анализ показал, что при одинаковых условиях культивирования в одних клеточных линиях лиственницы сибирской происходит более активное образование соматических зародышей, чем в других. Так, продуктивность КЛ 6 составляла $2\,040 \pm 189$ шт./г ЭСМ, однако количество созревающих соматических зародышей не превышало 0,6%. Гибридная КЛ 5 формировала большее число соматических зародышей $3\,750 \pm 163$ шт./г ЭСМ, однако все они не созревали.

В норме кариотип лиственницы сибирской содержит 24 хромосомы ($2n = 2x = 24$): шесть пар длинных метацентриков и шесть пар коротких субметацентриков [19–23]. Как и у других хвойных, число хромосом у лиственницы сибирской характеризуется высокой степенью стабильности, геномные мутации наблюдаются редко и представлены главным образом единичными полиплоидными клетками.

Эмбрионные клеточные линии лиственницы сибирской различались по цитогенетической стабильности и числу хромосом. Две клеточные линии (КЛ 6 и КЛ 16.28) являлись диплоидными и содержали преимущественно клетки с нормальным для данного вида числом хромосом $2n = 24$ (рис. 1). Если продолжительность культивирования КЛ 16.28 составляет менее одного года, то КЛ 6, вероятно, сохраняет цитогенетическую стабильность в течение всех 6 лет культивирования. Генетическая стабильность данной линии показана ранее с помощью микросателлитного анализа: несоответствие материнскому генотипу по двум аллелям наблюдалось только в одном из девяти локусов [24]. От КЛ 6 получены клонированные сеянцы лиственницы сибирской, которые успешно растут в теплице ОЭХ «Погорельский бор» – стационара Института леса СО РАН [11]. Эти клоны, по данным микросателлитного анализа, показали полную идентичность КЛ 6, от которой получены [24].

В исследованных образцах КЛ 6 и КЛ 16.28 выявлены геномные мутации, представленные отдельными клетками, содержащими измененный набор хромосом (таблица). Единичные клетки содержали редуцированное число хромосом ($2n = 10, 20$), вероятно, их появление связано с нарушениями митоза. Также отмечены полиплоидные клетки: более «молодая» КЛ 16.28 содержала их в количестве 3,5%, тогда как у КЛ 6 этот показатель составил уже 9,0% (см. таблицу). Хромосомная мутация выявлена только у КЛ 6 и представлена единственной клеткой с ацентрическим кольцом.

Гибридная КЛ 5, полученная в 2009 г., отличалась цитогенетической нестабильностью и значительным разбросом чисел хромосом (см. таблицу). Большая часть метафазных пластинок (31,2%) содержала 29 хромосом, из

которых 15 являлись длинными метацентриками и 14 – короткими субметацентриками (рис. 1, e, f).

Частота встречаемости метафазных пластинок с различным числом хромосом у клеточных линий лиственницы сибирской
 [Frequency of occurrence of metaphase plates with a different number of chromosomes in the Siberian larch cell lines]

Клеточная линия [Cell line]	Число хромосом (2n) [Chromosome number (2n)]												Σ	Процент клеток с аномальным числом хромосом [Percentage of cells with an abnormal chromosome number]
	24	10	20	25	26	27	28	29	30	35	48	54		
КЛ 5 [CL 5]	1	–	–	7	10	18	18	35	20	1	1	1	112	99
КЛ 6 [CL 6]	91	–	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–	100	9
КЛ 16.28 [CL 16.28]	107	1	1	–	–	–	–	–	–	–	4	–	113	5

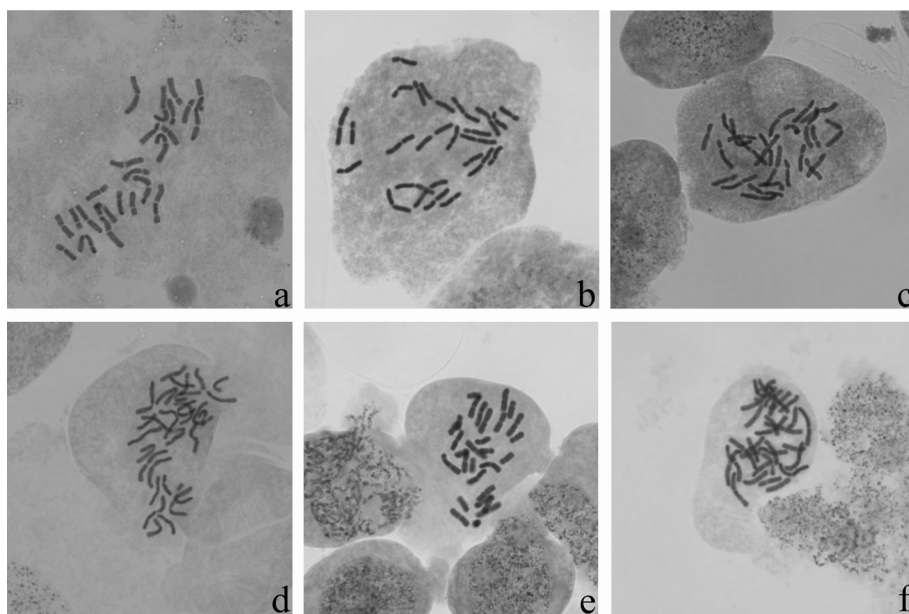


Рис. 1. Метафазные пластинки с разным числом хромосом у эмбрионных клеточных линий *L. sibirica*: a – 2n = 24 (КЛ 6); b – КЛ 2n = 24 (16.28); c – 2n = 25 (КЛ 5); d – 2n = 28 (КЛ 5); e, f – 2n = 29 (КЛ 5). Окрашивание 1%-ным ацетогематоксилином
 [Fig. 1. Metaphase plates with a different number of chromosomes in embryogenic cell lines of *L. sibirica*: a - 2n = 24 (CL 6); b - CL 2n = 24 (16.28); c - 2n = 25 (CL 5); d - 2n = 28 (CL 5); e, f - 2n = 29 (CL 5). Stained with 1% acetogematoxylin]

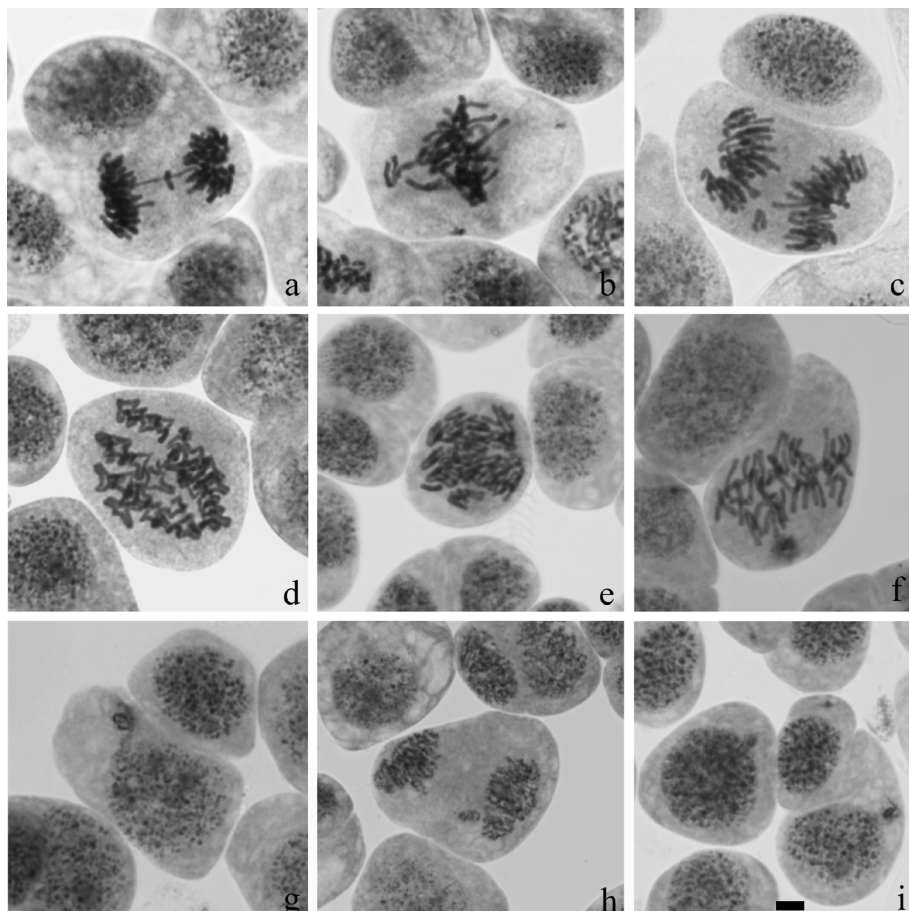


Рис. 2. Патологии митоза и микроядра в клетках эмбрионных культур *L. sibirica* (КЛ 5): *a* – мост и фрагмент в анафазе; *b* – выброс хромосом и их фрагментов в метафазе; *c* – отстающая хромосома в анафазе; *d* – К-митоз; *e* – хаотическое расхождение хромосом в анафазе; *f* – микроядро, сохраняющееся в метафазе митоза; *g-i* – микроядра разной формы. Окрашивание 1%-ным ацетогематоксилином. Масштабная линейка 10 мкм

[Fig. 2. Pathologies of mitosis and micronuclei in cells of embryonic cultures of *L. sibirica* (CL 5): *a* - Bridging and fragment in anaphase; *b* - Chromosomes and fragments outside of spindle division in metaphase; *c* - Lagging chromosomes in anaphase; *d* - C-mitosis; *e* - Random chromosome segregation in anaphase; *f* - Micronucleus, remaining in the metaphase of mitosis; *g-i* - Micronuclei of different shapes in cells. Stained with 1% acetogematoxylin. Scale 10 μ m]

Также обнаружены клетки, содержащие 24, 25, 26, 27, 28, 30, 35 хромосом. Цитогенетическая нестабильность данной клеточной линии может быть связана как с аномалиями, присутствовавшими в материале, использованном для введения в культуру, так и с адаптацией клеток к условиям куль-

туры *in vitro*. Поскольку исследование числа хромосом данной клеточной линии проводится впервые, невозможно установить достоверно, на каком этапе появились аномалии.

Анализ митоза показал, что наибольшее количество патологий наблюдается на стадии метафазы – 24,5% от общего числа клеток на данной стадии. В спектре нарушений преобладают хаотическое расхождение хромосом в метакинезе, преждевременное расхождение или выбросы отдельных хромосом. На стадии анафазы наблюдались трехполосное и хаотическое расхождение, отставание и забегание отдельных хромосом. Патологии, связанные с повреждением хромосом, – мосты, фрагментация и агглютинация хромосом – наблюдались реже и составляли 2,1% от общего числа делящихся клеток. Некоторые типы патологий представлены на рис. 2. Общее количество клеток с патологиями в митозе составило 13,2%, что значительно превышает уровень естественного мутагенеза, характерный для соматических клеток хвойных растений [25].

В интерфазных клетках КЛ 5 наблюдались микроядра различной формы (рис. 2, *f-i*), частота встречаемости таких клеток составляла 10,5%. Наиболее часто встречались микроядра «стандартного» вида [26] – небольшие по размеру, хорошо оформленные округлые образования ядерного материала, расположенные в цитоплазме клетки на некотором удалении от основного ядра. В некоторых случаях обнаруживались микроядра «прикрепленного» вида [26], соединенные с основным ядром тонкой нитью (рис. 2, *g, i*). Интересно, что микроядра наблюдались и в делящихся клетках на разных стадиях митоза, количество таких клеток варьировало от 9,0 (анафаза) до 17,7% (профаза).

Микроядра могут быть образованы как целой хромосомой при повреждении веретена деления, так и ацентрическим фрагментом хромосомы, возникшим в результате структурных патологий. По размерам микроядер можно судить об изменениях, произошедших в хромосомном наборе. В ряде работ убедительно показано, что наличие клеток с крупными микроядрами тесно связано с патологией митотического аппарата, а мелких – в основном со структурными абберациями хромосом [27–29]. При этом обнаруживается прямая связь между содержанием крупных и центромер-позитивных микроядер [30]. Присутствие микроядер, как правило, свидетельствует о нарушении механизмов элиминации патологий митоза, значительном повреждении геномного материала клетки и генетической нестабильности [28].

Цитогенетическая нестабильность клеточной линии 5 может быть связана с ее гибридным происхождением, а также с длительным периодом культивирования. В литературе имеются данные о цитогенетической нестабильности эмбриогенных культур некоторых видов хвойных растений. Например, при соматическом эмбриогенезе отмечено появление полиплоидных клеток в культуре мегагаметофитов *Larix decidua*, однако колебание числа хромосом не приводило к потере способности зародышей созреть [17]. Большое коли-

чество анеуплоидных клеток (до 70%) наблюдалось в эмбрионной культуре гибридного вида *Larix × eurolepis* [4]. У *Pinus radiata* одна из исследованных клеточных линий содержала в кариотипе лишнюю хромосому, что подтверждено исследованием количества ДНК [5]. Сомаклональная изменчивость по числу хромосом обнаружена у растений *Picea glauca*, *P. mariana* и *P. abies*, полученных с помощью соматического эмбриогенеза [6, 7]. Авторы отмечают у данных видов как анеуплоидию ($2n = 38$), так и несколько вариантов хромосомного мозаицизма ($2n = 24, 27, 36; 2n = 30, 39, 40, 55$).

Заключение

Полученные результаты показывают, что эмбрионные клеточные линии лиственницы сибирской могут сохранять цитогенетическую стабильность в течение многих лет и успешно использоваться для получения растений-регенерантов и плантационного лесовыращивания. Однако для их выявления (отбора) необходимо проводить цитогенетический контроль клеточных линий коллекционного банка эмбрионных культур. Цитогенетический анализ является наиболее чувствительным методом для выявления генетической стабильности клеточных линий, а также для определения качества получаемых растений-регенерантов. Кроме того, цитогенетические исследования эмбрионных клеточных линий вносят вклад в развитие теоретических аспектов генетики, репродуктивной биологии и биотехнологии хвойных.

Авторы выражают благодарность д-ру биол. наук, проф., зав. лабораторией лесной генетики и селекции Е.Н. Муратовой (Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Красноярск, Россия) и д-ру биол. наук, в.н.с Е.Д. Бадаевой (Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, Россия) за обсуждение полученных результатов исследования и ценные замечания.

Литература

1. Sarmast M.K. Genetic transformation and somaclonal variation in conifers // Plant Biotechnology Reports. 2016. Vol. 10, is. 6. PP. 1–17. doi: 10.1007/s11816-016-0416-5
2. Roth R., Ebert I., Schmidt J. Trisomy associated with loss of maturation capacity in a long-term embryogenic culture of *Abies alba* // Theoretical and applied genetics. 1997. Vol. 95, № 3. PP. 353–358. doi: 10.1007/s001220050570
3. Salajova T., Salaj J. Somatic embryogenesis in European black pine (*Pinus nigra* Arn.) // Biol. Plant. 1992. Vol. 4. PP. 213–218. doi: 10.1007/BF02925871
4. Nkongolo K.K., Klimaszewska K. Cytological and molecular relationships between *Larix decidua*, *L. leptolepis* and *Larix x eurolepis*: identification of species-specific chromosomes and synchronization of mitotic cell // Theor. Appl. Genet. 1995. Vol. 90. PP. 827–834. doi: 10.1007/BF00222018
5. O'Brien E.W., Smith D.R., Gardner R.C., Murray B.G. Flow cytometric determination of genome size in *Pinus* // Plant Sci. 1996. Vol. 115. PP. 91–99. doi: 10.1016/0168-9452(96)04356-7
6. Fourré J.L., Berger P., Niquet L., André P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches // Theor. Appl. Genet. 1997. Vol. 94. PP. 159–169. doi: 10.1007/s001220050395

7. Tremblay L., Levasseur C., Tremblay F.M. Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce (*P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability // *American Journal of Botany*. 1999. Vol. 86 (10). PP. 1373–1381.
8. Mo L.M., von Arnold S., Lagererantz U. Morphogenic and genetic stability in long-term embryogenic cultures and somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) // *Plant Cell Rep.* 1989. Vol. 8. PP. 375–378.
9. Harvengt L., Trontin J.F., Reymond I., Canlet F., Pâques M. Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis // *Planta*. 2001. Vol. 213. PP. 828–832. doi: [10.1007/s004250100628](https://doi.org/10.1007/s004250100628)
10. Helmersson A., von Arnold S., Burg K., Bozhkov P.V. High stability of nuclear microsatellite loci during the early stages of somatic embryogenesis in Norway spruce // *Tree Physiol.* 2004. Vol. 24. PP. 1181–1186.
11. Пак М.Э., Иваницкая А.С., Двойнина Л.М., Третьякова И.Н. Эмбриогенный потенциал длительно пролиферирующих клеточных линий *Larix sibirica in vitro* // *Сибирский лесной журнал*. 2016. № 1. С. 27–38. doi: [10.15372/SJFS20160103](https://doi.org/10.15372/SJFS20160103)
12. Третьякова И.Н., Барсукова А.С. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы // *Онтогенез*. 2012. Т. 43, № 6. С. 425–435.
13. Правдин Л.Ф., Бударягин В.А., Круклис М.В., Шершукова О.П. Методика кариологического изучения хвойных пород // *Лесоведение*. 1972. Т. 2. С. 67–75.
14. Пухальский В.А., Соловьев, А.А. Бадаева, Е.Д., Юрцев В.Н. Практикум по цитологии и цитогенетике растений. 2007. 200 с.
15. Stasolla C., Yeung E.C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003. Vol. 74, № 1. PP. 15–35. doi: [10.1023/A:1023345803336](https://doi.org/10.1023/A:1023345803336)
16. Третьякова И.Н., Пак М.Э. Особенности мультипликации соматических зародышей *Larix sibirica* в эмбриогенной культуре *in vitro* // *Онтогенез*. 2017 (в печати).
17. Von Aderkas P., Pattanavibool R., Hristoforoglu K., Ma Y. Embryogenesis and genetic stability in long term megagametophyte-derived cultures of larch // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2003. Vol. 74. PP. 27–34. doi: [10.1023/A:1024614209524](https://doi.org/10.1023/A:1024614209524)
18. Lelu-Walter M.-A., Pâques L.E. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix × eurolepis* and *Larix × marschlinii*). Perspectives for breeding // *Ann. For. Sci.* 2009. Vol. 66, № 104. PP. 1–10. doi: [10.1007/s00299-006-0115-8](https://doi.org/10.1007/s00299-006-0115-8)
19. Hizume M. Karyomorphological studies in the family Pinaceae // *Mem Fac Educ Ehime University. Ser III. Natural Sci.* 1988. Vol. 8 (2). PP. 1–108.
20. Муратова Е.Н. Кариологическое исследование *Larix sibirica* (Pinaceae) в различных частях ареала // *Ботанический журнал*. 1991. Т. 76, № 11. С. 1586–1595.
21. Муратова Е.Н., Карпюк Т.В., Владимирова О.С., Сизых О.А., Квитко О.В. Цитологическое изучение лиственницы сибирской в антропогенно нарушенных районах г. Красноярска и его окрестностей // *Вестник экологии, лесоведения и ландшафтоведения*. 2008. № 9. С. 99–108.
22. Муратова Е.Н., Седельникова Т.С., Пименов А.В., Карпюк Т.В., Квитко О.В., Сизых О.А. Кариологический полиморфизм лиственниц // *Биоразнообразие лиственниц Азиатской России* / под ред. С.П. Ефремова, Л.И. Милютина. Новосибирск : ГЕО, 2010. С. 34–49.
23. Muratova E.N., Sedelnikova T.S., Pimenov A.V., Karpjuk T.V., Sizikh O.A., Kvitko (Goryachkina) O.V. Karyological analysis of larch species from Siberia and the Far East of Russia // *Forest Science and Technology*. 2007. Vol. 3. PP. 89–94. doi: [10.1080/21580103.2007.9656323](https://doi.org/10.1080/21580103.2007.9656323)
24. Третьякова И.Н., Пак М.Э., Иваницкая А.С., Орешкова Н.В. Особенности соматического эмбриогенеза длительно пролиферирующих эмбриогенных клеточных линий *Larix sibirica in vitro* // *Физиология растений*. 2016. Т. 63, № 6. С. 812–822. doi: [10.7868/S0015330316050134](https://doi.org/10.7868/S0015330316050134)

25. Горячкина О.В., Сизых О.А. Цитогенетические реакции хвойных растений в антропогенно нарушенных районах г. Красноярск и его окрестностей // Хвойные бореальной зоны, 2012. Т. XXX, № 1–2. С. 46–51. <http://forest.akadem.ru/Articles/12/HBZ-XXX-1-2-046-051.pdf>
26. Жулева Л.Ю., Дубинин Н.П. Использование микроядерного теста для оценки экологической обстановки в районах Астраханской области // Генетика. 1994. Т. 30, № 7. С. 999–1004.
27. Högstedt B., Karlsson A. The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used // Mutat. Res. Genetic Toxicology. 1985. Vol. 156, is. 3. PP. 229–232. doi: 10.1016/0165-1218(85)90067-9
28. Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Бочаров Е.Ф. Патогенетический гомеостаз и иммунитет. Новосибирск : Наука, 1986. 256 с.
29. Vanparrys P., Vermeiren F., Sysmans M., Temmerman R. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity // Mutat. Res. 1990. Vol. 244 (2). PP. 95–103. doi: 10.1016/0165-7992(90)90056-P
30. Grawé J., Abramsson-Zetterberg L., Eriksson L., Zetterberg G. The relationship between DNA content and centromere content in micronucleated mouse bone marrow erythrocytes analyzed by flow cytometry and fluorescent *in situ* hybridization // Mutagenesis. 1994. Vol. 9 (1). PP. 31–38. doi: 10.1093/mutage/9.1.31

Поступила в редакцию 02.06.2017 г.; повторно 19.07.2017 г.;
принята 11.08.2017 г.; опубликована 22.09.2017 г.

Авторский коллектив:

Горячкина Ольга Викторовна – канд. биол. наук, н.с. лаборатории лесной генетики и селекции Института леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения РАН – Обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок 50/28).

E-mail: kvitko_olga@mail.ru

Пак Мария Эдуардовна – м.н.с. лаборатории лесной генетики и селекции Института леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения РАН – Обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок 50/28).

E-mail: mtavi@bk.ru

Третьякова Ираида Николаевна – д-р биол. наук, проф., в.н.с. лаборатории лесной генетики и селекции Института леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения РАН – Обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок 50/28).

E-mail: mtavi@bk.ru

For citation: Goryachkina OV, Park ME, Tretyakova IN. Cytogenetic peculiarities of *Larix sibirica* Ledeb. embryogenic cell lines in *in vitro* culture. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = *Tomsk State University Journal of Biology*. 2017;39:140-153. doi: 10.17223/19988591/39/9 In Russian, English Summary

Olga V. Goryachkina, Maria E. Park, Iraida N. Tretyakova

VN Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS", Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Cytogenetic peculiarities of *Larix sibirica* Ledeb. embryogenic cell lines in *in vitro* culture

Somatic embryogenesis is a vegetative method of mass propagation of plants, which makes it possible to significantly accelerate genetic breeding studies and increase the scale of the resulting planting stock of important forestry species with breeding-

significant features. This is especially relevant for slow growing coniferous plants. The cytogenetic variability of embryogenic cultures of coniferous species has been poorly studied; there are conflicting data in the reports on both the stability of chromosome numbers in in vitro culture and various genomic mutations. In this paper, we present the results of cytogenetic studies of embryogenic cell lines of Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) of different cultivation duration from the collection bank of embryogenic cultures of the Laboratory of Forest Genetics and Tree Breeding, VN Sukachev Institute of Forest, SB RAS (Krasnoyarsk, Russian Federation). We carried out this study to assess the level of cytogenetic stability of cell lines and to detect somaclonal variability and the selection of cell lines suitable for production of cloned plants.

We used three embryogenic cellular lines of Siberian larch (CL 5, CL 6 and C 16.28), obtained from zygotic embryos of the experimental tree A4 as a result of controlled and self-pollination, as material for research. The age of the embryogenic cultures is from 1 to 8 years. *In vitro* zygotic embryos induction and proliferation of embryogenic cultures in Siberian larch was carried out according to the methods described earlier [Pak ME et al. 2016, Tretyakova IN et al. 2012]. Cytogenetic analysis of globular somatic embryos was carried out at the stage of proliferation using the existing methods of karyological and cytogenetic research of plants [Pravdin LF et al. 1972, Puhalskiy VA et al. 2007] with their own modifications. The material was treated with a 0.2% solution of colchicine for 18-20 hours at room temperature to reduce chromosomes and destroy the spindle apparatus, fixed with an ethanol-acetic acid solution (3:1), stained with 1% acetogematoxylin, and squash preparations were used to count the number of chromosomes. The number of chromosomes was determined in not less than 100 metaphase plates for each cell line.

As a result of cytogenetic investigation of Siberian larch embryogenic cell lines in in vitro culture for the first time, somaclonal variability in the number of chromosomes was revealed for this species. Among the long-proliferating cell lines, there are both cytogenetically stable cell lines (CL 6 and CL 16.28) containing a normal diploid number of chromosomes ($2n = 24$) and unstable (CL 5) in the karyotype, with chromosome numbers ranging from 24 to 30, a large number of pathologies of mitosis and cells with micronuclei. Some cell lines of Siberian larch are likely to retain cytogenetic stability for many years, which allows them to be used successfully to produce cloned plants. Obviously, for successful reproduction of coniferous plants with the help of somatic embryogenesis, it is necessary to carry out cytogenetic control of embryogenic cultures that will significantly improve the quality of the obtained regenerants and increase the amount of planting stock of coniferous plants with breeding-significant features that is suitable for plantation forest growing in Siberia.

The article contains 2 Figures, 1 Table, 30 References.

Key words: *Larix sibirica*; embryonal-suspensor masses; somatic embryogenesis; number of chromosomes; genomic mutations, mitosis, micronuclei.

Funding: The study was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research, the Government of Krasnoyarsk Krai, Krasnoyarsk Regional Fund for Support of Scientific and Scientific-Technical Activity within the framework of research projects № 16-44-243068 and № 16-44-240509.

Acknowledgments: The authors are grateful to EN Muratova, Dr.Sci. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory of Forest Genetics and Tree Breeding of the VN Sukachev Institute of Forest SB RAS (Krasnoyarsk, Russia), and ED Badaeva, Dr.Sci. (Biol.), Leading Researcher (NI Vavilov Institute of General Genetics of the RAS, Russia), for discussing the obtained results and valuable comments.

References

1. Sarmast MK. Genetic transformation and somaclonal variation in conifers. *Plant Biotechnology Reports*. 2016;10(6):309-325. doi: [10.1007/s11816-016-0416-5](https://doi.org/10.1007/s11816-016-0416-5)
2. Roth R, Ebert I, Schmidt J. Trisomy associated with loss of maturation capacity in a long-term embryogenic culture of *Abies alba*. *Theoretical and Applied Genetics*. 1997;95(3):353-358. doi: [10.1007/s001220050570](https://doi.org/10.1007/s001220050570)
3. Salajova T, Salaj J. Somatic embryogenesis in European black pine (*Pinus nigra* Arn.). *Biol. Plant*. 1992;34(3-4):213-218. doi: [10.1007/BF02925871](https://doi.org/10.1007/BF02925871)
4. Nkongolo KK, Klimaszewska K. Cytological and molecular relationships between *Larix decidua*, *L. leptolepis* and *Larix x eurolepis*: Identification of species-specific chromosomes and synchronization of mitotic cell. *Theoretical and Applied Genetics*. 1995;90:827-834. doi: [10.1007/BF00222018](https://doi.org/10.1007/BF00222018)
5. O'Brien EW, Smith DR, Gardner RC, Murray BG. Flow cytometric determination of genome size in *Pinus*. *Plant Sci*. 1996;115:91-99. doi: [10.1016/0168-9452\(96\)04356-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(96)04356-7)
6. Fourré JL, Berger P, Niquet L, André P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theoretical and Applied Genetics*. 1997;94:159-169. doi: [10.1007/s001220050395](https://doi.org/10.1007/s001220050395)
7. Tremblay L, Levasseur C, Tremblay FM. Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce (*P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. *American Journal of Botany*. 1999;86(10):1373-1381. Available at: <http://www.amjbot.org/content/86/10/1373.full> (access 15.05.2017)
8. Mo LM, von Arnold S, Lagererantz U. Morphogenic and genetic stability in long-term embryogenic cultures and somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Plant Cell Rep*. 1989;8:375-378. doi: [10.1007/BF00270072](https://doi.org/10.1007/BF00270072)
9. Harvengt L, Trontin JF, Reymond I, Canlet F, Pâques M. Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis. *Planta*. 2001;213:828-832. doi: [10.1007/s004250100628](https://doi.org/10.1007/s004250100628)
10. Helmersson A, von Arnold S, Burg K, Bozhkov PV. High stability of nuclear microsatellite loci during the early stages of somatic embryogenesis in Norway spruce. *Tree Physiol*. 2004;24:1181-1186. PMID: [15294765](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15294765/)
11. Pak ME, Ivaniskaya AS, Dvoynina LM, Tretyakova I N. The embryogenic potential of long-term proliferation cell lines of *Larix sibirica* *in vitro*. *Siberian Journal of Forest Science*. 2016;1:27-38. doi: [10.15372/SJFS20160103](https://doi.org/10.15372/SJFS20160103) In Russian, English Summary
12. Tretyakova IN, Barsukova AV. Somatic embryogenesis in *in vitro* culture of three larch species. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2012;43(6):353-361. doi: [10.1134/S1062360412060082](https://doi.org/10.1134/S1062360412060082)
13. Pravdin LF, Budaragin VA, Krukliis MV, Shershukova OP. Metodika kariologicheskogo izucheniya khvoynnykh porod [Method of karyological study of conifer species]. *Lesovedenie*. 1972;2:67-75. In Russian
14. Pukhal'skiy VA, Solov'ev AA, Badaeva ED, Yurtsev VN. Praktikum po tsitologii i tsitogenetike rasteniy [Workshop on plant cytology and cytogenetics]. Moscow: Kolos Publ.; 2007. 200 p. In Russian
15. Stasolla C, Yeung EC. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003;74(1):15-35. doi: [10.1023/A:1023345803336](https://doi.org/10.1023/A:1023345803336)
16. Tretyakova IN, Park ME. Features of the multiplication of somatic embryos of *Larix sibirica* in embryogenic culture *in vitro*. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2017. In print

17. Von Aderkas P, Pattanavibool R, Hristoforoglu K, Ma Y. Embryogenesis and genetic stability in long term megagametophyte-derived cultures of larch. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2003;74:27-34. doi: [10.1023/A:1024614209524](https://doi.org/10.1023/A:1024614209524)
18. Lelu-Walter M-A, Pâques LE. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix × eurolepis* and *Larix × marschlinsii*). Perspectives for breeding. *Ann. For. Sci.* 2009;66:104. doi: [10.1007/s00299-006-0115-8](https://doi.org/10.1007/s00299-006-0115-8)
19. Hizume M. Karyomorphological studies in the family *Pinaceae*. *Mem Fac Educ Ehime University. Ser III. Natural Sci.* 1988;8(2):1-108.
20. Muratova EN. Karyological studies in *Larix sibirica* (*Pinaceae*) from different parts of its area. *Botanicheskiy zhurnal = Botanical journal.* 1991;76(11):1586-1595. In Russian
21. Muratova EN, Karpyuk TV, Vladimirova OS, Sizykh OA, Kvitko OV. A cytological study of Siberian larch in anthropogenically disturbed areas of the city of Krasnoyarsk and its vicinity. *Vestnik ekologii, lesovedeniya i landshaftovedeniya = Bulletin of Ecology, Forest and Landscaping.* 2009;9:99-108. In Russian
22. Muratova EN, Sedelnikova TS, Pimenov AV, Karpyuk TV, Kvitko OV, Sizykh OA. Kariologicheskiy polimorfizm listvennits. Glava 3 [Karyological polymorphism of larch species. Ch. 3]. In: *Bioraznoobrazie listvennits Aziatskoy Rossii. Kollektivnaya monografiya* [Larch biodiversity of the Asian Russia. Collective monograph]. Efremova SP and Milyutin LI, editors. Novosibirsk: Academic Publ. House GEO; 2010. pp. 34-49. In Russian
23. Muratova EN, Sedelnikova TS, Pimenov AV, Karpyuk TV, Sizykh OA, Kvitko OV. Karyological analysis of larch species from Siberia and the Far East of Russia. *Forest Science and Technology.* 2007;3:89-94. doi: [10.1080/21580103.2007.9656323](https://doi.org/10.1080/21580103.2007.9656323)
24. Tret'yakova IN, Pak ME, Ivanitskaya AS, Oreshkova NV. Peculiarities of somatic embryogenesis of long-term proliferating embryogenic cell lines of *Larix sibirica* *in vitro*. *Russian Journal of Plant Physiology.* 2016;63(6):800-810. doi: [10.1134/S1021443716050137](https://doi.org/10.1134/S1021443716050137)
25. Goryachkina OV, Sizikh OA. Cytogenetic reactions of conifer trees in anthropogenous disturbed regions of Krasnoyarsk and its environs. *Conifers of the boreal zone.* 2012;XXX(1-2):46-51. Available at: <http://forest.akadem.ru/Articles/12/HBZ-XXX-1-2-046-051.pdf> (access 15.05.2017) In Russian
26. Zhuleva LYu, and Dubinin NP. Use of the micronucleus test for assessing the ecological situation in regions of the Astrakhan' district. *Genetika.* 1994;30(7):999-1004. PMID: [7958817](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7958817/) In Russian, English Summary
27. Högestedt B, Karlsson A. The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutation Research/Genetic Toxicology.* 1985;156(3):229-232. doi: [10.1016/0165-1218\(85\)90067-9](https://doi.org/10.1016/0165-1218(85)90067-9)
28. Ilyinskikh NN, Ilyinskikh IN, Bocharov EF. Patogeneticheskiy gomeostaz i immunitet [Pathogenetic homeostasis and immunity]. Novosibirsk: Nauka, Siberian Branch Publ.; 1986. 256 p. In Russian
29. Vanparys P, Vermeiren F, Sysmans M, Temmerman R. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutation Research Letters.* 1990;244(2):95-103. doi: [10.1016/0165-7992\(90\)90056-P](https://doi.org/10.1016/0165-7992(90)90056-P)
30. Grawé J, Abramsson-Zetterberg L, Eriksson L, Zetterberg G. The relationship between DNA content and centromere content in micronucleated mouse bone marrow erythrocytes analyzed by flow cytometry and fluorescent *in situ* hybridization. *Mutagenesis.* 1994;9(1):31-38. doi: [10.1093/mutage/9.1.31](https://doi.org/10.1093/mutage/9.1.31)

Received 02 June 2017; Revised 19 July 2017;

Accepted 11 August 2017; Published 22 September 2017

Author info:

Goryachkina Olga V., Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Forest Genetics and Tree Breeding, VN Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 50, bld. 28 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation.

E-mail: kvitko_olga@mail.ru

Park Maria E., Junior Researcher, Laboratory of Forest Genetics and Tree Breeding, VN Sukachev Institute of Forest Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 50, bld. 28 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation.

E-mail: mtavi@bk.ru

Tretyakova Iraida N., Dr. Sci. (Biol.), Professor, Laboratory of Forest Genetics and Tree Breeding, VN Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 50, bld. 28 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation.

E-mail: mtavi@bk.ru