

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ ЗАРОДЫШЕЙ У ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ: ЭМБРИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ¹

© 2008 г. А. С. Белоруссова, И. Н. Третьякова

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН
660036 Красноярск, Академгородок

E-mail: culture@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 10.07.06 г.

Окончательный вариант получен 23.07.07 г.

Для инициации соматического эмбриогенеза у лиственницы сибирской были введены в культуру *in vitro* зиготические зародыши на разных стадиях развития. Культивирование проводили на модифицированной среде Мурашиге и Скуга с гормонами – 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2 мг/л) и 6-бензиламинопурином (0.5–1 мг/л). Успешность соматического эмбриогенеза у данного вида связана с генотипом дерева и зависит от стадии развития зародышей, введенных в культуру. Наиболее активно процесс соматического эмбриогенеза протекал из незрелых зиготических зародышей на стадии заложения семядолей. Такие зародыши на 5–10-е сут формировали эмбриогенную ткань, состоящую из двух типов клеток – удлинённых, сильно вакуолизованных эмбриональных трубок и мелких эмбриональных клеток. Из пролиферирующей эмбриогенной ткани на 2-й мес культивирования выделяли соматические зародыши.

Ключевые слова: кливажная полиэмбриония, эмбриогенная ткань, соматические зародыши, лиственница сибирская.

В последнее десятилетие произошел значительный прогресс в области размножения древесных растений в культуре *in vitro*. Наиболее интересные результаты были получены при исследовании соматического эмбриогенеза – способа тиражирования, посредством которого достигается чрезвычайно высокая частота регенерации растений в культуре *in vitro*. По мнению Батыгиной (1994, 1999; Batygina, 2005), соматический эмбриогенез – это новая категория вегетативного размножения, которая приводит к формированию зародыша (эмбриоида) из соматической клетки, формирующегося асексуально в условиях гомофазной репродукции в отсутствие мейоза и оплодотворения. В результате такого феномена из соматической клетки формируется соматический зародыш или эмбриоид (зародышеподобная структура), ведущий к образованию растения.

Соматический эмбриогенез является перспективной модельной системой для изучения закономерностей клеточной дифференцировки и реализации морфогенетической программы развития в процессе эмбриогенеза (Von Arnold et al., 2002).

Впервые процесс соматического эмбриогенеза был описан в культуре *in vitro* *Daucus carota*

(Steward et al., 1958; Reinert, 1958) и в дальнейшем был индуцирован у самых различных видов покрытосеменных растений (Батыгина, 1999; Von Arnold et al., 2002). У голосеменных растений соматический эмбриогенез был индуцирован значительно позже, при этом первым представителем, у которого он был получен, является *Picea abies* (Chalupa, 1985; Nakman et al., 1985). К настоящему времени регенерация растений посредством соматического эмбриогенеза у хвойных получена у 16 видов рода *Pinus*, у 11 видов рода *Picea*, у 4 видов и 2 гибридов рода *Abies*, у 6 видов и гибридов рода *Larix*, а также у *Pseudotsuga menziesii* (Klimaszewska, Cug, 2002). В качестве источника соматических клеток для индукции соматического эмбриогенеза у хвойных используются мегагаметофиты, зрелые и незрелые зародыши и их отдельные органы (семядоли и гипокотиль), хвоя молодых растений (Lelu et al., 1994a), а также сегменты вегетативных побегов взрослых деревьев (Malabadi, Van Staden, 2005).

Несмотря на активные исследования по соматическому эмбриогенезу хвойных в последние годы, регенерация растений таким путем все еще остается проблематичной для ряда видов. Критическим моментом является успешность прохождения поздних стадий и получение полноценных зародышей, способных к прорастанию и производству нормальных растений-регенерантов.

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 06-04-08040-офи), Красноярским краевым фондом науки (проект № 16G-074) и РФФИ-ККФН (проект № 07-04-96810-р_енисей_a).

Исследования соматического эмбриогенеза у сибирских видов лиственниц до сих пор не проводились. Между тем лиственница сибирская является основным лесообразователем хвойных лесов Восточной Сибири. Ее древесина считается наиболее устойчивой к гниению, имеет высокую механическую прочность, и поэтому пользуется быстрорастущим спросом. Однако при выращивании на лесосеменных плантациях данный вид дает низкий урожай семян и к тому же сильно поражается лиственничной почковой галлицей (Баранчиков, 1995). Разработка современных биотехнологий, позволяющих получать быстрорастущие, высокопродуктивные, устойчивые к лиственничной почковой галлице деревья лиственницы сибирской, является весьма актуальной. Обычные методы селекции имеют в этом отношении ограниченные возможности. Применение эффективных инновационных технологий с использованием соматического эмбриогенеза в сочетании с криоконсервацией и генетико-селекционными методами даст возможность для получения, раннего отбора и испытания ценных генотипов, а также их быстрого распространения. Это будет способствовать массовому получению улучшенных высокопродуктивных клонов и чистых линий хвойных растений для клонального лесоводства (Rao, 1993; Park, 2002).

Цель настоящего исследования – разработка эффективных биотехнологических методов тиражирования различных генотипов лиственницы сибирской посредством соматического эмбриогенеза и их оптимизация на основе цитоэмбриологического контроля на каждом этапе эксперимента.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объекты исследований. Объектом настоящих исследований являлись 40-летние деревья лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), устойчивые к поражению лиственничной почковой галлицей, произрастающие в естественных насаждениях на территории Республики Хакасия и в искусственных насаждениях г. Красноярска.

Растительный материал. Семена, собранные с указанных деревьев, разделяли на две части, одну из которых использовали для цитоэмбриологических исследований, а другую – для введения в культуру *in vitro*.

В качестве эксплантов для индукции соматического эмбриогенеза использовали мегагаметофиты и изолированные зиготические зародыши на разных стадиях формирования, полученные в результате свободного опыления.

Мегагаметофиты извлекали из семян и стерилизовали гипохлоритом натрия или раствором йода с 90%-ным спиртом (1 : 3) с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде. Зародыши извлекали из мегагаметофитов в

Таблица 1. Состав питательных сред для индукции и пролиферации эмбриогенной ткани из зиготических зародышей лиственницы сибирской

Компоненты среды	Концентрация веществ в среде, мг/л	
	индукционной	пролиферационной
L-глутамин	1.45*	1.45*
Мезоинозит	0.1	0.1
Ауксин (2,4-D)	2	2
Цитокинин (6-БАП)	1	0.5
Сахароза	30×10^3	15×10^3
Агар	7×10^3	–
Gelrite	–	4×10^3

* Концентрация дана в г/л.

стерильных условиях и помещали на питательную среду по 10 шт. на стеклянную колбу.

Инокуляцию зародышей на питательную среду осуществляли на следующих четырех стадиях:

I – глобулярной (длина зародыша <1 мм, 1-я декада июля, фаза раннего эмбриогенеза);

II – инициации семядолей, апексов побега и корня (длина зародыша 2 мм, 2-я декада июля, фаза позднего эмбриогенеза);

III – сформированного зародыша (семядоли и другие органы полностью сформированы) (длина зародыша 2–3 мм, 3-я декада июля, 1-я декада августа, фаза позднего эмбриогенеза);

IV – зрелого зародыша (длина 3 мм, 3-я декада августа).

Среды для культивирования. Методика получения соматических зародышей у хвойных включает ряд последовательных стадий, требующих определенного состава сред и гормональных добавок: инициацию эмбриогенной ткани, пролиферацию ее клеток с образованием соматических зародышей и их созреванием. Эти стадии различаются по длительности и условиям культивирования.

Во всех экспериментах использовали основную среду MSG (Vecwar et al., 1990) с добавлением 1.45 г/л L-глутамин и 0.1 г/л мезоинозита (Lelu et al., 1994b). В индукционной среде в качестве гормонов использовали 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-D) и 6-бензиламинопуридин (6-БАП) в концентрациях 2 и 1 мг/л для 2,4-D и 6-БАП соответственно. В пролиферационной среде концентрация ауксинов оставалась без изменений, а концентрации цитокининов и сахарозы уменьшались в два раза; агар был заменен на gerlite (табл. 1).

Индукцию эмбриогенной ткани проводили в течение 1–2, а пролиферацию – 6 мес с регулярными пересадками через каждые 2 нед. Культуры выдерживали в темноте при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

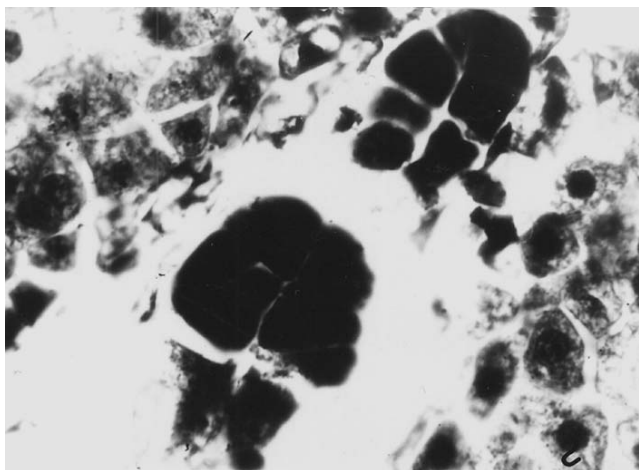


Рис. 1. Два зародыша на глобулярной стадии развития в коррозионной полости женского гаметофита лиственницы сибирской, возникшие в результате оплодотворения двух яйцеклеток.

Цитологический анализ и статистическая обработка данных. Для проведения цитологического анализа использовали постоянные и давленные препараты. Приготовление постоянных препаратов проводили по стандартным методикам и окрашивали гематоксилином по Гайденгайну (Паушева, 1980). Для приготовления давленных препаратов экспланты помещали на предметное стекло и 1–2 мин выдерживали в красителе (сафранин с добавлением метиленового синего) (Паушева, 1980), далее добавляли глицерин и накрывали препарат покровным стеклом.

Просмотр препаратов осуществляли на микроскопе МБИ-6. Замеры клеток и эмбриональных структур проводили при помощи окуляр-микрометра с последующим переводом полученных единиц в мкм. Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам при помощи Microsoft Excel. Для оценки достоверности полученных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ. Морфологические изменения фиксировали цифровой фотокамерой Fujifilm FinePix S7000 (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эмбриогенез лиственницы сибирской in vivo. Развитие зародыша у лиственницы сибирской проходит аналогично другим видам лиственниц и состоит из трех последовательных (характерных для сем. Pinaceae в целом) фаз: проэмбриогенез, ранний эмбриогенез и поздний эмбриогенез. Проэмбриогенез включает стадии формирования проэмбрио, в том числе формирование и удлинение его первичного суспензора; ранний эмбриогенез – формирование глобулярного зародыша, образование и удлинение вторичного суспензора; поздний

эмбриогенез – заложение в зародыше меристем корня и побега, семядолей, а также все последующие события, связанные с формированием органов и созреванием зародыша (Singh, 1978; Третьякова, 1990).

Проэмбриогенез. После оплодотворения ядро зиготы делится дважды, в результате чего формируется 4-ядерный ценоцит. Ядра опускаются в основание архегония и делятся, формируя 8 свободных ядер, расположенных в два ряда. После этого между ними происходит заложение клеточных стенок (за исключением верхней стороны верхнего ряда) с образованием двух слоев, названных первичным верхним слоем и первичным эмбриональным слоем (Singh, 1978). Первичный верхний слой клеток делится и формирует верхний и суспензорный слои, которые в дальнейшем подвергаются деградаци. Первичный эмбриональный слой продуцирует два эмбриональных слоя – верхний и нижний. У лиственницы, как и у большинства представителей сем. Pinaceae, клетки нижнего эмбрионального слоя представляют собой инициали собственно зародыша, тогда как таковые верхнего образуют ряд клеток первичного суспензора, или эмбриональные трубки. Удлинение эмбриональных трубок вызывает продвижение зародыша в коррозионную полость, что служит сигналом окончания фазы проэмбриогенеза и перехода к раннему эмбриогенезу (Von Aderkas et al., 1991).

В процессе *раннего эмбриогенеза* (первая декада июля) у лиственницы сибирской наблюдается активное деление клеток нижнего эмбрионального слоя, в результате чего образуется тело глобулярного зародыша. Клетки первичного суспензора (эмбриональные трубки) также подвергаются делению и превращаются во вторичный суспензор, клетки которого интенсивно растягиваются и продвигают глобулярный зародыш в центр женского гаметофита. Наличие процесса кливажной полиэмбрионии, характерного для раннего эмбриогенеза большинства представителей сем. Pinaceae, у лиственницы сибирской мы не наблюдали. Однако в коррозионной полости женского гаметофита часто видно образование двух глобулярных зародышей, вероятно, возникающих в результате оплодотворения двух яйцеклеток (рис. 1).

Поздний эмбриогенез у Larix характеризуется заложением апикальных меристем побега и корня и процессами их гистогенеза. Наиболее активно гистогенез осуществляется в апексе зародышевого корня: клетки верхней части вторичного суспензора преобразуются в так называемый ретикулум – предшественник корневого чехлика, центральная часть которого преобразуется в колонку (колумеллу), состоящую из четко упорядоченных рядов клеток, а периферическая – в периколюмн. Выше чехлика расположены инициали остальных тканевых зон меристемы корня – его

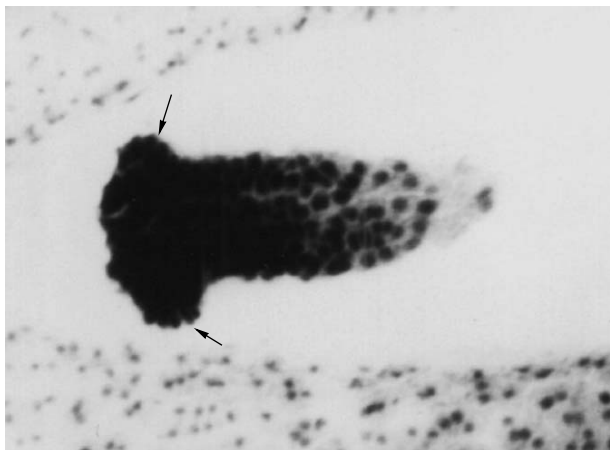


Рис. 2. Выпячивания на поверхности формирующегося зародыша лиственницы сибирской на стадии позднего эмбриогенеза.

первичной коры и центрального цилиндра. Процесс формирования меристемы побега начинается с того, что деления клеток апикальной части глобулярного зародыша, ранее осуществляющиеся во всех направлениях, становятся упорядоченными и приводят к образованию в центре апекса побега. В периферической части закладываются семядоли. В этот период на поверхности формирующегося зародыша наблюдаются выпячивания (рис. 2). Не исключено, что именно таким образом реализуется процесс замедленной кливажной полиэмбрионии, обнаруженной Шопфом у лиственниц (Schopf, 1943). К концу позднего эмбриогенеза (первая декада августа) зрелый зародыш состоит из 6–7 хорошо развитых семядолей и гипокотыля, на противоположных концах которого расположены апексы побега и корня; гипокотиль дифференцирован на первичную кору и центральный цилиндр, апекс корня покрыт хорошо развитым корневым чехликом с отчетливой центральной колонкой и периферическим периколумном.

Соматический эмбриогенез у лиственницы сибирской. Проведенные исследования показали, что успешное формирование соматических зародышей у лиственницы сибирской зависит от срока сбора семян, стадии введения изолированных зародышей в культуру и гормонального компонента питательной среды. Зиготические зародыши, введенные в культуру *in vitro* на разных стадиях развития (глобулярной, инициации семядолей, апексов побега и корня, сформированного и зрелого зародыша) в разной степени обладали способностью к индукции соматического эмбриогенеза.

Зиготические зародыши в глобулярной стадии развития, собранные в первой декаде июля (стадия I), формировали соматические зародыши только в 20% случаев. При этом они возникали

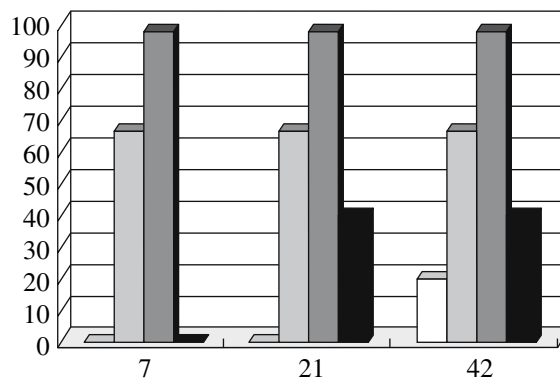


Рис. 3. Формирование эмбрионной ткани из зиготических зародышей лиственницы сибирской (по оси ординат, %) на разных стадиях развития: (□) – глобулярная; (▒) – инициация семядолей; (■) – поздний эмбриогенез; (■) – зрелые зародыши. По оси абсцисс – продолжительность культивирования, сут.

только на 48-е сут и обладали низкой пролиферационной активностью клеток (рис. 3).

Наиболее оптимальными для индукции соматического эмбриогенеза оказались стадии инициации семядолей и апекса побега (II), а также более поздние стадии развития зиготических зародышей (III) (рис. 4): на стадии II соматические зародыши активно формировались у 66,7% зиготических зародышей, на стадии III – у 98% (рис. 3).

У эксплантов, введенных в культуру на этих стадиях под влиянием двух гормонов – ауксина (2,4-D) и цитокинина (6-БАП) – уже на 5-е сут культивирования клетки зародыша на границе суспензора и зародышевого корешка начинали интенсивно растягиваться, достигая длины 191.7 ± 6.9 мкм (по сравнению с исходной длиной 62.5 ± 6.5 мкм). Такие удлиненные клетки, очень похожие на клетки эмбрио-

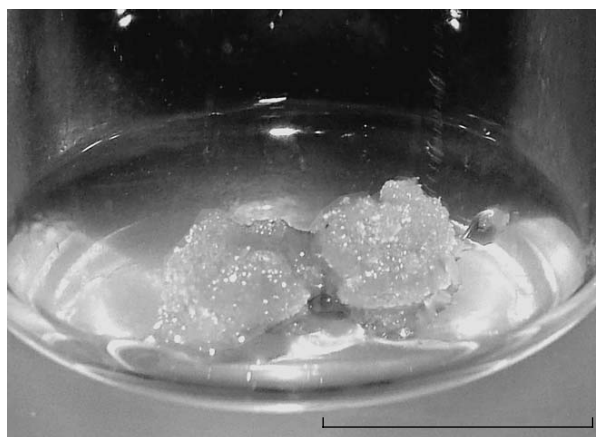


Рис. 4. Формирование эмбрионной ткани из зиготического зародыша лиственницы сибирской на стадии инициации семядолей (10 сут культивирования). Масштаб: 1 см.

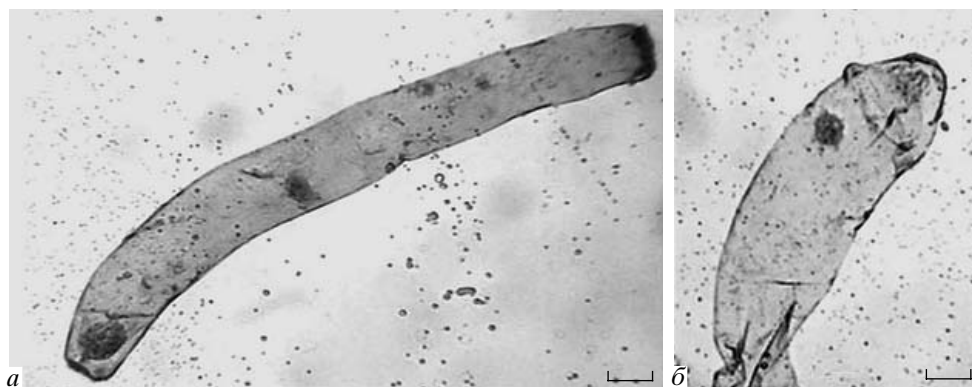


Рис. 5. Асимметричное деление клетки эмбриональной трубки лиственницы сибирской через 10 сут культивирования: *a* – деление ядра материнской клетки; *б* – формирование клеточной перегородки между двумя ядрами. Масштаб: 30 мкм.

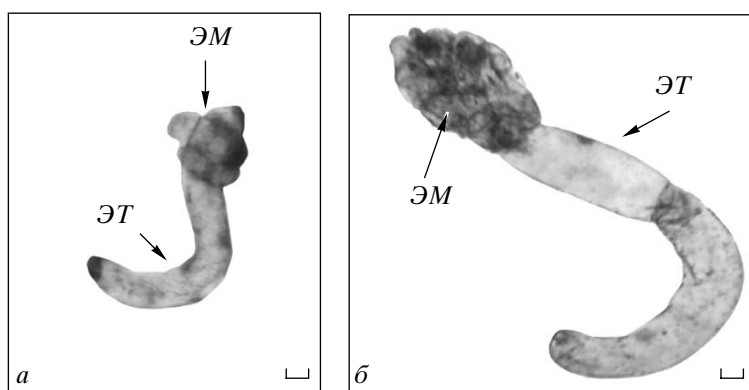


Рис. 6. Клеточные конгломераты, полученные из зиготического зародыша лиственницы сибирской на стадии инициации семядолей на 15-е (*a*) и 20-е (*б*) сут культивирования. ЭМ – эмбриональная масса; ЭТ – эмбриональные трубки. Масштаб: 10 мкм.

нальных трубок первичного суспензора, Арнольд с соавторами (Von Arnold et al., 2002), впервые наблюдавшие их в культуре зародышей, назвали эмбриональными трубками. Эти клетки подвергались дальнейшему растяжению и неравному делению, в результате которого на одном из полюсов формировались небольшие клетки диаметром 39.2 ± 1.2 мкм (рис. 5). Таким образом, каждая эмбриональная трубка продуцировала одну маленькую эмбриональную инициаль и новую эмбриональную трубку. В течение следующих 5–7 сут клетки эмбриональных инициалей продолжали делиться и формировали глобулярный соматический зародыш (эмбрионид). Клетки эмбриональных трубок, примыкающие к глобулярному эмбриониду, также продолжали делиться и формировали дополнительные эмбриональные трубки и эмбриональные инициали, которые в свою очередь образовывали новые соматические зародыши. В итоге на 12–15-е сут культивирования в области зародышевого корня зиготического зародыша формировалась эмбрионная ткань, представленная двумя типами кле-

ток – совокупностью соматических зародышей, состоящих из собственно эмбриональной глобулы с мелкими (диаметром 39.4 ± 0.5 мкм) меристематическими клетками и большими ядрами, и примыкающих к ним крупных, вытянутых, сильно вакуолизованных клеток эмбриональных трубок (суспензорной части) (рис. 6).

Перенос эксплантов через 1 мес на пролиферационную среду с пониженным содержанием цитокининов и сахарозы вызывал активную пролиферацию клеток эмбрионной ткани, выражавшуюся в увеличении размеров эмбриональных глобул и числа эмбриональных трубок. На 1 мм^3 эмбрионной ткани насчитывалось до 75 ± 5.6 соматических зародышей на глобулярной стадии, которые в течение 1 мес культивирования переходили к торпедовидной стадии развития (рис. 7). Соматические зародыши имели четкую биполярную структуру: на одном из полюсов формировались апекс побега и примордии семядолей, на другом – апекс зародышевого корня; к последнему примыкал хорошо развитый суспензор.

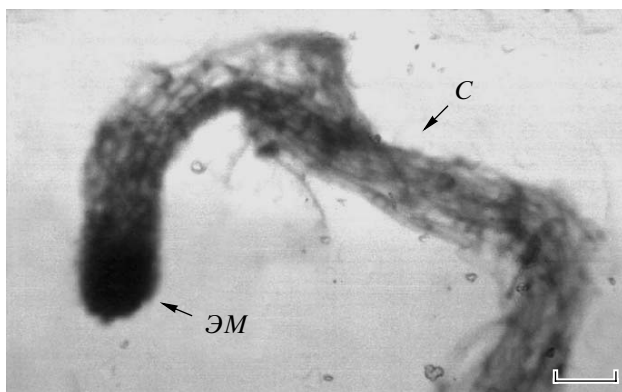


Рис. 7. Соматический зародыш лиственницы сибирской, полученный через 2 мес культивирования. ЭМ – эмбриональная масса; С – суспензор. Масштаб: 200 мкм.

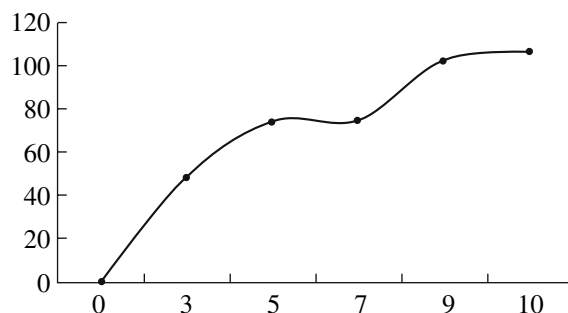


Рис. 8. Изменение объема эмбрионного каллуса (по оси ординат, мм³), полученного из зиготических зародышей лиственницы сибирской на стадии позднего эмбриогенеза в зависимости от времени культивирования (по оси абсцисс, мес).

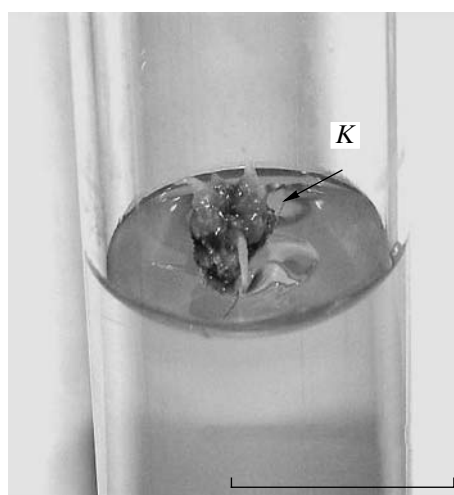
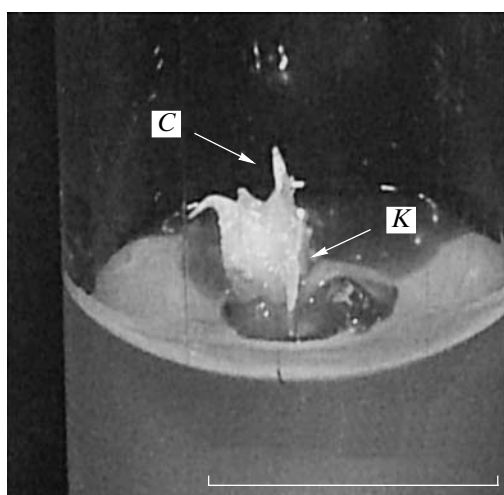


Рис. 9. Развитие семядолей (С) и формирование неэмбрионного каллуса (К) у зрелых зиготических зародышей лиственницы сибирской. Масштаб: 1 см.

Полученная эмбрионная ткань могла долгое время поддерживаться на пролиферационной среде без потери активности. При этом на протяжении всего срока культивирования происходил интенсивный прирост эмбрионной ткани, исключение составил некоторый спад его активности на 5–7-е мес культивирования (рис. 8). В целом активность пролиферации эмбрионной ткани и ее способность к продуцированию соматических зародышей при постоянной пересадке может поддерживаться в культуре в течение 1–2 лет.

Развитие зрелых зиготических зародышей лиственницы сибирской в культуре *in vitro* происходило неоднородно. Так, у 30% зародышей в индукционной среде наблюдался начальный этап прорастания, выражавшийся в активном росте семядолей и гипокотыля, на котором через 10 сут культивирования формировался неэмбрионный

каллус (рис. 9), состоящий из однородных округлых клеток с крупным, расположенным в центре ядром.

У 40% зародышей прорастания не происходило: на одном и том же экспланте наблюдалось заложение очагов неэмбрионного каллуса, а также формирование эмбрионной ткани тем же способом, что и у зародышей, введенных в культуру на ранних стадиях развития, но эти процессы заканчивались формированием лишь единичных соматических зародышей (рис. 10).

Помимо стадии развития на формирование эмбрионной ткани влиял и генотип растения-донора. Так, из пяти исследованных генотипов лиственницы сибирской наиболее интенсивное формирование эмбрионной ткани из зародышей, находящихся на стадии инициации семядолей, на 7-е сут было отмечено у генотипа Д₂, а наимень-

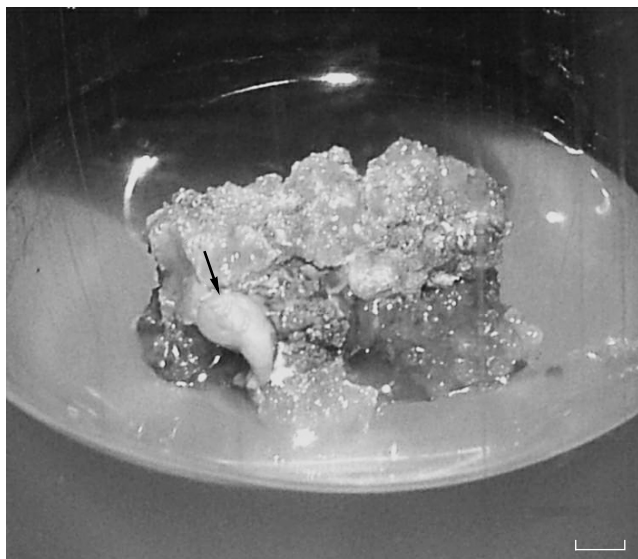


Рис. 10. Соматический зародыш, полученный при культивировании в течение 4 мес зрелых зиготических зародышей лиственницы сибирской. Масштаб: 1 мм.

шее – у Д₅ (табл. 2). В дальнейшем генотипы Д₂₋₅ не обнаруживали достоверных различий в количестве эксплантов, формирующих эмбриогенную ткань (90–98%), тогда как генотип Д₁ формировал наименьшее количество таких эксплантов.

Таким образом, зиготические зародыши лиственницы сибирской, введенные в культуру на разных стадиях развития, способны продуцировать соматические зародыши (под действием гормонов – ауксинов и цитокининов) посредством удлинения и пролиферации клеток в области зародышевого корешка (периколумна), образования эмбриональных трубок и эмбриогенной ткани.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эволюции у многих видов растений возникли различные типы бесполого (в широком

Таблица 2. Формирование эмбриогенной ткани из зиготических зародышей лиственницы сибирской (стадия инициации семядолей) в зависимости от генотипа растения-донора

Генотип растения-донора	Формирование ткани, % при культивировании	
	7 сут	14 сут
Д ₁	66.7	66.7
Д ₂	98	98
Д ₃	70.4	91.3
Д ₄	55	95
Д ₅	40	90

смысле слова – вегетативного) размножения для сохранения фертильности и преодоления неблагоприятных факторов среды (Батыгина и др., 1978; Батыгина, 1994; Von Arnold et al., 2002; Batygina, 2005). Одним из способов вегетативного размножения является апомиксис, при котором образование нового индивидуума идет внутри семени при отсутствии оплодотворения (Батыгина и др., 1978; Батыгина, 1994; Batygina, 2005). При этом апомиксис широко распространен у покрытосеменных растений (Поддубная-Арнольди, 1976) и наиболее часто встречается у прогрессивных и высокоорганизованных семейств (Хохлов, 1970; Минина, Ларионова, 1979).

Признаки проявления апомиксиса были обнаружены и у голосеменных растений (Минина, Ларионова, 1979). Образование семян с зародышем без оплодотворения было показано в работах с *Pinus pinaster* (Saxton, 1909), *Pinus nigra*, *Pinus wallichiana* (Mehra, Dogra, 1975), *Pseudotsuga menziesii* (Orr-Ewing, 1957) и рядом других видов. Явление, близкое к апомиксису, было обнаружено у *Abies pindrow*, у которой происходило слияние ядра брюшной канальцевой клетки с ядром яйцеклетки (Dogra, 1966).

Высказано предположение о том, что возникновение апомиксиса у хвойных происходит при нарушении семеношения, особенно часто наблюдаемое у гетерозисных форм (Минина, Ларионова, 1979). Такие формы деревьев у сосны сибирской (*Pinus sibirica*), систематически встречаемые в Западном Саяне, продуцируют женские шишки и семена, развивающиеся по однолетнему циклу (вместо двухлетнего), и характеризуются высоким физиолого-биохимическим потенциалом вегетативных и генеративных органов, который проявляется в углеводном, аминокислотном и гормональном обмене. Позже один из авторов настоящей статьи (Третьякова, 1990) у гетерозисных особей кедра сибирского обнаружил деление неоплодотворенной яйцеклетки, однако вследствие проявления гаметофитной несовместимости сформировавшиеся семена оказались беззародышевыми. Признаки апомиксиса были обнаружены и у сосны обыкновенной с нарушенным семеношением, произрастающей в условиях экологического стресса (Третьякова, 1990).

Приводятся литературные данные по индукции апомиксиса как у покрытосеменных, так и голосеменных растений веществами гормональной природы, экстремальными температурами, облучением и другими факторами. Так, при обработке дугласии растворами индолмасляной и гибберелловой кислот происходило образование вполне развитых семян с зародышами (Stuard, Cathey, 1961; Stattler et al., 1969).

Таким образом, образование семян с зародышами без оплодотворения у ряда видов сосен (Saxton, 1909; Dogra, 1966) и дугласии (Orr-Ewing, 1957),

а также деление неоплодотворенной яйцеклетки у кедра сибирского (Третьякова, 1990) свидетельствуют о том, что предпосылки для возникновения растительных организмов асексуально (минуя половой процесс) у голосеменных в природных условиях встречаются и они могут быть индуцированы обработкой фитогормонами.

Кроме того, хорошо известно, что для семян чечек голосеменных растений характерно наличие полиархеогониальности и полиэмбрионии (Singh, 1978). Оплодотворение двух и более яйцеклеток в пределах семязачатка хвойных и последующий кливаж клеток образующихся зиготических зародышей приводит к возникновению множественных зародышей в одном мегагаметофите (у сосен иногда до 16), полученных от разных отцов (Третьякова, 1990).

Следовательно, у представителей хвойных растений потенциально заложены множественные пути реализации их репродуктивного потенциала: возможность асексуального возникновения зародыша, наличие простой и кливажной полиэмбрионии. Реализация этого репродуктивного потенциала широко проявляется в экспериментальных условиях культуры *in vitro* и, прежде всего, через соматический эмбриогенез.

Соматический эмбриогенез был индуцирован у родов *Pinus*, *Picea*, *Abies* и *Larix* не только из зиготических зародышей и семядолей прорастающих семян (Lelu, 1994a; Klimaszewska, Cyr, 2002; Stasolla, Yeung, 2003), но и из однолетних побегов (Malabadi, Van Staden, 2005). К этому же явлению можно отнести и полученные нами ранее эмбриониды микроспориального происхождения у лиственницы сибирской (Иванова и др., 2006).

В настоящей работе соматический эмбриогенез у лиственницы сибирской был индуцирован из клеток зиготических зародышей, изолированных на разных стадиях развития в культуре *in vitro*.

Экспериментальным путем было показано, что индукция и реализация соматического эмбриогенеза – процесс многоступенчатый, включающий применение разнообразных химических соединений и многочисленных различных предобработок. Он включает:

- индукцию эмбрионной ткани;
- пролиферацию эмбрионной ткани;
- созревание соматических зародышей;
- прорастание зародышей и формирование растений-регенерантов.

Все эти процессы проходят у зиготических зародышей лиственницы сибирской в культуре *in vitro* под действием гормональной обработки ауксиновой (2,4-Д) и цитокининовой (6-БАП) природы. Индукция проявлялась в появлении эмбрионной ткани, состоящей из удлинённых клеток – эмбриональных трубок, и эмбриональных инициа-

лей, активно делящихся и образующих эмбриональные глобулы. Возникновению эмбрионной ткани предшествовало резкое увеличение длины клеток в области зародышевого корешка (периколумна) зиготического зародыша, происшедшее, вероятно, под действием ауксина. Эти удлинённые клетки – эмбриональные трубки – подвергались асимметричному делению и формировали на одном из полюсов мелкие эмбриональные клетки.

Пролиферация эмбриональных клеток приводила к образованию отдельных меристематических глобул, активно продуцирующих как новые эмбриональные клетки, так и дополнительные эмбриональные трубки. По предложенной классификации (Von Arnold et al., 2002), возникновение клеточных конгломератов у ели (*Picea abies*) было отмечено как проэмбриональная масса I (ПЭМ I). Пролиферация эмбрионной ткани соответствовала стадии ПЭМ II, которая плавно переходила в ПЭМ III. На стадии ПЭМ III и происходило выделение соматических зародышей из эмбриональной массы (Von Arnold et al., 2002). Формирование эмбрионной ткани и образование соматических зародышей у лиственницы сибирской укладывается в предложенную схему (Von Arnold et al., 2002). Полученные соматические зародыши лиственницы сибирской имели ярко-выраженную биполярную структуру и морфологически были идентичны зиготическим зародышам данного вида.

Согласно классификации типов эмбриогенеза голосеменных растений (Singh, 1978), возникновение проэмбрио и степень его участия в образовании основных частей зародыша у сосновых происходит единообразно.

У зиготических зародышей лиственницы сибирской *проэмбриогенез* происходит до удлинения первичного суспензора, *ранний эмбриогенез* начинается после удлинения суспензора и продолжается до заложения меристемы корня, *поздний эмбриогенез* характеризуется интенсивным гистогенезом и формированием биполярной структуры зародыша (Singh, 1978; Третьякова, 1990). Проэмбриогенез у лиственницы *in vivo* начинается со свободнойядерной стадии развития, так же как у других представителей семейства *Pinaceae*. Образующийся 16-клеточный проэмбрио состоит из морфологически одинаковых клеток, отличающихся, однако, местом их расположения в системе проэмбрио. Способностью к растяжению обладают лишь клетки предпоследнего яруса, которые берут на себя функции первичного суспензора, т.е. формируют эмбриональные трубки, продвигающие эмбриональные инициалы в ткань женского гаметофита.

При инициации соматического эмбриогенеза у незрелых зиготических зародышей лиственницы сибирской *in vitro* интенсивному растяжению (под влиянием гормонов) подвергаются клетки перико-

люмна. При этом образующиеся из них эмбриональные трубки внешне не отличаются от таковых зиготического зародыша, однако делятся асимметрично с отделением новой эмбриональной трубки и эмбриональной инициали, из которых формируется будущий соматический зародыш. Таким образом, в отличие от зиготического зародыша, где у морфологически однородных клеток 16-клеточного проэмбрио, образующихся в результате равного деления, происходит разделение функций (на формирование суспензорной части и собственно зародыша), в соматическом зародыше такое разделение происходит только после удлинения и неравного деления единственной инициальной клетки. Далее при развитии как зиготического, так и соматического зародыша наблюдается процесс отмирания старых эмбриональных трубок после деления и формирования новых эмбриональных трубок. Однако если в зиготическом зародыше этот процесс идет упорядоченно, в одном направлении, то в соматическом – беспорядочно, при этом формирование суспензора может происходить в любом месте эмбриональной глобулы. Указанные различия в образовании и развитии эмбриональных трубок при зиготическом и соматическом эмбриогенезе, вероятно, предопределены их различным положением в системе проэмбрио/зародыш, а также связаны с особенностями поступления к ним питательных веществ: у зиготических зародышей – из мегагаметофита и окружающих его тканей, у соматических – из питательной среды. В остальном процессы формирования зиготических и соматических зародышей являются сходными.

Следует отметить, что у большинства представителей семейства Pinaceae на стадии 16-клеточного проэмбрио наблюдается процесс кливажной полиэмбрионии. При внедрении проэмбрио в зародышевый канал рост эмбриональных трубок происходит неравномерно, и инициальные единицы проэмбрио расщепляются на самостоятельные, каждая из которых формирует глобулярный зародыш (Третьякова, 1990). У исследованной нами лиственницы сибирской процесс типичной кливажной полиэмбрионии не наблюдался. Отчленение частей зародыша у нее *in vivo* происходит, вероятно, на более поздних этапах развития. Не исключено, что этот феномен и есть проявление так называемой замедленной кливажной полиэмбрионии, описанной у ряда видов лиственниц (Schopf, 1943; Тренин, 1986). Механизм образования соматических зародышей у исследованного нами вида лиственницы, по-видимому, в определенной мере можно сопоставить с этим явлением, что является предметом дальнейшего исследования.

Таким образом, процесс соматического эмбриогенеза у лиственницы сибирской в культуре *in vitro*, так же как и зиготический эмбриогенез, – процесс многоступенчатый, проходящий стадию проэмбри-

онального развития, раннего и позднего эмбриогенеза, заканчивающийся формированием биполярной структуры зародыша, несущего на одном конце гипокотилия семядоли и апекс побега, а на другом – зародышевый корешок.

В заключение следует отметить и тот факт, что успешность соматического эмбриогенеза может быть связана с генотипом донорского растения. Экспланты, введенные в культуру с одних деревьев, более активно формируют эмбриогенную ткань и соматические зародыши, в то время как экспланты других деревьев не способны образовывать подобные структуры в культуре *in vitro*. Не исключено, что гетерозисные деревья, обладающие высоким репродуктивным потенциалом и проявляющие признаки апомиксиса, будут наиболее перспективными при введении в культуру *in vitro* для получения соматических зародышей и создания банка эмбриогенного каллуса с целью проведения генетико-селекционных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баранчиков Ю.Н. Этапы морфогенеза вегетативных почек лиственницы сибирской и его модификация на сексомыми-галообразователями // Ботан. исследования в Сибири. 1995. Вып. 4. С. 12–18.
- Батыгина Т.Б. Пыльник как модель изучения морфогенетических потенций и путей морфогенеза // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепция. Т. 1. Генеративные органы цветка. СПб.: Мир и семья, 1994. С. 120–121.
- Батыгина Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 6. С. 884–898.
- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е., Маметьева Т.Б. Проблемы морфогенеза *in vivo* и *in vitro* (эмбриогенез у покрытосеменных) // Ботан. журн. 1978. Т. 63. № 1. С. 87–111.
- Иванова А.Н., Третьякова И.Н., Вязовецкова А.С. Индукция андрогенных культур у лиственницы сибирской // Онтогенез. 2006. Т. 3. № 1. С. 32–42.
- Минина Е.Г., Ларионова Н.А. Морфогенез и проявление пола у хвойных. М.: Наука, 1979. 216 с.
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980. 340 с.
- Поддубная-Арнольди В.А. Общая эмбриология покрытосеменных растений. М.: Наука, 1976. 507 с.
- Тренин В.В. Цитоэмбриология лиственницы. Л.: Наука, 1986. 88 с.
- Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных: физиологические аспекты. Новосибирск: Наука, 1990. 157 с.
- Хохлов С.С. Эволюционно-генетические проблемы апомиксиса у покрытосеменных растений // Апомиксис и селекция. М.: Наука, 1970. С. 7–21.
- Batygina T.B. Sexual and asexual growths in reproductive systems of flowering plants // Acta Biol. Cracow. Ser. Botanica. 2005. V. 47. № 1. P. 51–60.

- Becwar M.R., Nagmani R., Wann S.R.* Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*) // *Can. J. For. Res.* 1990. V. 20. P. 810–817.
- Chalupa W.* Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) // *Karst. Com. Inst. For. Cech.* 1985. V. 14. P. 57–63.
- Dogra P.D.* Observation on *Abies pindrow* with a discussion on the question of occurrence of apomixes in Gymnosperm // *Silvae Genet.* 1966. V. 15. № 1. P. 11–20.
- Hakman I., Fowke L.C., Von Arnold S. et al.* The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce) // *Plant Sci.* 1985. V. 38. P. 53–59.
- Klimaszewska K., Cyr D.R.* Conifer somatic embryogenesis: I. Development // *Dendrobiology.* 2002. V. 48. P. 31–39.
- Lelu M.A., Klimaszewska K., Charest P.J.* Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix* // *Can. J. For. Res.* 1994a. V. 24. № 1. P. 100–106.
- Lelu M.A., Bastien C., Klimaszewska K., et al.* An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix leptoeuropaea*). I Somatic embryo maturation // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1994b. V. 36. P. 107–115.
- Malabadi R. B., Van Staden J.* Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula* // *Tree Physiology.* 2005. V. 25. P. 11–16.
- Mehra P.N., Dorga P.D.* Embryogeny of Pinaceae. I. Proembryogeny // *Proc. Indian. Nat. Sci. Acad.* 1975. V. 41. № 5. P. 486–497.
- Orr-Ewing A.L.* Possible occurrence of viable unfertilized seeds in *Douglas-fir* // *Forest Sci.* 1957. V. 3. № 3. P. 243–248.
- Park Y.-S.* Implementation in conifers somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirement and development considerations // *Ann. For. Sci.* 2002. V. 59. P. 651–656.
- Rao A.N.* Recent researches on propagation of tropical forest trees // *Proc. Inter. Workshop BIO-REFOR.* Jogyakarta, 1993. P. 21–30.
- Reinert J.* Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen // *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 1958. V. 71. P. 218–226.
- Saxton W.T.* Partenogenesis in *Pinus pinaster* // *Bot. Gaz.* 1909. V. 47. P. 406–409.
- Schopf J.M.* The embryology of *Larix* // *Illinois Biol. Monogr.* 1943. V. 19. P. 1–97.
- Singh H.* Embryology of gymnosperms. Berlin; Stuttgart: Gebrüder Borntraeger, 1978. P. 187–241.
- Stasolla C., Yeung E. C.* Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2003. V. 74. P. 15–35.
- Stattler R.F., Bawa K.S., Livingston G.K.* Experimental induction of haploid parthenogenesis in forest trees // *Induced maturations of plants.* Vienna: Intern. Atomic Energy Agency, 1969. P. 611–619.
- Steward F.C., Mapes M.O., Hears K.* Growth and organized development of cultured cells. II. Growth and division of freely suspended cells // *Am. J. Bot.* 1958. V. 45. P. 705–708.
- Stuard W.N., Cathey H.M.* Applied aspects of the gibberellins // *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 1961. V. 12. P. 369–394.
- Von Aderkas P., Bonga J., Klimaszewska K., Owens J.* Comparison of larch embryogeny *in vivo* and *in vitro* // *Woody plant biotechnology.* N.Y.: Plenum press, 1991. P. 139–155.
- Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P. et al.* Developmental pathways of somatic embryogenesis // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2002. V. 69. P. 233–249.

Patterns of Somatic Embryo Formation in Siberian Larch: Embryological Aspects

A. S. Belorussova and I. N. Tret'yakova

*Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Academgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

e-mail: culture@ksc.krasn.ru

Abstract—Somatic embryogenesis was induced in Siberian larch by *in vitro* culturing zygotic embryos at different developmental stages. Cultures were grown in modified Murashige and Skoog medium supplemented with hormones 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2 mg/l) and 6-benzylaminopurine (0.5–1 mg/l). The success of somatic embryogenesis in this species depended on the tree genotype and developmental stage of embryos used for culturing. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos at the stage of cotyledon initiation was most active. After 5–10 days, such embryos formed the embryogenic tissue including two cell types—elongated highly vacuolated embryonic tubes and small embryonic cells. Somatic embryos were isolated from proliferating embryogenic tissues after 2 months of culture.

Key words: cleavage polyembryony, embryogenic tissue, somatic embryos, Siberian larch.