ОНТОГЕНЕЗ, 2018, том 49, № 4, с. 251–263

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭМБРИОЛОГИЯ

УДК 581.3,582.475.2

СОМАТИЧЕСКИЙ ПОЛИЭМБРИОГЕНЕЗ *Larix sibirica* В ЭМБРИОГЕННОЙ КУЛЬТУРЕ *in vitro*

© 2018 г. И. Н. Третьякова[a], *, М. Э. Пак[a]

[a] *Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН 660036 Красноярск, Академгородок 50, стр. 28, Россия*

**E-mail: culture@ksc.krasn.ru*

Поступила в редакцию 11.01.2017 г.

Проводили изучение инициации соматических зародышей и их размножения в длительно пролиферирующей эмбрионально-суспензорной массе *Larix sibirica*. Выявлено, что увеличение числа соматических зародышей в эмбриогенной культуре происходит в результате кливажа глобул соматического зародыша, а затем и суспензора, реже почкования суспензора и разобщения эмбриональных трубок суспензора. У длительно пролиферирующих клеточных линий (более 8 лет) темп кливажирования не ослабевал. Сделано заключение об идентичности морфогенных процессов, лежащих в основе развития зиготических и соматических зародышей хвойных видов, что подтверждает концепцию Т.Б. Батыгиной (1999) о параллелизме их развития *in vivo* и в культуре *in vitro*.

Ключевые слова: Larix sibirica, эмбрионально-суспензорная масса, кливаж глобулярных зародышей, почкование, эмбриональные трубки *in vitro* и *in vivo*

DOI: 10.1134/S0475145018010068

ВВЕДЕНИЕ

В основе размножения большинства эукариот, в том числе хвойных видов лежит половая и вегетативная репродукция. Процессы развития эмбриональных структур у хвойных синхронизированы взаимодействием микро- и мегагаметофитов, начиная с момента прорастания пыльцы до оплодотворения. Течение эмбриологических процессов обусловлено видовой спецификой и внутривидовыми свойствами организма (физиолого-биохимическими и генетико-молекулярными особенностями), а также находится под контролем внешней среды (Некрасова, 1972; Третьякова, 1990; Singh, 1978).

Вместе с тем, у представителей хвойных растений заложены множественные пути реализации репродуктивного потенциала: возможность асексуального возникновения зародыша, полиэмбриония, в том числе кливаж. Реализация этого репродуктивного потенциала широко проявляется в экспериментальных условиях культуры *in vitro*, и, прежде всего, через соматический эмбриогенез.

Регенерация клеток через соматический эмбриогенез у растений является многоступенчатым процессом. Этот процесс у хвойных более сложный и включает несколько стадий: инициацию (индукцию), пролиферацию, созревание соматических зародышей, прорастание соматических зародышей, получение регенерантов и акклиматизацию соматических сеянцев.

Пролиферирующая эмбриогенная культура хвойных характеризуется, как полупрозрачная масса незрелых соматических (глобулярных) зародышей – эмбрионально-суспензорная масса (*embryonal suspensor masses* – ЭСМ) (Stasolla et al., 2003). До сих пор не сложилось единого взгляда на механизм инициации и увеличение числа глобулярных зародышей в ЭСМ.

Разными исследователями были предложены следующие механизмы формирования соматических зародышей:

формирование соматических зародышей в результате асинхронного деления отдельных клеток экспланта (von Arnold, Hakman, 1988; Белоруссова, Третьякова, 2008);

кливажная полиэмбриония (von Aderkas et al., 1991);

формирование соматических зародышей в результате деления клеток, располагающихся в суспензоре (Stasolla, Yeung, 2003).

Зародышевые структуры у покрытосеменных растений *in vivo* и *in vitro* неоднократно описывались в литературе (Haccius, 1955; Erdelska, Vidovensova, 1992, 1994; Батыгина 1999, 2007). Эти образования относили к разряду явления “вегетативной полиэмбрионии”, возникающей партеногенетически под действием ростовых веществ (Яковлев, Снегирев, 1954), действием рентгеновского облучения или ингибиторами полярного транспорта ауксинов (цит. по Титова и др., 2016).

У голосеменных растений, особенно из семейства *Pinaceae*, ярко выражен феномен кливажной полиэмбрионии *in vivo*, в результате которого эмбриональные инициали зиготического зародыша, полученные от одной оплодотворенной яйцеклетки, распадаются на четыре идентичные эмбриональные единицы, каждая из которых дает начало четырем зародышам-близнецам (Третьякова, 1990). Кроме того, наличие в мегагаметофите нескольких архегониев (как правило, 2–4) и развитие нескольких зигот, в том числе от разных мужских гамет приводит к дополнительному образованию зародышей, которые также активно кливажируют (Buchholz, Blakeslee, 1930). У *Pinus sibirica* в зародышевом канале одного мегагаметофита (одной семяпочки) может развиваться 12–16 зародышей (Третьякова, 1990). Не исключено, что в растительных клетках видов *Pinaceae* архивировано наличие кливажа, который может реализовываться в культуре *in vitro* под действием гормонов.

Кливажная полиэмбриония – наиболее загадочный феномен соматических зародышей. Этот процесс протекает в течение всей жизни эмбриогенной культуры. Так, например, в полученных нами пролиферирующих эмбриогенных культурах *Larix sibirica* в течение восьми лет идет активная мультипликация соматических зародышей через кливаж (Третьякова и др., 2015; Пак и др., 2016), которые при переводе на среду с АБК созревают и образовывают регенеранты.

Цель настоящей работы заключалась в изучении размножения соматических зародышей в пролиферирующей восьмилетней эмбриогенной культуре *Larix sibirica in vitro* и сравнении закономерностей проявления соматической полиэмбрионии *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили 15 пролиферирующих клеточных линий (Кл), полученных от трех деревьев лиственницы сибирской *Larix sibirica,* произрастающих в дендрарии Института леса им. Сукачева СО РАН, (г. Красноярск) (генотипы А4 и 10) и лиственничниках Республики Хакасия (пос. “Черное озеро”) (генотип Ч2). Возраст культур от 5 до 8 лет.

Введение в культуру, инициация (индукция) соматического эмбриогенеза и пролиферация эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) у лиственницы сибирской проводились на среде АИ (патент 2456344; http://www.freepatent.ru/images/patents/5/2456344/patent-2456344.pdf) и были описаны нами ранее (Третьякова, Барсукова, 2012; Третьякова и др., 2015; Пак и др., 2016). Пролиферирующие эмбриогенные культуры субкультивировали на свежую питательную среду АИ через каждые две недели. Культуры инкубировали в темноте при температуре 24 ± 1°С.

К изучению эмбриогенных культур и соматических зародышей были применены методы световой микроскопии, модифицированные авторами (Третьякова, 1990; Белоруссова, Третьякова, 2008). Цитоэмбриологическое и гистологическое исследование ЭСМ соматических зародышей проводили на давленных препаратах с окрашиванием их сафранином и гематоксилином (Круглова и др., 2013) и постоянных препаратах, окрашенных процционовыми красителями (Иванов, 1982).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Инициация эмбриогенных культур

При введении зиготических зародышей лиственницы на стадии инициации семядольного кольца в культуру *in vitro* уже на пятые сутки культивирования соматические клетки, длина которых составляла 62.5 ± 6.5 мкм, начинали интенсивно растягиваться по всей длине гипокотиля и достигали длины 191.7 ± 6.9 мкм. На рис. 1 нами представлен процесс формирования соматических зародышей лиственницы сибирской. Удлиненные клетки поляризовались (рис. 1а, 1б). В них просматривалось два свободных ядра (рис. 1б, 1в). Далее, одно из ядер смещалось к одному из концов удлиненной клетки (рис. 1б, 1в) и происходило асимметричное деление с образованием небольшой клетки (эмбриональной инициали диаметром 39.2 ± 1.2 мкм) и длинной клетки (длина 200 ± ± 12.7 мкм) (рис. 1г). Далее клетки эмбриональной инициали делись и образовывали клеточные конгломераты (глобулы), из клеток базальной части глобулы формировались эмбриональные трубки (рис. 1г, 2д, 2е, 2з), Таким образом, на 12–15-е сутки культивирования в ЭСМ наблюдалось множество соматических зародышей из базальной части которых периодически появлялись эмбриональные трубки (рис. 1е, 1ж, 1и, 1к $ет_1$, $ет_2$, ..., $ет_3$ и т.д.). Эти трубки удлинялись и образовывали суспензор. Глобулы состояли из изодиаметрических инициальных клеток, формирующих эмбриональную массу (рис. 1л, рис. 2). Клетки эмбриональных глобул имели небольшие размеры (39.4 ± 0.5 мкм), крупное, расположенное в центре ядро и были способны активно делиться. Следует отметить, что эмбриональные глобулы содержали большое количество ауксина, а эмбриональные трубки и в целом суспензор оставались слабо окрашенными на ауксины и цитокинины (данные иммуногистохимического анализа, в печати, Третьякова и др.).

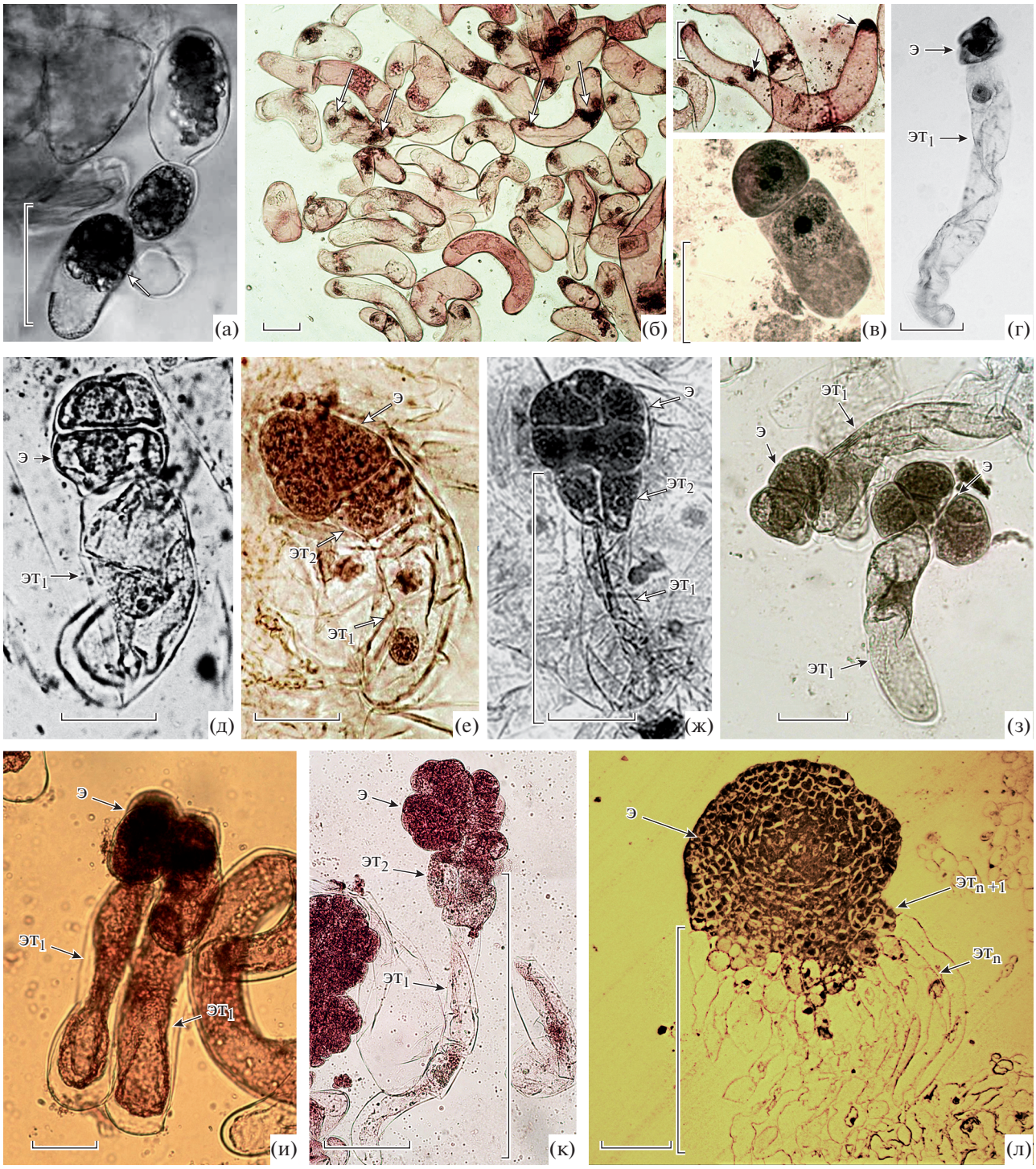

Рис. 1. Процесс формирования соматических зародышей (эмбрио) лиственницы сибирской: а–б – удлинение и поляризация соматических клеток (стрелками обозначены клеточные ядра); в – смещение ядра к одной из сторон клетки; г – первое деление инициальной клетки зародыша; д – четырехклеточный ембрио с одноклеточным суспензором, масштаб 50 мкм; е–л – глобулярный зародыш, масштаб к, л – 100 мкм. Обозначения: э – эмбрио (собственно зародыш), эт$_1$ – эмбриональная трубка 1го порядка, эт$_2$–эт$_n$ – эмбриональные трубки различного порядка, образовавшиеся позднее эт$_1$, С – эмбриональный суспензор.

Пролиферация эмбриогенных культур (ЭК)

Перенос культур через 30–45 дней на среду АИ с пониженным содержанием цитокининов и сахарозы стимулировал мультипликацию соматических зародышей, состоящих из эмбриональных глобул и суспензора (система эмбриональных трубок). Происходило интенсивное нарастание эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ).

Рис. 2. Коллекция длительно-пролиферирующих эмбриогенных клеточных линий *Larix sibirica*.

Пролиферирующие клеточные линии лиственницы сибирской были получены нами в разные годы (2008–2016) от генотипов № А4, 10 и Ч2 в результате свободного и контролируемого опыления: от генотипа А4 – 11 Кл, № 10 – 3 Кл, № Ч2 – 1 Кл. Возраст культур составлял 5–8 лет. Внешне пролиферирующие культуры выглядели рыхлыми, легко рассыпающими структурами белого или кремового цвета (рис. 2).

Интенсивность прироста ЭСМ значительно варьировала у исследуемых Кл. Масса пролиферирующей ЭСМ за период от пересадки до пересадки (14 суток) увеличивалась в 6 раз у Кл5 и Кл6, у наиболее активно растущей Кл4 – в 23 раза. Данная клеточная линия интересна не только интенсивностью прироста ЭСМ, но и скоростью созревания соматических зародышей: от 14–18 суток, в противоположность средней продолжительности у других исследуемых Кл – 45 суток. Число глобулярных соматических зародышей у разных Кл линий лиственницы колебалось от 2040 ± 189 (Кл6) до 11103 ± 259 (Кл10) на 1 г ЭСМ. Глобулы соматических зародышей у данных Кл имели размер от 112 до 282 мкм, суспензоры от 592 до 2969 мкм. Глобулы соматических зародышей часто располагались на поверхности культур и образовывали скопления, а их суспензоры тесно примыкали друг к другу (рис. 3). Образовывались полиэмбриональные комплексы, состоящие из глобул и суспензоров. Далее шло кливажирование. При этом глобулы соматических эмбрио начинали отделяться друг от друга (рис. 3а, 3б, 3в, 3г, 3д). Кливаж мог происходить у небольших глобул, размером 90 мкм (рис. 3а) и у больших глобул (размером 282 мкм), где шло активное заложение эмбриональной массы (рис. 3б, 3в, 3г, 3д). Затем шло расщепление суспензоров, примыкающих к головке соматического зародыша (рис. 3е, 3ж, 3з). Соматические зародыши начинали распадаться до полного их отделения друг от друга. Возникали самостоятельные соматические зародыши (рис. 3и). При длительном культивировании (до восьми лет и более) кливаж не ослабевал. Вновь и вновь возникали соматические зародыши, которые кливажировали и расщеплялись.

Кроме того, наблюдалось образование соматических зародышей и из клеток суспензора – в результате бокового выпячивания или почкования (budding) (рис. 4).

Однако процесс адвентивного почкования суспензора происходил значительно реже, чем кливажирование эмбриональной глобулы соматического зародыша. Вместе с тем, наблюдался и такой феномен, когда эмбриональные трубки, из которых состоял суспензор расщеплялись (рис. 5). В разобщенных эмбриональных трубках шло асинхронное деление с последующим формированием глобулы и суспензора соматического зародыша. Картина напоминала начальную стадию инициации соматического эмбриогенеза (см. рис. 1). Такое явление в литературе до сих пор описано не было.

Таким образом, образование ЭСМ активно шло в результате кливажа соматических зародышей на глобулярной стадии развития, реже образования адвентивных почек у суспензора и расщепления эмбриональных трубок с последующей их пролиферацией.

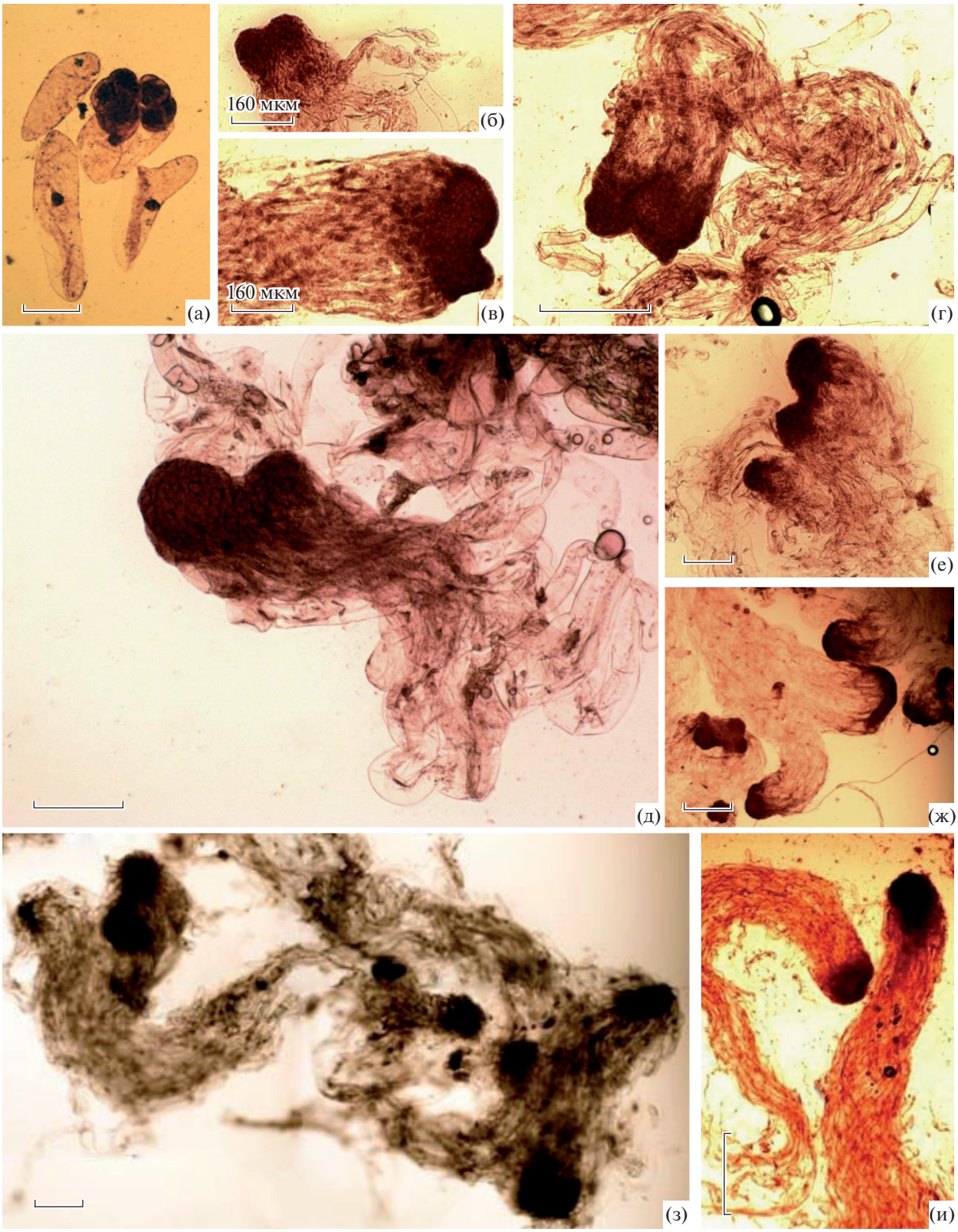

Рис. 3. Мультипликация глобулярных соматических зародышей *Larix sibirica* путем кливажа: а (масштаб 50 мкм), б, в, г, д – расхождение (расщепление) глобул соматических эмбрио друг от друга; е, ж – расщепление суспензоров, примыкающих к головке соматического зародыша, з – соматические зародыши, объединенные общим суспензором, и – самостоятельные глобулярные соматические зародыши. Масштаб 160 мкм.

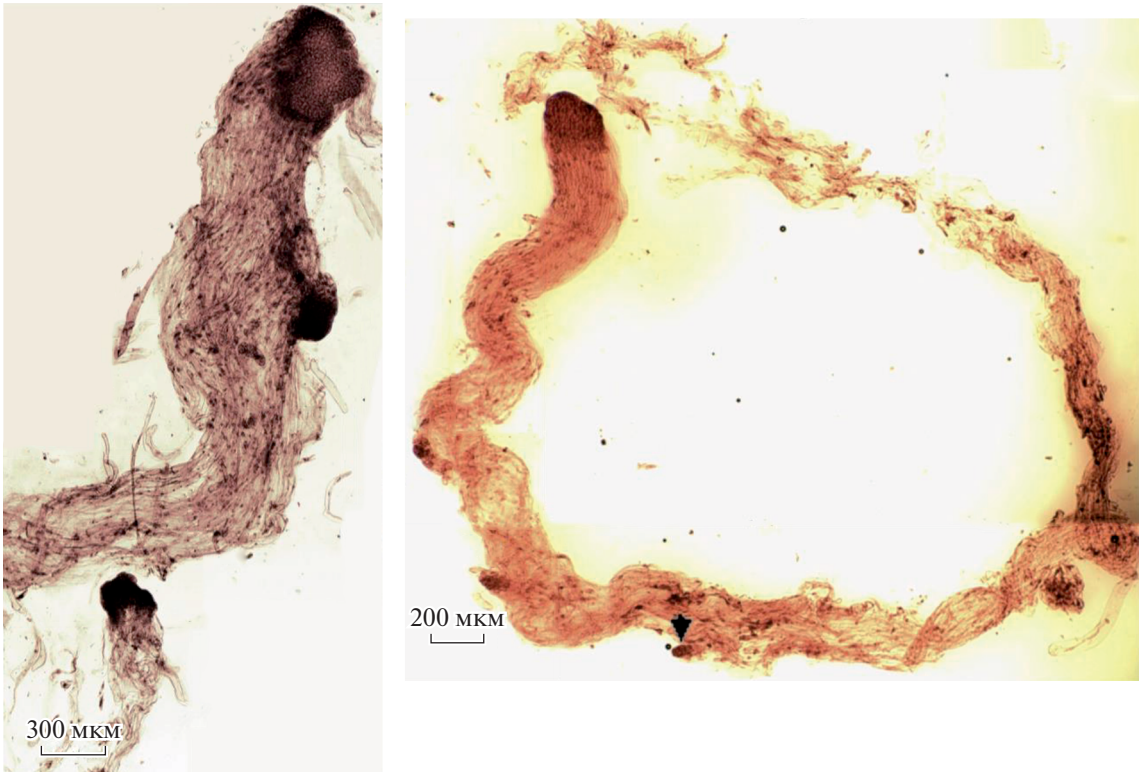

Рис. 4. Образование соматических зародышей из клеток суспензора – в результате бокового выпячивания или почкования (budding).

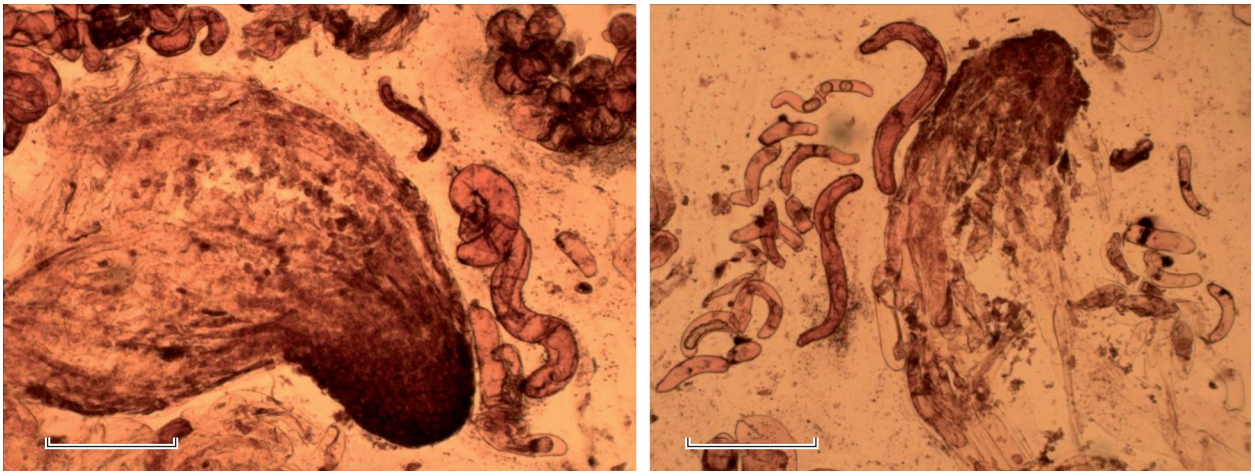

Рис. 5. Мультипликация глобулярных соматических зародышей из клеток суспензора. (Разобщение эмбриональных трубок суспензора соматического зародыша). Масштаб 160 мкм.

Созревание соматических зародышей

Ингибирование полиэмбриогенеза, происходило под действием АБК. После перемещения пролиферирующей ЭСМ на питательную среду АИ с АБК (Третьякова и др., 2016; Пак и др., 2016) кливаж, почкование и расщепление эмбриональных трубок суспензора прекращались в течение нескольких недель. Через 2 недели культивирования на такой среде каждый эмбрио становился самостоятельной структурой, и в нем происходило формирование оси зародыша, начиналась программированная клеточная смерть суспензора. Иногда несколько глобулярных зародышей не расходились в базальной части и еще имели общий деградирующий суспензор (рис. 6). В тече-

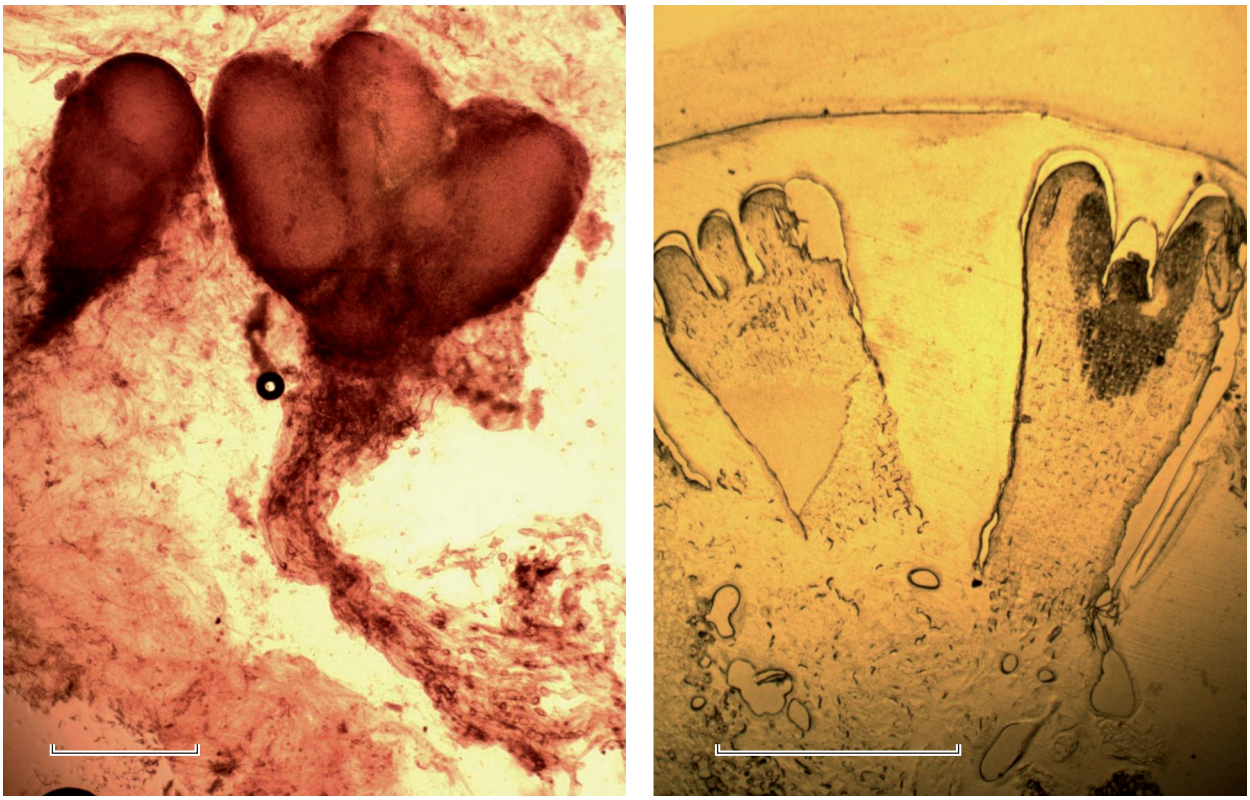

Рис. 6. Мультипликация глобулярных соматических зародышей из клеток суспензора: а – давленный препарат, окрашено сафранином; б – 45 суток на среде с АБК, постоянный препарат. Масштаб 500 мкм.

ние второй недели культивация на среде с АБК шла активная гистодифференцировка и происходило развитие апикальных меристем и семядолей. Вначале третьей недели суспензор полностью отмирал. Процесс созревания соматических зародышей завершался в течение 20–60 суток. При переводе зародышей на среду 1/2АИ (без гормонов) происходило их прорастание и образование регенерантов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В основе полового эмбриогенеза покрытосеменных растений заложена полярность и асимметричное деление, которое происходит уже при первом делении зиготы и приводит к образованию двух неравных клеток: маленькой терминальной, которая даст начало зародышу и большой базальной клетке, формирующей гипофиз и суспензор (Батыгина, 1999). При этом полярность, заложенная в зиготе, в результате ее деления поддерживается и передается дочерним клеткам (Лутова и др., 2010).

У хвойных полярность зиготы также ярко выражена, как и у покрытосеменных. Однако в результате оплодотворения два образовавшихся ядра проэмбрио, в центре зиготы, повторно делятся, и четыре свободных ядра проэмбрио в силу полярности зиготы двигаются к основанию архегония, где формируется шестнадцатиклеточное проэмбрио, состоящее из одинаковых клеток, расположенных в четыре яруса (по четыре клетки в каждом ярусе) – тип USE (Singh, 1978; Dogra, 1978). Формируется четыре инициали эмбрио (e), четыре эмбриональных клетки суспензора (eS), производные яруса e, далее четыре клетки нефункционального суспензора (dS) и четыре клетки открытого яруса (upper tier of proembryo, U) (рис. 7). При описании раннего эмбриогенеза у хвойных Х. Синг (Singh, 1978) клетки эмбрионального суспензора eS называл et (эмбриональные трубки). Поэтому мы при дальнейшем изложении материала будем называть данные клетки эмбриональными трубками et в русской транскрипции эт.

Через 7–10 дней после оплодотворения клетки эмбрионального суспензора (eS или эт) видов *Pinaceae* начинают интенсивно растягиваться до 200–300 мкм и выталкивать клетки нижнего яруса (e) в коррозийную полость женского гаметофита. Растяжение эмбриональных трубок (эт) идет с неодинаковой скоростью, и инициальные клетки опережают одна другую (рис. 8а). Происходит кливаж, в результате которого формируется четыре инициали зародыша, каждая из которых делит-

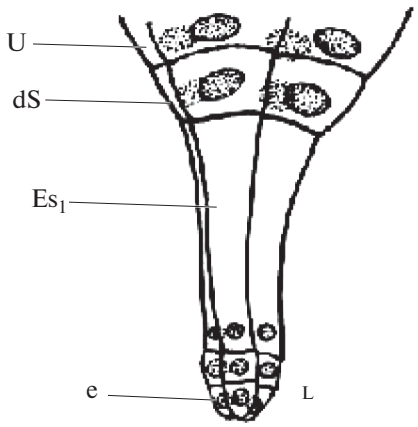

Рис. 7. Диаграмма проэмбрио USE типа по Х. Сингу (Singh 1987)

ся и образует четыре глобулы эмбрио в коррозийной полости мегагаметофита. Далее из базальных клеток каждой глобулы формируются эмбриональные трубки (рис. 8б, 8в) (Третьякова, 1990).

Согласно Х. Синг, у голосеменных при зиготическом эмбриогенезе *in vivo* кливажная полиэмбриония заключается в независимом поведении эмбриональных единиц и развитии суспензорного аппарата (Singh, 1978). Кливаж может происходить (a) в период формирования стенок молодого проэмбрио, когда различные клетки формируются независимо и образуют эмбриональную массу и суспензор. Такой кливаж, обнаружен у *Ephedra, Sequoia, Gnetum* (цит по Singh, 1978); (b) – кливаж может быть обусловлен растяжением суспензорного яруса S. При этом клетки суспензора отделяются друг от друга на кончике и каждая клетка образует одну или более эмбриональных единиц (Dogra, 1966). Кливаж суспензора характерен для представителей *Cryptomeria, Taxodium, Glyplastrobus, Taxus*; (c) – кливаж может возникать в результате растяжения эмбрионального суспензора (eS), характерного для представителей *Coniferales* (цит. по Singh, 1978), который образуется из эмбрионального этажа (e). При этом клетки эмбрионального суспензора eS, отделяются друг от друга и каждая клетка функционирует, как самостоятельная эмбриональная единица, продуцирующая эмбриональную массу (эмбриональные комочки – e, clams) из базальной части которых развиваются клетки трубки et1, et2 и т д., составляющих суспензор. Этот тип кливажа обнаружен у *Cupressaceae, Pinaceae, Sequoidendron, Cunningyamie, Metasequaja* (Doyle, Brennan, 1971, 1972; Singh, 1978); d) – кливаж между эмбриональными единицами происходит тогда, когда эмбриональные инициали (e) отделяются друг от друга полностью и образуют эмбриональные трубки (et). Этот тип кливажа описан у *Podocarpaceae*, *Taxodiaceae, Cypressus и Cedrus sdeodara* (цит. по Singh, 1978); (e) – долевое разделение (lobing) или почкование эмбриональной массы (budding) описано у многих голосеменных (цит. по Singh, 1978). Однако, по мнению Догра (Dogra, 1967), этот тип регенерации не является регулярным феноменом и рассматривался как ложный (false) кливаж; (f) Детерминированная кливажная полиэмбриония (Determinate Cleavage Polyembryoniy) – это состояние, при котором на ранней стадии становится очевидным, какой из многих эмбрионов в семени будет успешным (Buchholz, 1933), как у *Dacrydium* (Quinn, 1966a, b); (g) Недетерминированная кливажная полиэмбриония (Indeterminate Cleavage Polyembryoniy) такая, при которой не ясно в начале, какой из эмбрионов станет лидером, как у *Pinus* (цит. по Singh, 1978).

Таким образом, кливажная полиэмбриония – это регулярный и организованный феномен, обусловленный независимым ростом эмбриональных трубок и расщеплением глобулы (эмбриональной массы) (Buchhols, 1918; Dogra, 1967).

Обобщая кливаж у *Coniferales*, Singh (1978) рассматривает следующие его типы:

Unitary Cleavage (единичный кливаж) – у *Coniferales*, обусловленный независимым формированием эмбрио клетками ре и их производными (Dogra, 1967).

Partial Cleavage (частичный кливаж) происходит тогда, когда две–три эмбриональные единицы остаются объединенными вместе, в то время как другие единицы отделяются одна от другой.

Total Cleavage (полный кливаж) имеет место, когда все эмбриональные единицы отделяются одна от другой полностью (Dogra, 1967).

Inhibitory Cleavage (ингибирующий кливаж) обусловлен разрушением eS одной или более эмбриональной единицы и растяжением других (Dogra, 1967).

Unitary Lobing (единичное долевое разделение) происходит, когда ранняя эмбриональная масса разделяется на доли с образованием эмбриональных трубок. Эмбриональные трубки иногда проходят через свободно-ядерную стадию до раннего онтогенеза. Предполагают, что это является случайным явлением и обусловлено различными темпами роста эмбриональных единиц в эмбриональной массе (Dogra, 1967).

Согласно Williams и Maheswaran (1986), у хвойных в культуре *in vitro* образование эмбриоидов может происходить через каллус и прямым путем: (1) прямое образование эмбриоидов из массы эмбриональных клеток эксплантa происходит в результате образования длинных клеток из агрегатов клеток с плотной цитоплазмой; (2) прямым путем могут образовываться эмбиоиды из пери-

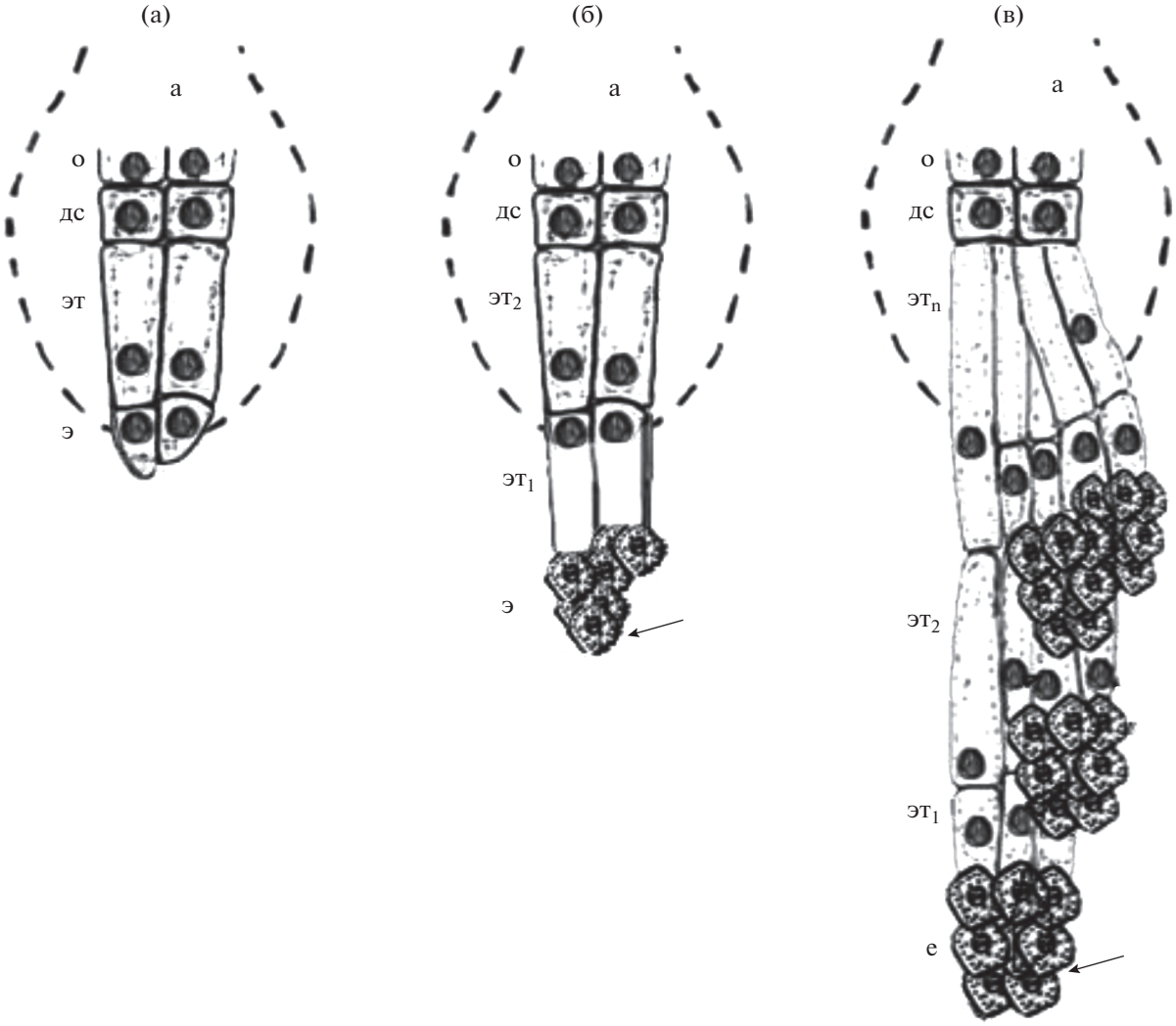

Рис. 8. Кливаж и формирование зиготических эмбрио по Третьяковой 1990: а – в архегонии (а) происходит формирование четырех инициалей эмбрио (э), четырех эмбриональных клеток суспензора (эт), производных яруса (э), далее четырех клеток нефункционального суспензора (дс) и четырех клеткок открытого яруса (о); одна инициальная клетка оказывается более продвинутой в коррозийную полость мегагаметофита вследствие неодинаковой скорости растяжения клеток эмбрионального суспензора (эт); б – Формирование четырех эмбрионов; в – Четыре эмбриона в коррозийной полости мегагаметофита. Виден лидирующий зародыш (указан стрелкой). Из клеток базальной части зародыша образуются эмбриональные трубки (эт).

ферических клеток эксплантa или свободноплавающих клеток; (3) множественное образование эмбриоидов через кливаж. Образование эмбриоидов наблюдалось через ценоциты в мегагаметофитах *Larix decidua* (von Aderkas, Bonga, 1988), *Pinus lambertiana, Pinus taeda* (Gupta, Dursan, 1986a, 1987) и *Pinus sibirica* (Ворошилова, Третьякова, 2014). Ранее такой тип образования эмбриоидов был описан в пыльцевых культурах *Pinus resinosa* (Bonga, 1982), *Zamia* и *taxus* (La Rue, 1954).

Необходимым условием для запуска соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* у видов *Larix,* также как и у других видов хвойных, является растяжение соматических клеток зиготического зародыша и возникновение у них полярности, которое возникало, вероятно, под действием 2,4-Д и их асимметричное деление (прямой путь). Ранее такой тип образования зародышей был описан у *Picea abies* (von Arnold, Hakman, 1988; Stasolla et al., 2003), у *Larix sibirica* (Третьякова и др., 2016) и он не отличался от покрытосеменных растений.

Следовательно, удлинение клетки, полярность и асимметричное деление являются основными критериями, определяющими переход клеток лиственницы на путь соматического эмбриогенеза. Дальнейший процесс развития зиготических и соматических зародышей у *Pinaceae* идет сходным путем (Третьякова и др., 2015; Пак и др., 2016). У тех и у

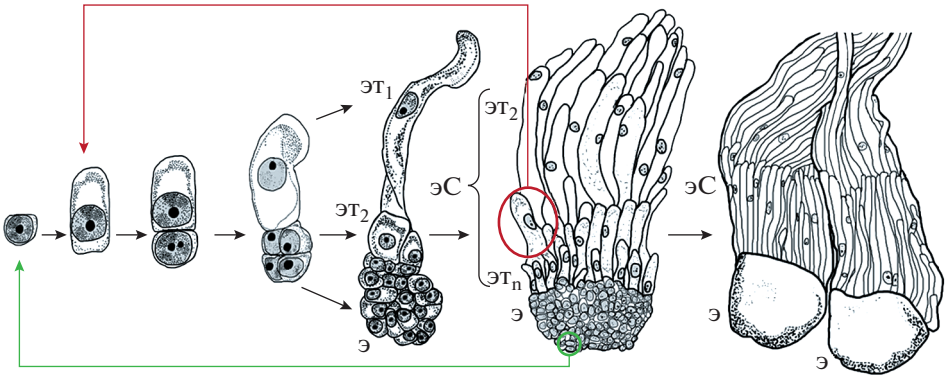

Рис. 9. Схема развития и кливажа соматических зародышей *Larix sibirica in vitro* (см. обсуждение).

других формируются две группы клеток – эмбриональная инициаль и удлиненная клетка (возможно первая эмбриональная трубка). Из инициальных эмбриональных клеток формируются эмбриональные глобулы, а из базальных клеток эмбриональных глобул образуются эмбриональные трубки ($ет_1$...$ет_n$), слагающие суспензор (рис. 9). Таким образом, как у зиготических, так и у соматических зародышей лиственницы проявляются две структурные единицы, одна из которых глобулярный зародыш, а другая – эмбриональные трубки, слагающие суспензор. Эмбриогенные культуры *Larix* представляют собой эмбрионально-суспензорную массу.

Соматические зародыши часто объединены в полиэмбриональные комплексы. Соматический полиэмбриогенез (somatic polyembryogenesis) был описан у *Pinus taeda* и *Picea abies* (Gupta, Dursan, 1987; Jokinen, Dursan, 1994) и позднее получил название “repetitive cleavage process” (Becwar et al., 1990). Поликливажный процесс соматического эмбриогенеза был выявлен у *Juniperus communis* (Holmersson, von Arnold, 2004) и у *Abies* (Vondrakova et al., 2011). Схема пролиферации ЭСМ была показана у *Pinus taeda* (Gupta, Dursan, 1991).

Полиэмбриональные комлексы были отмечены нами у *Pinus pumila* (Третьякова, Шуваев, 2015) и у *Larix sibirica* (Пак и др., 2016). Кливаж у лиственницы сибирской *in vitro* скорее можно отнести к Unitary Cleavage типу (единичный кливаж) тип (c) по Singh (1978), обусловленному независимым формированием эмбрио через эмбриональные клетки глобулы и эмбриональные трубки (et), возникающие из дистальных клеток глобулы. Этот тип кливажа начинается на стадии глобулы и не зависит от ее размера. Суспензоры первоначально тесно прижаты друг к другу и образуют единый комплекс, который по мере разобщения эмбриональных трубок и глобул соматического зародыша разъединяется, формируются самостоятельные соматические зародыши (рис. 9).

Как известно, кливаж свойственен голосеменным растениям и значительно реже встречается у покрытосеменных. По мнению Титовой с соавторами (Титова и др., 2016) у пшеницы наблюдается образование полиэмбриоидов двух классов “множественные меристемы побегов”, из которых формируются фенотипы “сиамские близнецы спина к спине” и “множественные щитки”. Кливаж в фенотипах “множественные меристемы” происходит на ранне-глобулярной стадии. В этом случае полиэмбрионы не являются самостоятельными и представляют полимерные структуры с множественными меристемами, побегами и семядолями, и другими органами, как правило, сросшимися общим корневым полюсом. Предполагается, что этот феномен нельзя относить к кливажной полиэмбрионии (Fischer et al., 1997). Однако, по мнению Титовой с соавторами (Титова и др., 2016), случаи образования полимерных структур с многочисленными меристемами и общим корнем можно рассматривать как проявление неполной кливажной полиэмбрионии. При этом составляющие единицы полиэмбриоидов не являются самостоятельными и образуют полимерные структуры с множественными меристемами побегов и щитками, сросшимися в разной степени.

Активную кливажную полиэмбрионию у *Larix* на стадии развития глобулярного зародыша, вероятно, можно связать с компетентностью его клеток к различным воздействием, в частности ауксином. Импульс в виде притока ауксина в зародыш из питательной среды приводит к перепрограммированию клеток глобулы и приобретению способности ее к восприятию и транспорту ауксина. Возможное накопление ауксина в глобуле и меньшее содержание его в базальной части, создает градиент полярности, в результате которой образуются эмбриональные трубки (суспензор), в которых по данным нашего имммуногистохимического исследования (Третьякова и др., 2017, в печати) ауксин не обнаружен. Вероятно,

кливаж глобулы приводит к полному расщеплению суспензора и обособлению эмбрио.

Соматический полиэмбриогенез у *Larix sibirica*, также как у других хвойных можно рассматривать как повторяющийся кливажный процесс, заложенный в зиготе (Gupta, Dursan, 1987). Мы полагаем, что это самостоятельный процесс. Реализация такого процесса активно происходит у лиственницы сибирской в культуре *in vitro* на стадии глобулы, где создаются оптимальные условия для кливажирования.

Размножение соматических зародышей в культуре *in vitro* происходит не только в результате кливажной полиэмбрионии, но значительно реже через образование адвентивных почек в суспензоре, которое наблюдали у *Picea abies* (von Aderkas et al., 1991), а также и мы у *Larix sibirica* (Третьякова и др., 2016). Кроме того, массовое размножение соматических зародышей может происходить и в результате разобщения эмбриональных трубок суспензора (Stasolla, Yeung, 2003). Разобщение эмбриональных трубок суспензоров в пролиферирующей эмбриональной-суспензорной массе лиственницы сибирской приводит к множественному формированию глобулярных соматических зародышей через ассиметричное деление. При этом процесс развития новых соматических зародышей не отличается от описанного нами процесса инициации соматического эмбриогенеза: такие же вытянутые поляризованные клетки (эмбриональные трубки) асимметрично делятся и, формируют эмбриональные глобулы и суспензор.

Процесс размножения соматических зародышей в пролиферирующей эмбрионально-суспензорной массе остается загадочным феноменом. Этот процесс не ослабевает у длительно культивируемых эмбриогенных культур (Пак и др., 2016). Пролиферирующие эмбриогенные культуры *Larix sibirica* при регулярных пересадках интенсивно растут в течение восьми лет, соматические зародыши в них активно кливажируют и образуются из эмбриональных трубок суспензора. Темп образования соматических зародышей не снижается. Подобная пролиферативная активность эмбриогенных культур была описана ранее в культуре мегагаметофитов *L. decudua* и культуре зародышей гибридов лиственницы (*Larix* × *eurolepis* и *Larix* × *marschlinsii*) (Lelu-Walter M-A, Pâques L.E., 2009), где образование ЭСМ шло в течение 9 лет. Однако механизм мультипликации соматических зародышей в таких культурах раскрыт не был. Мы впервые показали процесс соматического полиэмбриогенеза хвойных *in vitro* на примере *Larix sibirica*. Этот процесс может идти за счет кливажа, почкования суспензора и массового расщепления эмбриональных трубок суспензора с последующим переходом их на путь эмбриогенеза.

Общность морфогенетических процессов, лежащих в основе развития зиготических и соматических зародышей хвойных видов еще раз подтверждает концепцию о параллелизме их развития *in vivo* и в культуре *in vitro*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности” в рамках научных проектов № 16-44-240509 и № 16-44-243068.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Батыгина Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 6. С. 884–898.

Белоруссова А.С., Третьякова И.Н. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты // Онтогенез. 2008. Т. 39, № 2. С. 106–115.

Иванов В.Б. Активные красители в биологии. Москва: Наука, 1982. 214 с.

Круглова Н.Н., Егорова О.В., Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю., Зинатуллина А.Е. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений. Уфа: Гилем, Башк. энцикл., 2013. 128 с.

Лутова Л.А., Ежова Т.А., Додуева И.Е., Осипова М.А. Генетика развития растений. СПб.: Издательство Н-Л. 2010. 432 с.

Некрасова Т. П. Биологические основы семеношения кедра сибирского. Новосибирск: Наука, 1972. 272 с.

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.

Титова Г.Е., Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Галин И.Р., Батыгина Т.Б. Феномен “сиамских зародышей” у злаков *in vivo* и *in vitro*: кливажная полиэмбриония и фасциации // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 3. 152–169.

Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных: физиологические аспекты. Новосибирск, Наука, 1990. 157 с.

Третьякова И.Н., Барсукова А.С. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы // Онтогенез. 2012. Т. 43. № 6. С. 425–435.

Третьякова И.Н., Шуваев Д.Н. Соматический эмбриогенез *Pinus pumila* и продуктивность эмбриогенных линий при длительном культивировании *in vitro* / // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 5. С. 327–333

Третьякова И.Н., Иваницкая А.С., Пак М.Э. Продуктивность эмбриогенных клеточных линий и их сомаклональная изменчивость у лиственницы сибирской *in vitro* // Лесоведение. 2015. № 1. С. 27–35.

Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В. Особенности инициации эмбриоидов *Pinus sibirica* из мегагаметофитов в культуре *in vitro* // Онтогенез. 2014. Т. 45. № 2. С. 112–120.

Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В. Особенности инициации эмбриоидов *Pinus sibirica* из мегагаметофитов в культуре *in vitro* // Онтогенез. 2014. Т. 45. № 2. С. 112–120.

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.

Яковлев М.С., Снегирев Д.П. Влияние ростовых веществ на образование многозародышевых зерновок у пшеницы // Бот. журн. 1954. Т. 39. № 2. С. 187–194.

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.

Bonga, J.M. Haploid tissue culture and cytology of conifers. Collogue international sur la culture '*in vitro*' des essences forestieres, Association Foret-Cellulose, Nangis, France, 1982, P. 283–293.

Buchholz J.T., *Blakeslee A.F.* Pollen tube growth and control of gametophytic selection in cocklebur, a 25-chromosome Datura // Botanical Gazette. 1930. P. 366–383.

Buchholz J.T. Determinate cleavage polyembryony, with special reference to Dacrydium // Bot. Gaz. 1933. V. 94. P. 579–588.

Dogra P.D. Observations on *Abies* pindrow with a discussion on the question of occurrence of apomixis in gymnosperms // Silvae Genetica. 1966. V. 15. P. 11–20.

Dogra P.D. Seed sterility and disturbances in embryogeny in conifers with particular reference to seed testing and tree breeding in *Pinaceae* // Stud. Forst. Suecica, 1967. № 45. P. 1–97.

Dogra P.D. Morphology, development and nomenclature of conifer embryo // Phytomorphology. 1978. T. 28. № 3. P. 307–322.

Doyle J., Brennan M. Cleavage polyembryony in conifers and taxads: a survey. I. Podocarps, taxads and taxodioids // Roy Dublin Soc. Sci. Proc. Ser A. 1971. P. 57–88.

Doyle J., Brennan M. Cleavage polyembryony in conifers and taxads: a survey. II. Cupressaceae, Pinaceae and conclusions // Sci. Proc. Roy. Dublin Soc., A. 1972. T. 4. №. 10. P. 137–158.

Erdelska O., Vidovencova Z. Cleavage polyembryony in maize // Sex. Plant Reprod. 1992. V. 5. № 3. P. 224–226.

Erdelska O., Vidovencova Z. Cleavage polyembryony *in vivo* and *in vitro* // Biol. Plant. 1994. V. 36. № 3. P. 329–334.

Fischer C., Speth V., Fleig-Eberenz S., Neuhaus G. Induction of zygotic polyembryos in wheat: influence of auxin polar transport // Plant Cell. 1997. V. 9. № 10. P. 1767–1780.

Gupta P.K., Durzan D.J. Somatic Polyembryogenesis from Callus of Mature Sugar Pine Embryos // Biotechnology. 1986a. vol. 4. P. 643–645.

Gupta P.K., Durzan D.J., Finkle B.J. Somatic polyembryogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus taeda* (loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen //Canadian Journal of Forest Research. 1987. T. 17. № 9. P. 1130–1134.

Gupta P.K., Durzan D.J. Somatic embryos from protoplasts of loblolly pine proembryonal cells // Nature Biotechnology. 1987. T. 5. № 7. P. 710–712.

Gupta P.K., Durzan D.J. Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) // Trees III. – Springer Berlin Heidelberg, 1991. P. 383–407.

Haccius B. Experimentally induced twinning in plants // Nature. 1955. V. 176. № 4477. P. 355–356.

Holmersson 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 Physiology. 2004. V. 24. P. 1181–1186.

Jokinen, K.J., Durzan, D.J. Properties of rescued embryonal suspensor masses of Norway spruce determined by the genotype and the environment in vitro // Silva Fennica. 1994. V. 28. P. 95–106.

Lelu-Walter M.-A., *Pâques L.E.* Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix* × *eurolepis* and *Larix* × *marschlinsii*). Perspectives for breeding // Ann. For. Sci. 2009. V. 66. P. 104.

La Rue C.D. Studies on growth and regeneration in gametophytes and sporophytes of gymnosperms // Brookhaven Symp. Biol. 1954. vol. 6, P. 187–208.

Quinn C.J. Gametophyte development and embryogeny in Podocarpaceae. III. *Dacrydium bidwilii* // Phytomorphology. 1966a. V. 16. P. 81–91.

Quinn C.J. Gametophyte development and embryogeny in the Podocarpaceae. IV. *Dacrydium colensoi*: General conclusion. // Phytomorphology. 1966b. V. 16. P. 199–211.

Rober-Kleber N., Albrechtová J.T.P., Fleig S., Huck N., Michalke W., Wagner E., Speth V., Neuhaus G., Fischer-Iglesias C. Plasma membrane H^+-ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development // Plant Physiol. 2003. V. 131. № 3. P. 1302–1312.

Singh H. Embryology of gymnosperms. 1978. P. 302.

Stasolla C., Yeung E. C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2003. T. 74. № 1. P. 15–35.

Von Aderkas P., Bonga J.M. Formation of haploid embryoids of *Larix decidua*: early embryogenesis // American journal of botany. 1988. V. 75. P. 690–700.

Von Aderkas P., Bonga J., Klimaszewska K., Owens J. Comparison of larch embryogeny *in vivo* and *in vitro* // Woody plant biotechnology / New York: Plenum press. 1991. P. 139–155.

Von Arnold S., Hakman I. Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA) // J. Plant Physiol. 1988. V. 132. P. 164–169.

Vondráková Z. Eliášová K., Fischerová L., Vágner M. The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba* // Central European Journal of Biology. 2011. T. 6. № 4. P. 587–596.

Williams E.G., Maheswaran G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group // Annals of Botany. 1986. T. 57. № 4. P. 443–462.

Somatic Polyembriogenesis of *Larix sibirica* in Embryogenic *in vitro* Culture

I. N. Tretyakova[1, *] and M. E. Pak[1]

[1]*Sukachev Institute of the Forest, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Division of Krasnoyarsk Scientific Center Federal Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

**E-mail: culture@ksc.krasn.ru*

Received January 11, 2017

The initiation of somatic embryos and their propagation in the long-term proliferating embryonal suspensor mass of *Larix sibirica* were studied. It was found that the increase in the number of somatic embryos in the embryogenic culture occurred as a result of cleavage of the globules of the somatic embryo and the suspensor; it less often occurred as the result of budding of the suspensor and the separation of the embryonal tubes of the suspensor. In the case of long-term proliferating cell lines (more than 8 years), the rate of cleavage did not weaken. A conclusion on the identity of morphogenic processes underlying the development of zygotic and somatic embryos of conifers is made, which is confirmed by the concept of T.B. Batygina (1999) on the parallelism of their development *in vivo* and *in vitro*.

Keywords: *Larix sibirica*, embryonal-suspensor mass, cleavage of globular embryos, budding, *in vitro* and *in vivo* embryonal tubes