

УДК 630*161.6: 582.475.2: 631.532

ОСОБЕННОСТИ РОСТА ЭМБРИОГЕННОГО КАЛЛУСА И ПОЛУЧЕНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ ЗАРОДЫШЕЙ У КЕДРА СИБИРСКОГО

И.Н. Третьякова, М.В. Ижболдина

Институт леса им. В.Н.Сукачева СО РАН
660036 Красноярск, Академгородок, 50; e-mail: culture@ksc.krasn.ru

Инициация эмбрионного каллуса и получение соматических зародышей у кедр сибирского проводилась с использованием мегагаметофитов и незрелых зиготических зародышей на разных стадиях их развития. Культивирование осуществлялось на среде МС с гормонами 2,4-Д, БАП и АБК. Успешность соматического эмбриогенеза была связана с генотипом дерева и зависела от стадии развития экспланта.

Ключевые слова: соматический зародыш, эмбрионный каллус, кедр сибирский, мегагаметофит

Induction of embryogenic callus and the getting somatic embryos of Siberian pine has been conducted with megagametophytes and immature zygotic embryos at different stages its development. Culturing was made on MS medium with hormones 2,4-D, 6-BA and ABA. Success of somatic embryogenesis of Siberian pine connected with tree genotypes and depends on the stage of explants development.

Key words: somatic embryo, embryogenic callus, megagametophyte

ВВЕДЕНИЕ

Кедр сибирский (*Pinus sibirica* Du Tour) является одним из основных лесообразователей в горах Южной Сибири. За последние годы этот единственный орехоносный вид в данном регионе подвергается хищническому истреблению из-за антропогенной нагрузки. Вместе с тем половая репродукция кедр сибирского характеризуется рядом особенностей, затрудняющих его возобновление:

- процесс созревания семян характеризуется длительным репродуктивным циклом (27 мес.);
- семена являются полиэмбриональными, относятся к труднопрорастаемым и требуют стратификации (4-7 мес.);
- в природных популяциях кедр сибирского встречаются отдельные уникальные гетерозисные генотипы деревьев, у которых наблюдается сильная акселерация генеративного цикла (от опыления до оплодотворения проходит 2 мес., вместо 1 года, наблюдаемого в норме). Однако размножение таких гетерозисных форм естественным путем невозможно из-за отсутствия зародыша вследствие гаметофитной несовместимости (Третьякова, 1990).

Для регуляции эмбриональных процессов, направленных на преодоление стерильности семян и выращивание полноценных сеянцев у кедр сибирского, наиболее перспективным способом является использование микроклонального размножения в культуре *in vitro* и особенно путем соматического эмбриогенеза. Разработка биотехнологии соматического эмбриогенеза и получение соматических зародышей у кедр сибирского до сих пор не проводилась.

Соматический эмбриогенез - это асексуальный

способ размножения, основанный на тотипотентности растительных клеток, был открыт 20 лет назад у *Picea glauca* (Durzan et al, 1987). Этот феномен побуждает на исследование процессов дифференцировки и дедифференцировки растительных клеток, закономерностей детерминации в раннем онтогенезе. Эмбрионные клеточные линии сохраняют компетентность длительный период времени и позволяют получить генетически однородный селекционный материал улучшенных форм и проводить их массовое тиражирование. Клональное размножение хвойных через соматический эмбриогенез является одним из перспективных направлений в решении проблем лесовосстановления.

К настоящему времени эмбрионный каллус у хвойных был получен у 16 видов рода *Pinus*, у 11 видов рода *Picea*, у 4 видов и 2 гибридов рода *Abies*, у 6 видов и гибридов рода *Larix*, а также у *Pseudotsuga menziesii* (Klimaszewska., Суг, 2002). В качестве источника соматических клеток, для индукции соматического эмбриогенеза у хвойных, использовались мегагаметофиты, зрелые и незрелые зародыши и их отдельные органы (семядоли и гипокотиль), хвоя молодых растений (Lelu et al, 1994), а также сегменты вегетативных побегов взрослых деревьев (Malabadi, Staden, 2005). В данной статье впервые приводятся результаты исследования по индукции соматического эмбриогенеза из мегагаметофитов и изолированных незрелых зиготических зародышей кедр сибирского и цитологический контроль этого процесса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объекты исследований. Деревья кедр сибирского произрастают в естественном древостое Западного Саяна и на клоновых прививочных плантациях Западно-Саянского опытного лесного хозяйства (с. Ермаковское Красноярского края).

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 06-04-08040 ОФИ; ККФН и РФФИ № 07-04-96810

Для взятия образцов использовались 8 деревьев-доноров №№ 1т, 2т, 8, 277/22 и три клона: 26, 28, 22 (черенки взяты с дерева 277/22) – свободноопыленные и 22х1А – клон 22, опыленный пылью материнского гетерозисного дерева с однолетним циклом развития женских шишек (№ 1А). Возраст деревьев из естественного древостоя составил 100-110 лет, на клоновых плантациях – 14 лет. Со всех опытных деревьев производился сбор шишек в разные периоды их развития (начиная с периода оплодотворения до полного развития семян).

Растительный материал. В качестве экс-

плантов для индукции соматического эмбриогенеза использовались мегагаметофиты и зиготические зародыши на разных стадиях их формирования (см. табл.), полученных в результате свободного опыления и при контролируемом опылении. Мегагаметофиты извлекали из семян и стерилизовали гипохлоритом натрия или раствором йода с 90% спиртом (1:3), с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде. Зародыши извлекали из мегагаметофитов в стерильных условиях и помещали на питательную среду.

Таблица – Стадии эмбриогенеза зиготического зародыша в период сбора шишек (дата оплодотворения - конец первой декады июня)

Стадия развития	Размер зародыша	Продолжительность развития после оплодотворения (нед.)
Оплодотворение. Прозембрио	0	1 нед.
Ранний эмбриогенез		
- кливаж	4-16 клеток	2 нед.
- глобулярное эмбрио	0,5-1 мм	4 - 5 нед.
Поздний эмбриогенез		
- стадия торпедо	1,5-2 мм	6 нед.
- предсемядольная стадия	3 мм	7-8 нед.
- формирование оси зародыша	4 мм	8-9 нед.
Зародыш семян в период созревания шишки	5-10 мм	10-12 нед.
Зрелый зародыш (окончание периода стратификации)	11-12 мм	16-17 нед.

Методика получения соматических зародышей у хвойных включает ряд последовательных стадий, требующих определенного состава сред и гормональных добавок: инициация эмбрионного каллуса (ЭК), пролиферация ЭК и созревание соматических зародышей. Эти стадии различаются по длительности и условиям культивирования.

Для получения эмбрионного каллуса из мегагаметофитов и зиготических зародышей использовались базовая среда MS (Murashige, Skoog, 1962) и ½ MS (среда MS с уменьшенным вдвое содержанием макроэлементов), с добавлением мезоинозита (0,1 г л⁻¹), L-глутамин (1,45 г л⁻¹), фитогормонов: 2,4-Д (0,5-2 мг л⁻¹) и 6-БАП (0,5-1,01 мг л⁻¹), сахарозы (30 г л⁻¹), а также агара (7 г л⁻¹) или Gelrite (4 г л⁻¹). Для пролиферации эмбриональной массы концентрация 6-БАП, 2,4-Д и сахарозы снижалась в 2-4 раза. Культивирование проводилось в темноте. Для перехода соматических зародышей к созреванию были использованы безгормональные базовые среды с активированным углем (1 %) в течение 1 нед. на свету. Культивирование осуществлялось при 16-часовом фотопериоде и температуре 24±1 °С. Для созревания соматических зародышей в среды добавлялись мезоинозит (0,1 г л⁻¹), L-глутамин (1,45 г л⁻¹), 2,4-Д (2 мг л⁻¹) и АБК (5-15 мг л⁻¹), сахароза (34 г л⁻¹), а также агар (7 г л⁻¹).

Цитологический анализ

Для проведения цитологического анализа использовали давленные препараты. Окраска эксплантов проводилась сафранином с добавлением капли метиленового синего (Паушева, 1980). Просмотр микроскопических образцов осуществлялся на микроскопе МБИ-6. Замеры клеток и эмбриональных структур проводились при помощи оку-

ляр-микрометра с последующим переводом полученных единиц в мкм.

Статистическая обработка данных

Для сравнения интенсивности прироста каллуса проводилось еженедельное измерение объема каллуса по формуле

$$V=2/3 \pi SLh, \quad (1)$$

где V – объем экспланты, мм³;
S – ширина экспланты, мм;
L – длина экспланты, мм;
h – высота экспланты, мм.

Статистическая обработка данных проводилась по стандартным методикам (Лакин, 1973) при помощи программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение эмбрионного каллуса из зиготических зародышей сосны сибирской

Введение в культуру мегагаметофитов кедрового сибирского на стадии оплодотворения, проэмбрио и кливажа показало, что на 12 – 15-е сут. культивирования на микропиллярном конце гаметофита происходило формирование каллусной массы у 3 – 5 % эксплантов. В течение 3-5 нед. происходил активный рост каллуса – первоначальная масса экспланта увеличилась в 4-8 раз (рис. 1а). При введении в культуру незрелых изолированных зародышей на глобулярной стадии развития наблюдалось образование эмбрионного каллуса только в 7-10 % случаев (рис. 1б).

Наиболее активное формирование эмбрионного каллуса шло на предсемядольной и более поздних стадиях развития, когда длина зиготиче-

ского зародыша составляла 3-4 мм, т.е. зародыш занимал $\frac{1}{2}$ длины коррозионной полости (конец июля - начало августа). Морфологический отклик эксплантов, введенных в культуру, был уже замечен через 4-8 сут., который выражался в фор-

мировании эмбрионного каллуса (ЭК) по всей длине зародыша. Инициация ЭК активно шла на среде MS. На данной среде на 30-й день инициации объем эмбрионного каллуса составил 880 - 1430 мм³ (рис. 2).

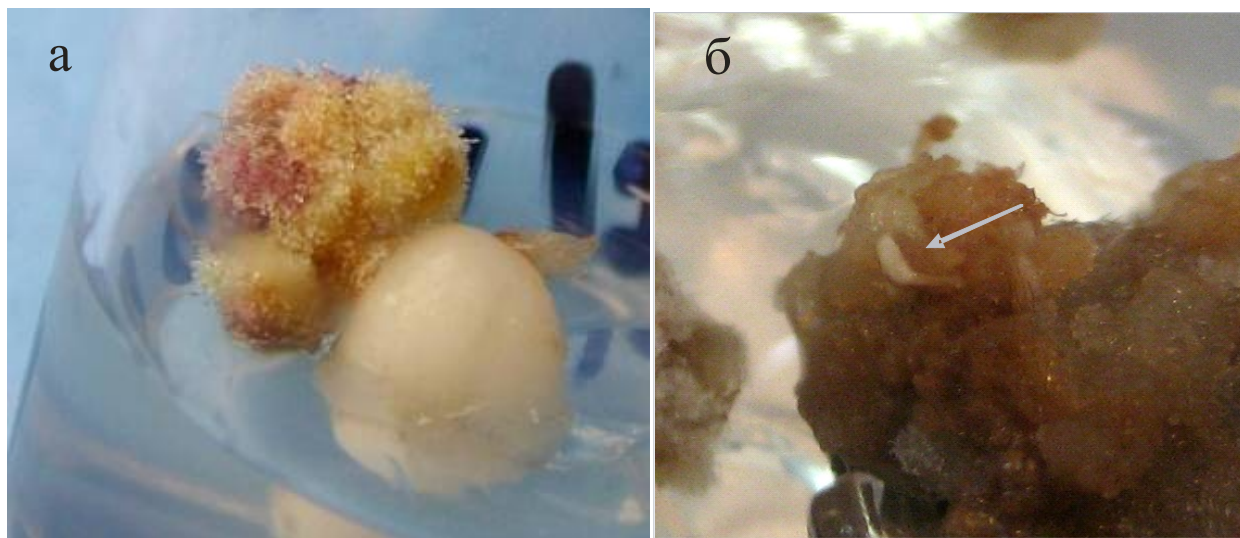


Рисунок 1 – а - Неэмбрионный каллус из апикальной части мегагаметофита сосны сибирской; б - Эмбрионный каллус и соматические зародыши, полученные из зиготического зародыша сосны сибирской

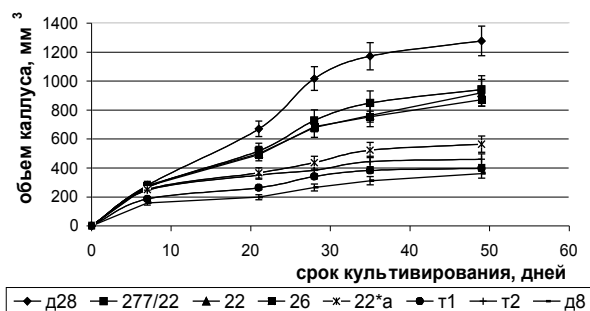


Рисунок 2 - Динамика роста эмбрионного каллуса, полученного из зиготических зародышей разных генотипов сосны сибирской

Полученный ЭК поддерживался на пролиферационных средах (MS) без потери пролиферационной активности. На протяжении всего срока культивирования происходил интенсивный прирост ЭК, объем которого за 3-4 мес. составил 14000 – 20000 мм³. Пролиферационная активность у кедров сибирского сохранялась в течение 12 и более месяцев, и в ЭК шло интенсивное образование соматических зародышей.

Влияние генотипа дерева (клона) – донора на инициацию и пролиферацию соматического эмбриогенеза сосны сибирской

Наблюдения за динамикой роста эмбрионного каллуса на среде MS показали, что процессы инициации и пролиферации каллуса у разных генотипов идут неодинаково (рис. 2). Прежде всего, выделились 3 дерева, произрастающих в естественном древостое Западного Саяна (№№ 1т, 2т и 8), у которых за 30 сут. инициации объем эмбрионного каллуса не превышал 250-380 мм³, т.е. составил в 2-3

раза меньшую величину по сравнению с остальными опытными деревьями. Пролиферация каллуса у этих деревьев шла еще более медленным темпом. Следовательно, указанные деревья не способны формировать эмбрионный каллус и в дальнейшем соматические зародыши. Остальные 5 опытных деревьев формировали эмбрионный каллус с разной степенью активности. Через 30 сут. культивирования (конец инициации) объем эмбрионного каллуса превышал 1100 мм³ (клон 28). Высокой эмбрионной активностью обладали дерево № 277/22 и клон, полученный от этого дерева (№ 22), а также клон № 26. Образование ЭК клон 22х1А (клон дерева 277/22, опыленного пыльцой гетерозисного дерева 1А с однолетним генеративным циклом) шло менее активно. Объем эмбрионного каллуса составил 420 мм³.

При пересадке на среду MS с уменьшенным вдвое содержанием фитогормонов процесс пролиферации эксплантов указанных деревьев шел также быстрым темпом. Динамика роста эмбрионного каллуса у всех опытных деревьев кедров сибирского сохранялась. Через 50 сут. культивирования пролиферирующие эмбрионные каллусы распадались на ряд отдельных кусочков, которые продолжали активно расти при последующих пересадках.

Таким образом, обнаруживается значительное влияние генотипа донорского дерева кедров сибирского на рост эмбрионного каллуса и образование в нем соматических зародышей.

Заслуживает внимания тот факт, что введение зародышей семян, полученных от одной шишки дерева № 277/22, показало сильную гетерогенность образования и роста эмбрионного каллуса в пределах одной шишки (рис. 3). Вероятно, такая разноразличность образцов эмбрионного каллуса в

пределах одной шишки свидетельствует о сильном влиянии пыльцы, полученной от разных отцов (деревьев - опылителей).

Вызревание соматических зародышей кедр сибирского

Через 2-3 месяца культивирования экспланты поэтапно переводились из пролиферационной среды на безгормональную среду с добавлением активированного угля (1 нед.), а затем помещались на среду MS, содержащую АБК (концентрация 5- 15 мг/л). Пробирки выставлялись на свет и проводились наблюдения за появлением соматических зародышей. Через 2 нед. культивирования в данной среде на поверхности эмбрионного каллуса отмечались появление зародышей с семядолями. На одном каллусе длиной 1,5-2 см образовывалось до 10-20 соматических зародышей. Через 1-2 мес. пребывания в данной среде соматические зародыши переносились в среду для проращивания.

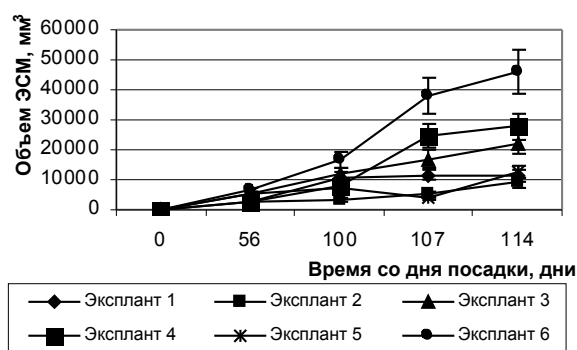


Рисунок 3 – Рост эмбрионного каллуса из эксплантов одной женской шишки генотипа 277/ 22 (свободное опыление)

Цитология возникновения эмбрионного каллуса и соматических зародышей

Цитологический анализ показал, что при введении в культуру мегагаметофитов на стадии оплодотворения, проэмбрио и начала внедрения зародыша в зародышевый канал, клетки, составляющие каллус, были однородными, без всяких признаков дифференциации.

При введении зиготических зародышей на семядольной и последующих стадиях развития в культуру через 3-7 дней начиналось активное удлинение клеток по всей длине зародышевого корешка (рис. 4а). Через 10-12 дней длина клеток составляла 160-190 мкм по сравнению с исходной 30-70 мкм. Такие клетки похожи на эмбриональные трубки первичного суспензора зиготического зародыша (рис. 4б). Эти клетки подвергались ассиметричному делению и образовывали две клетки: одну маленькую – эмбриональную, другую длинную – эмбриональную трубку. Оба типа клеток активно делились, формируя эмбриональные глобулы (будущие соматические зародыши) (рис. 4в), которые со всех сторон были окружены длинными клетками, выполняющими гаусториальную функцию.

К концу инициации эмбрионный каллус представлял собой эмбрионально-суспензорную массу. Он состоял из эмбриональных глобул и эмбриональных трубок. Эмбриональные глобулы и трубки

подвергались кливажу, их число значительно увеличивалось в период пролиферации, и через 40-50 дней в пролиферирующем эмбрионном каллусе возникали торпедообразные соматические зародыши. При переносе такого каллуса на безгормональную среду эмбриональные трубки отмирали, а торпедообразные соматические зародыши начинали увеличиваться в размерах и в них четко выделялась эмбриональная ось.

При переносе эмбрионного каллуса на среду с АБК соматические зародыши приобретают четкую биполярную структуру: на одном из полюсов зародыша происходит образование апекса побега и семядолей, а на другом - апекса корешка. Через 8-12 нед. соматические зародыши появляются на поверхности каллуса (рис. 4Г).

Эмбрионный каллус был индуцирован у 16 видов сосен, из которых только у половины были получены соматические зародыши и растения регенеранты. Соматические зародыши были получены у *P. caribaea* (Laine, David, 1990), *P. elliotii* (Newton et al 1995), *P. lambertiana* (Durzan, Gupta, 1987), *P. nigra* (Salajova et al 1995), *P. palustris* (Nagmani et al 1993), *P. patula* (Jones, Staden 1995), *P. sylvestris* (Keinonen-Mettälä et al 1996), *P. taeda* (Becwar et al 1990; Litvay et al 1985), *P. pinaster* (Bercetche, Paques, 1995), *P. koraiensis* (Bozhkov et al 1997), *P. strobus* (Finer et al 1989).

На среде с ауксинами и цитокининами частота регенерации эмбрионного каллуса у *Pinus* была низкой и колебалась у *P. taeda* от 2 до 9 %, у *P. pinaster* эта частота составила 15 % (Bercetche, Paques, 1995), а у *P. strobus* (Finer et al 1989) составила 52,9 %. У изучаемых генотипов кедр сибирского процесс инициации эмбрионного каллуса наблюдался у 58 % эксплантов. Однако активное образование эмбрионного каллуса шло только у трех из восьми генотипов, у которых через 2-3 месяца культивирования наблюдалось образование соматических зародышей.

Образование ранних соматических зародышей напоминает процесс кливажной эмбрионии, ярко выраженной у зиготических зародышей сосен, в том числе и кедр сибирского (Третьякова, 1990; Singh, 1978). У последнего эмбриональные инициалы зародыша, полученные от одной оплодотворенной яйцеклетки, распадаются на четыре идентичных эмбриональных единицы, каждая из которых дает начало четырем зародышам-близнецам. Простая и кливажная полиэмбрионии широко распространены у хвойных растений (Durzan, Gupta, 1987). По мнению Сарваса (Sarvas, 1962), этот феномен служит для компенсации стерильности, которая у *P. sylvestris* составляет 27 %. При самоопылении число стерильных семян значительно увеличивается (Koski, 1991), а при климатической флуктуации может достигать 100% (Носкова, Третьякова, 2004).

Имеются данные о том, что наблюдается наиболее эффективное получение соматических зародышей при введении в культуру *in vitro* эксплантов *P. strobus* на стадии кливажа и посткливажной стадии развития (Klimaszewska, Суг, 2002). Однако у кедр

сибирского при введении в культуру зиготических зародышей на более поздних стадиях развития, начиная со стадии инициации семядолей и до полного завершения морфогенеза (стадия опадения женских шишек), шло активное образование ЭК и соматических зародышей. Вероятно, в растительных клетках

архивировано наличие кливажа, который в силу тотипотентности клеток реализуется в пролиферирующих каллусах путем активного деления эмбриональных клеток (глобул) и эмбриональных трубок под действием гормонов.

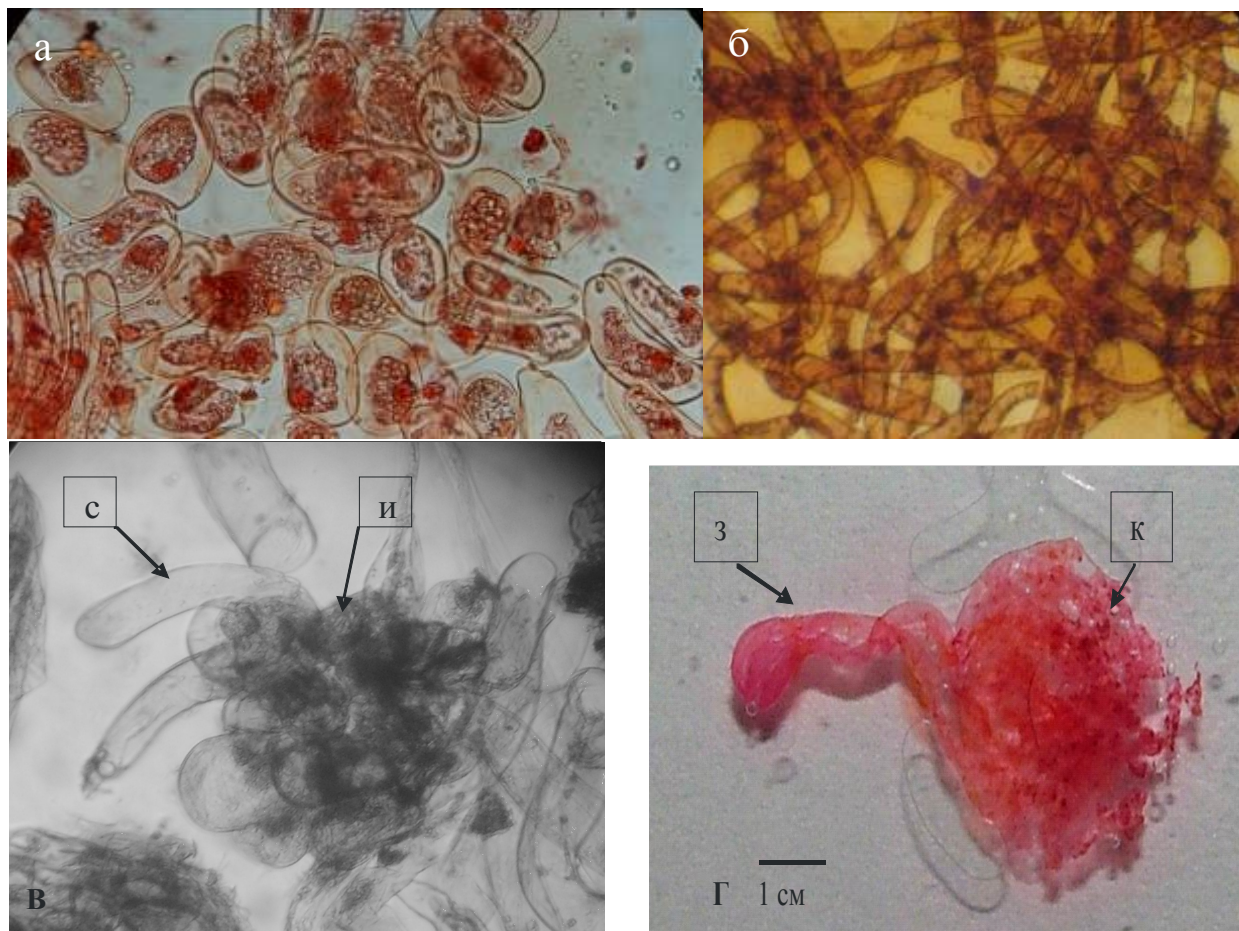


Рисунок 4 – Цитологический анализ эмбрионного каллуса кедр сибирского: А – Клетки на этапе инициации через 7 день культивирования; Б – Эмбриональные трубки через 17 дней культивирования; В – Цитологическая структура эмбрионально-сuspензорной массы, состоящая из эмбриональных трубок (с) и изодиаметрических эмбриональных(и) клеток (фрагмент); Г – Соматический зародыш, полученный из каллуса зиготического зародыша, З – соматический зародыш, К – каллусная масса

Экспериментальным путем было показано, что индукция и регенерация соматических зародышей у кедр сибирского, так же как у других видов хвойных – процесс многоступенчатый, включающий применение разнообразных химических соединений и многочисленных гормональных преобразовок, так же как у других видов хвойных (Белорусова, Третьякова 2008). Наиболее проблематичным остается стадия созревания соматических зародышей. В опытах культивирования зиготических зародышей представителей сосен этот процесс шел на средах с высокой концентрацией АБК (120 μM) (Lelu, 1994). В экспериментах с кедром сибирским использовалось АБК в значительно меньших концентрациях (40-60 μM), при этом возникали единичные соматических зародыши. При использовании более высоких концентраций АБК наступал некроз эмбрионного каллуса. В настоящее время нами проводятся исследования по совершенствованию биотехнологии получения сома-

тических зародышей кедр сибирского.

Таким образом, у кедр сибирского впервые были получены эмбрионный каллус и соматические зародыши из незрелых половых зародышей. Успех получения соматических зародышей был связан с генотипом дерева – донора. Следовательно, для инициации эмбрионного каллуса и получения соматических зародышей необходимо проведение, прежде всего, отбора генотипов, обладающих повышенной способностью к регенерации. При этом наиболее перспективным направлением является проведение работ по гибридизации с использованием улучшенных материнских и отцовских деревьев, дающих высокопродуктивное потомство. Проведение работ по введению гибридных зародышей в культуру *in vitro*, получение из них эмбрионного каллуса, соматических зародышей и растений - регенерантов будет способствовать получению высокопродуктивных чистых линий (может быть даже сортов) кедр сибирского,

единственного орехоносного вида в Сибири, для коммерческого плантационного выращивания.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Белоруссова, А.С. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты/ А.С. Белоруссова, И.Н. Третьякова // Онтогенез. - 2008. Т. 39. - №2. - С.1-10.
- Лакин, Г.Ф. Биометрия/ Г.Ф. Лакин. - М.; Высшая школа, 1973.- 343с.
- Носкова, Н.Е. Пыльца сосны обыкновенной в условиях экологического стресса. / Н.Е. Носкова, И.Н. Третьякова // Экология.- 2004.- №1. - С.26-33
- Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. - М.: Колос, 1980.- 340 с.
- Третьякова, И.Н. Эмбриология хвойных: физиологические аспекты/ И.Н. Третьякова. - Новосибирск; Наука, 1990.- 157с.
- Becwar, M.R. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*)/ M.R. Becwar, R. Nagmani, S.R. Wann // Can. J. For. Res. 1990. V. 20. - P. 810-817
- Bercetche, J. Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*) / J. Bercetche, M. Paques, // Somatic Embryogenesis in Woody Plants. – Dordrecht.: Kluwer Academic Publishers, 1995. - P. 269-285
- Bozhkov, P.V. Two alternative pathways of somatic embryo origin from polyembryonic mature store seeds of *Pinus koraiensis* Siebet Zucc. / P.V. Bozhkov, I.S. Ahn, Y.G. Park // Can. J. Bot. 1997. V. 75. - P. 509-512
- Durzan, D.J. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures / D.J. Durzan, P.K. Gupta // Plant Science. 1987. V. 52. - P. 229-235.
- Finer, J.J. Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). / J.J. Finer, H.B. Kriebel, M.R. Becwar // Plant Cell Rep. 1989. V. 8. - P. 203-206
- Jones, N.B. Plantlet production from somatic embryos of *Pinus patula*. / N.B. Jones, J. van Staden // Plant Physiol. 1995. V. 145.- P. 519-525
- Keinonen-Mettälä, K. Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris*. / K. Keinonen-Mettälä, P. Jalonen, P. Eurola, S. von Arnold, K. von Weissenberg // Scand. J. For. Res. 1996. V. 11. - P. 242-250
- Klimaszewska, K. Conifer somatic embryogenesis: I. Development / K. Klimaszewska, D.R. Cyr // Dendrobiology. 2002. V. 48. - P. 31-39.
- Koski, V. Generative reproduction and genetic processes in nature / V. Koski// Genetics of Scots Pine. – Amsterdam.: Elsevier, 1991. - P. 59-72.
- Kutschera, U. The current status of the acid-growth hypothesis / U. Kutschera // New Phytol. 1994. V. 126. - P. 549-569.
- Laine, E. Somatic embryogenesis in immature embryos and protoplasts of *Pinus caribaea*. /E. Laine, D. David// Plant Sci. 1990. V. 69. - P. 215-224
- Lelu, M.A. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix* / M.A. Lelu, M.A. Klimaszewska, P.J. Charest // Can. J. For. Res. 1994. V. 24. № 1. - P. 100-106.
- Litvay, J. 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.) / J. Litvay, D.C. Verma, M.A. Johnson // Plant Cell Rep. 1985. №4. - P. 325-328.
- Malabadi, R.B. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula*. / R.B. Malabadi, J. van Staden // Tree Physiology. 2005. V. 25. - P. 11-16.
- Murashige, T.A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. 1962. V. 15. №4. - P. 473-497.
- Nagmani, R. Somatic embryogenesis in longleaf pine (*Pinus palustris*). / R. Nagmani, A.M. Diner, G.C. Sharma // Can. J. For. Res. 1993. V. 23. - P. 873-876
- Newton, R.J. Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliotii* Engelm.). / R.J. Newton, K.A. Marek-Swize, M.E. Magallanes-Cedeno, N. Dong, S. Sen, S.M. Jain, //Somatic Embryogenesis in Woody Plants. – Dordrecht.: Kluwer Academic Publishers, 1995. - P. 183-195.
- Salajova, T. Somatic embryogenesis in *Pinus nigra* Arn. /T. Salajova, J. Jasik, A. Kormutak// Somatic Embryogenesis in Woody Plants. – Dordrecht.: Kluwer Academic Publishers, 1995. - P. 207-220.
- Sarvas, R. Investigations on the flowering and seed crop of *Pinus sylvestris*. /R. Sarvas// Comm. Inst. For. Finniae. 1962. V 53. - P. 1-198
- Singh, H. Embryology of gymnosperms / H. Singh. – Berlin.: Stuttgart Gebruder Borntraeger, 1978. - P. 187-241.

Поступила в редакцию 11 декабря 2007 г.
Принята к печати 16 мая 2008 г.