

УДК 57.017.5:581.3:582.47

РЕПРОДУКТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ХВОЙНЫХ, СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ И АПОМИКСИС

© 2021 г. И. Н. Третьякова^{а, *}, В. В. Минеев^{б, **}

^аИнститут леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, ул. Академгородок, 50/28, Красноярск, 660036 Россия

^бФГБОУ ВО “Красноярский государственный педагогический университет им. В.П. Астафьева”, ул. Ады Лебедевой, 89, Красноярск, 660049 Россия

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

**e-mail: vvmineyev@mail.ru

Поступила в редакцию 21.11.2019 г.

После доработки 01.09.2020 г.

Принята к публикации 07.09.2020 г.

В статье изложены результаты анализа имеющихся данных по размножению растений класса Pinopsida (половая репродукция и бесполое – апомиксис). Рассмотрены возможности реализации апомиксиса у хвойных. Этот способ бесполого размножения проявляется при нарушении формирования семян. Особым типом репродукции у хвойных является соматический эмбриогенез в культуре *in vitro*. Показано, что переход соматических клеток к тотипотентному и эмбриогенному состоянию у хвойных происходит на морфогенетическом, физиолого-биохимическом и молекулярно-генетическом уровнях. Установлена общность морфогенетических процессов, лежащих в основе соматического и зиготического эмбриогенеза. Рассматривается место соматического эмбриогенеза в системе репродукции хвойных.

Ключевые слова: репродукция, апомиксис, соматический эмбриогенез, хвойные

DOI: 10.31857/S0475145021020087

ВВЕДЕНИЕ

Растения демонстрируют высокую пластичность и индивидуальную изменчивость способов репродукции: у них наблюдается как половое размножение, так и бесполое – апомиксис. У растений отдела Pinophyta (класс Pinopsida) имеется несколько форм апомиксиса: развитие асексуального зародыша, полиэмбриония и кливаж. У голосеменных растений, особенно видов семейства Pinaceae, ярко проявляется так называемая “кливажная полиэмбриония” (cleavage polyembryony), при которой сформированный из зиготы эмбрион разделяется на четыре зародыша (Singh, 1978; Третьякова, 1990).

Особым типом репродукции у данного класса растений является соматический эмбриогенез, открытый у *Picea abies* в 1985 году в культуре *in vitro* (Накман et al., 1985). Переход соматических клеток к тотипотентному и эмбриогенному состоянию у хвойных в настоящее время активно изучается на морфогенетическом, физиолого-биохимическом и молекулярно-генетическом уровнях (von Aderkas et al., 1991; Tret'yakova et al., 2019; Peng et al., 2020). Показана общность морфогенетических процессов, лежащих в основе зиготического и со-

матического эмбриогенеза хвойных (von Aderkas et al., 1991; Tret'yakova, Park, 2018). Репродуктивная система *Coniferous*, также, как и других живых организмов, направлена на выживание видов и способность их оставлять потомство.

В данной статье проводится анализ закономерностей половой репродукции хвойных и возможность реализации различных форм апомиксиса у данного класса растений (в сравнении с известными формами апомиксиса у цветковых растений), а также рассматривается место соматического эмбриогенеза в системе репродукции растений.

ПОЛОВАЯ РЕПРОДУКЦИЯ

Половая репродукция лежит в основе размножения хвойных также, как и значительного большинства эукариот. Несмотря на разную продолжительность генеративного цикла у видов хвойных, развитие репродуктивных структур у данного класса растений идет однообразно на морфологическом уровне (Singh, 1978). В год, предшествующий опылению, происходит заложение флоральных меристем. Весной следующего года идут процессы микро- и мегаспорогенеза, формирование га-

метофитов, затем оплодотворение и эмбриогенез, завершающийся развитием зрелых семян. У *Pinus* от опыления до оплодотворения проходит 1 год, у *Abies*, *Larix*, *Picea* 30–40 дней (Третьякова, 1990). Ход эмбрионального развития обусловлен видовой спецификой, внутренними свойствами организма (физиолого-биохимическими и молекулярно-генетическими), а также находится под влиянием внешней среды. Кульминационными моментами в процессе развития генеративных структур у хвойных, также как у других растений, являются процессы опыления и оплодотворения. Опыление стимулирует развитие семяпочки, а процесс сингамии – развитие зародыша. У хвойных в период опыления гаплоидные клетки мужского гаметофита вступают в контакт с тканями диплоидного спорофита – нуцеллуса. Однако в этот период женский и мужской гаметофиты у большинства хвойных, относящихся к представителям *Abies*, *Larix*, *Picea* и *Pinus* развиваются автономно. В их семяпочках может происходить мегаспорогенез и даже начальные этапы развития женского гаметофита (Третьякова, 1990). Успешное дальнейшее развитие многоядерного женского гаметофита у данных видов наблюдается только при прорастании пыльцы в ткань нуцеллуса. Тесная связь между опылением семяпочек и развитием женского гаметофита отмечена у *Pinus sylvestris*. У представителей данного вида процесс мегаспорогенеза и развития женского гаметофита происходит только после опыления семяпочек первого года развития (через 7–10 дней после опыления). В семяпочках, в которых прорастание пыльцы не идет, женский гаметофит не развивается, и семяпочки деградируют (Третьякова, 1990). Выявлено, что в неопыленных семяпочках сосны обыкновенной разрастаются клетки тапетума, прилегающие к мегаспоре. Разрастающийся тапетум сдавливает мегаспороцит, что приводит к его гибели (Sarvas, 1962). Р. Сарвас (Sarvas, 1962) не исключал возможность конкуренции пыльцевых трубок при прорастании их в ткань нуцеллуса. Любое несоответствие в ритмах и фазах развития мужских и женских генеративных структур приводит к сбою и возможной остановке эмбрионального развития. Следовательно, микро- и мегагаметофиты должны распознавать друг друга, а это не всегда происходит в случае межвидовой гибридизации. Именно в эти периоды проявляются процессы несовместимости, наблюдаемые при контролируемом опылении и особенно межвидовой гибридизации у хвойных (Sarvas, 1962; Tret'yakova, Lukina, 2017). Спорофитная ткань нуцеллуса длительное время разделяет мужской и женский гаметофиты: у *Abies*, *Larix*, *Picea* около 40 дней, у *Pinus* – около года, т.е. тесного контакта между гаметофитами за этот период не происходит. Только в период созревания архегониев (за 7–10 дней до

оплодотворения) происходит вторичный рост пыльцевых трубок и оплодотворение яйцеклеток.

Зиготический эмбриогенез хвойных может быть разделен на три основные фазы: проэмбриогенез, ранний эмбриогенез и поздний эмбриогенез (Singh, 1978). Проэмбриогенез (proembryogeny) включает все стадии развития проэмбрио до удлинения суспензора, ранний эмбриогенез – включает стадии после удлинения суспензора и до заложения меристемы корня, поздний эмбриогенез – начинается от заложения меристем корня и побега и включает все последующие события до формирования зрелого зародыша с хорошо развитыми семядолями (Singh, 1978).

У хвойных растений возможны множественные пути реализации их репродуктивного потенциала: полиархегиональность, полиэмбриония и кливаж, а также асексуальное возникновение зародыша. У видов семейства Pinaceae образуется от двух до четырех архегониев, в которых развиваются зрелые яйцеклетки. Оплодотворение всех яйцеклеток в пределах семязачатка приводит к возникновению простой (simple) или архегониальной (archegonial) полиэмбрионии (Singh, 1978). Наряду с простой полиэмбрионией у видов Pinaceae и особенно рода *Pinus*, характерно проявление кливажной полиэмбрионии (Buchholz, Dogra, 1967). Кливажная полиэмбриония (cleavage polyembryony) – это регулярный и организованный феномен. В результате кливажа в коррозийной полости мегагаметофита происходит расщепление инициалей каждого эмбрио на четыре самостоятельные идентичные единицы (четыре зародыша). Таким образом, в результате простой и кливажной полиэмбрионии у видов семейства Pinaceae в одном мегагаметофите может развиваться до 16 зародышей, полученных от разных опылителей (Третьякова, 1990).

На любом этапе репродуктивного цикла хвойных могут произойти нарушения в эмбриональном процессе. Прежде всего, к нарушению половой репродукции и развитию стерильности приводит отсутствие опыления семяпочек или опыление их нежизнеспособной пылью. К развитию стерильности пыльцы приводят, как правило, засуха в период заложения флоральных меристем, продолжительные теплые осени и оттепели в зимний период, заморозки при прохождении мейоза и дождливая погода в период лета пыльцы (Noskova et al., 2009). Кроме того, встречаются отдельные деревья, которые продуцируют стерильную пыльцу или имеют нарушения в процессе мегаспорогенеза, в результате которого женский гаметофит не развивается (Третьякова, 1990). Деградиационные процессы часто развиваются в семяпочках второго года у *Pinus sylvestris*, в период, когда тесного взаимодействия между гаметофитами нет. Однако именно в этот период происходит образо-

вание клеточного мегагаметофита и архегониев и стремительное увеличение размеров женского гаметофита (в 6–7 раз) (Третьякова, 1990). Такая интенсификация роста сопровождается усилением обменных процессов в семязпочке и зародышевом мешке, в первую очередь трофических и гормональных (Минина, Ларионова, 1989). Вероятно, при такой напряженности ростовых и физиологических процессов в мегагаметофите воздействие неблагоприятных факторов среды могут привести к ослабленности женского гаметофита и развитию пустых семян (Третьякова, 1990). Особенно ярко деградиционные процессы проявляются в предсингамный период, когда нарушается синхронность развития гаметофитов. Развитие женского гаметофита может остановиться на стадии свободоядерного гаметофита или вакуолизованных архегониев. Мегагаметофит разрушается и формируются пустые семена (Третьякова, 1990). Такое явление наблюдалось у уникальных деревьев *Pinus sibirica* с однолетним репродуктивным циклом (Третьякова, 1990; Tretyakova, Lukina, 2016) и межвидовой гибридизации *P. sibirica* × *P. armandii*, *P. parviflora*, *P. strobus*, *P. wallichiana*, *P. hokkaidensis*, *P. cembra* (Tretyakova, Lukina, 2016).

Согласно Koski (1973), пустые семена у *Pinus sylvestris* и *Picea abies* могут служить индикатором проявления летальных аллелей, действующих на стадии эмбриогенеза. Пустые семена могут быть своеобразным свидетельством наличия генетического груза при перекрестном опылении и особенно самоопылении. При самоопылении оплодотворение обычно происходит (Org-Owing, 1957; Sarvas, 1962; Hagman, Mikkola, 1963; Koski, 1973; Tretyakova et al., 2014). Однако развитие прекращается в период формирования инбридинговых зародышей, что и приводит к пустосемянности. У хвойных нет механизма, который бы ингибировал самооплодотворение (Koski, 1973). Не опровергая мнения указанных выше авторов о возможности проявления пустосемянности у хвойных, следует отметить, что деструктивные процессы, ведущие к развитию пустых семян происходят раньше (до появления архегониев). К моменту оплодотворения клетки мегагаметофита оказываются уже сформированными, физиологически активными и не имеют никаких признаков деградации. В данном случае развиваются семена без зародыша. Последовательность процессов развития такой категории семян можно проследить на примере развития генеративных структур особей у *Pinus sibirica* с однолетним циклом развития (Третьякова, 1990). У данных особей зародышевый канал формируется при отсутствии зародыша. Клетки мегагаметофита сохраняют свою активность, а образование зародышевого канала детерминировано и происходит в период созревания яйцеклетки. Принято считать, что образование коррозионной полости в мегагаметофите происходит в результате продви-

жения эмбрио в зародышевом канале. Эмбрио питается за счет клеток центральной части мегагаметофита, и таким образом формируется зародышевый канал (Singh, 1978). Отсутствие эмбрио и сформированный зародышевый канал в семязпочках *Pinus sibirica* с однолетним циклом развития позволяют по-новому оценить характер взаимоотношений между мегагаметофитом и зародышем при эмбриогенезе (Tretyakova, 1992). Вероятно, у *Pinus* действие летальных аллелей, ведущее к пустосемянности, проявляется на более ранних этапах, до сингамии. Нарушения, возникающие в период оплодотворения и эмбриогенеза, как правило, ведут к развитию семян без зародыша, но и не исключено развитие только покровов семян.

На основании цитоэмбриологического анализа *Pinus sibirica*, можно предположить, что категория стерильности семян зависит от стадии дегенерации женского гаметофита (Третьякова, 1990). Остановка развития эмбриональных структур в семязпочке приведет к нарушению полового процесса и возникновению бесполого воспроизведения – апомиксиса.

АПОМИКСИС ЦВЕТКОВЫХ РАСТЕНИЙ

В качестве адаптации к воздействию неблагоприятных факторов среды и для сохранения фертильности у многих видов цветковых растений (более 400 видов, относящихся к 40 семействам) в ходе эволюции возникли различные типы бесполого воспроизведения (Батыгина, 1999; von Arnold et al., 2002; Brukhin, 2017a, 2017b). Одним из них и следует считать апомиксис. В широком смысле к апомиксису относят и вегетативное размножение (вивипарию), в узком – агамоспермию – образование семян с зародышем при отсутствии оплодотворения (Winkler, 1934). Таким образом, апомиксис можно разделить на два типа “агамоспермию” и “вегетативный апомиксис” (Stebbins, 1941; Gustafsson, 1947; Grant, 1981). К типу агамоспермии относят и спорофитную – адвентивную эмбрионию (нуцеллярную и интегументальную, Naumova, 1993). По мнению Т.Б. Батыгиной (Batygina, 2012), соматические зародыши, образующиеся при “адвентивной эмбрионии”, нельзя рассматривать как варианты апомиксиса (“семенного апомиксиса”, по Nogler, 1984). Эти зародыши имеют разный механизм развития (гомофазная и гетерофазная репродукция соответственно).

Многообразие и недостаточная изученность типов апомиксиса привели к путанице терминологии (Хохлов, 1967; Поддубная-Арнольди, 1976; Петров, 1979; Батыгина, 2000).

Одни ученые определяют апомиксис так же широко, как Winkler (Fagerlind, 1940; Gustafsson, 1947; Петров, 1979), другие относят к апомиксису только агамоспермию – размножение посред-

ством семян с зародышем, возникшим без оплодотворения (Asker, 1981; Поддубная-Арнольди, 1976; Хохлов, 1967) или только гаметофитный апомиксис, исключая адвентивную эмбрионию (Battaglia, 1963; Batygina, 2012).

Ряд авторов предлагают использовать равнозначно термины апомиксис и агамоспермию, разделяя последнюю на гаметофитный апомиксис и адвентивную эмбрионию (Asker, 1981; Grant, 1981; Nogler, 1994; Batygina, 2012).

Выделение типов апомиксиса проводилась такими учеными, как Winkler, (1934), Gustafsson (1947), Maheshwari (1950), Bataglia (1963), Хохлов (1967), Поддубная-Арнольди (1976), Петров (1979), Naumova (1993), Батыгина (2000) и др.

Оригинальная классификация типов апомиксиса была разработана С.С. Хохловым (1967). Автор считал апомиксис результатом изменений, происходящих на разных этапах полового процесса. Все случаи таких нарушений, приводящих к апомиксису, он относит к четырем следующим типам:

1. Аспория – отсутствие (выпадение) спорогенеза, как следствие нарушения мейоза. Зародышевый мешок развивается из археспория с нередуцированным числом хромосом;

2. Апоархеспория – отсутствие археспорогенеза и спорогенеза. Зародышевой мешок развивается из вегетативных клеток нуцеллуса с нередуцированным числом хромосом;

3. Апозиготия – отсутствие оплодотворения, зародышевой мешок развивается из неоплодотворенной яйцеклетки (редуцированный партеногенез);

4. Апогаметия – зародышевый мешок развивается не из яйцеклетки, а из синергид или антипод (редуцированный партеногенез).

Таким образом, зародыш может образовываться из самых разнообразных клеток и тканей. По мнению Петрова (1988), апомиксис можно рассматривать, как бесполое размножение, к которому относятся формы, сохраняющие связь с образованием семян. Агамосперное растение производит семена, в которых зародыши развиваются исключительно бесполом путем.

С.С. Хохлов (1970а, 1970б) рассматривал распространенность апомиксиса в связи с основным эволюционным трендом растений – уменьшение роли гаметофита и повышение роли спорофита. По его мнению, происходит последовательное упрощение эмбриогенеза и роли гаметофита, между тем как развитие спорофита усиливается. Гаплоидная фаза как бы постепенно вытесняется диплоидной. Если у мхов гаплоидное поколение доминирует, то у папоротников спорофит (бесполое поколение) является доминирующей фазой в жизненном цикле. Гаметофит у папоротников развивается внут-

ри спорофита: происходит образование антеридиев и архегониев, осуществляется оплодотворение (Takhtajan, 1997). У голосеменных гаметофит, находясь в очень редуцированном состоянии, развивается в полной зависимости от спорофита. В то же время эндосперм (мегагаметофит), являющийся составной частью гаметофита голосеменных, остается жизнеспособным и сохраняется после оплодотворения, питая развивающееся новое поколение спорофита. На самой высшей ступени эволюции у покрытосеменных триплоидный эндосперм возникает в результате акта оплодотворения. Основные его функции ограничиваются участием в репродуктивных процессах (Хохлов, 1949а, 1949б).

По мнению С.С. Хохлова, независимое появление апомиктов в разных филогенетических группах, фенотипическая пластичность заставляют признать за ними эволюционную перспективность. (Хохлов, 1949а, 1949б). Термин апомиксис понимается в широком и узком значении бесполого воспроизведения, как синоним агамоспермии или бесполосемянности. В широком смысле – подразумевается распространение его на все вторично-беспольные формы воспроизведения (Хохлов, 1967). Кроме того, имеется мнение, что апомиксис у таксонов эволюционизировал независимо от половых предковых форм (Hand et al., 2015). Апомиксис рассматривается, как вариация полового размножения, при котором определенные этапы полового развития утрачены, изменены и десинхронизированы (Cossniklaus et al., 2003).

Бесполое размножение хорошо продемонстрировано у цитрусовых (*Citrus*) (Naumova, 1993). У последних из клеток нуцеллуса и интегумента могут массово развиваться соматические зародыши (до 80 и более) (Ranganath, 2004). Вероятно, в нуцеллярной ткани сосредоточены тотипотентные клетки, обеспечивающие образование потомства. Таким образом, в пределах семязачки любая соматическая клетка может привести к бесполому воспроизведению и дать начало новому организму. Отсюда возник термин “бесполое семенное размножение”, как синоним апомиксиса (Минина, Ларионова, 1979). Однако, если размножение бесполое, то, следовательно, допустимо его принимать как вегетативное. Об этом свидетельствуют факты образования зародыша из соматической ткани, какой, например, является ткань нуцеллуса цитрусовых или в процессе соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro*. Согласно концепции Nogler (1994), к апомиксису можно отнести не только интегументальную эмбрионию, но и монозиготическую кливажную эмбрионию (образование однойяйцевых близнецов – двойней, тройней и т.д., из соматических клеток полового зародыша). Т.Н. Наумова также рассматривала адвентивную эмбрионию в каче-

стве формы апомиксиса, но исключала из него ключевую полиэмбрионию (Naumova, 1993).

При изучении механизма перехода растений на путь апомиксиса привлекаются молекулярно-генетические исследования. Выявлены гены и локусы, влияющие на мегаспорогенез, мегагаметогенез, эмбриогенез и партеногенез в результате экспрессии которых происходит изменения в половом процессе и индукция апомиксиса (Brukhin, 2017a, 2017b).

Таким образом, в литературе нет единого мнения о понятии апомиксиса у растений. Большинство авторов используют термин апомиксис в узком смысле (гаметофитный апомиксис) или несколько шире (гаметофитный апомиксис + адвентивная нуцеллярная и интегументальная) полиэмбриония).

Т.Б. Батыгиной в качестве новой категории вегетативного размножения растений было введено понятие “эмбриоидогения”. Это один из типов гомотипной репродукции цветковых растений *ex situ*, *in vivo* и *in vitro*. Элементарной структурной единицей является эмбриоид – новый индивидуум, формирующийся в семени или на вегетативных органах асексуально. Эмбриоид имеет биполярную организацию с апексами побега и корня и новой полярной осью, так же, как у полового зародыша. Для эмбриоида, как и для зародыша, характерно образование собственной оси, соединяющей полярно формирующиеся апексы побега и корня. Как правило, он не имеет общей аваскулярной системы с материнским организмом (закрытый радикулярный полюс) (Батыгина, 2000). При выделении эмбриоидогении в особый тип репродукции и размножения использовались два критерия: онтогенетический и морфологический. Кроме того, в зависимости от происхождения и положения соматических зародышей на материнском растении, были выделены две основные формы “эмбриоидогении”: репродуктивная, или флоральная (образование проэмбрио в цветке и семени), и вегетативная (формирование адвентивных зародышей на листьях, побегах и корнях) (Батыгина, Васильева, 2002; Митрофанова, 2009). При гаметофитном апомиксисе и адвентивной эмбрионии, а также монозиготической квиважной эмбрионии (Maheschwari, 1950) происходит клонирование материнского организма и образование матроклинного потомства (Brukhin, 2017a, 2017b). Этот феномен, как будет показано далее, четко проявляется в культуре *in vitro*.

ВОЗМОЖНОСТЬ АПОМИКСИСА У ХВОЙНЫХ

Признаки проявления апомиксиса были обнаружены у голосеменных растений. Эти признаки связаны с нарушением полового процесса (Минина, Ларионова, 1979). Образование семян с зародышем без оплодотворения было обнаружено у

Pinus pinaster (Saxton, 1909), *Pinus nigra*, *Pinus wallichiana* (Mehra, Dogra, 1975), *Pseugotsuga menziesii* (Orr-Ewing, 1957). В семяпочках *Pinus pinaster* ядро яйцеклетки начинает делиться раньше, чем ядро спермия достигнет архегония (Saxton, 1909). Явление, близкое к апомиксису, было обнаружено у *Abies pindrow*, у которой происходило слияние ядра брюшной канальцевой клетки с ядром яйцеклетки (Dogra, 1966).

Курдиани (2014) обнаружил довольно распространенное явление – образование семян с зародышем без оплодотворения у листовенных и хвойных древесных видов. Этот феномен был назван им “партеноспермия”. Описанные явления встречались у *Pinus elliotii*, *Pinus taeda*, *Pinus paluster*, *Pinus virginiana*, *Pinus echinata*, произрастающих на северных участках штата Северная Каролина (McLemore, 1975), и *Pinus sibirica* и *Pinus sylvestris* в Сибири (Третьякова, 1990). Образование семян с зародышами в условиях, исключающих оплодотворение, было отмечено у *Pseugotsuga menziesii* при изоляции женских шишек. (Orr-Ewing, 1957). Для *Pseugotsuga menziesii* характерна ярко выраженная самостерильность и тенденция к агамоспермии (апомиксису). Имеются данные об образовании семян с зародышем в отсутствии мужских шишек у растений класса цикадовых, гинкго, пихты бальзамической (Hutchinson, 1915; Chamberlain, 1935).

Необычная форма апомиксиса была обнаружена у *Cupressus dupreziana* в Северной Африке (Pichot et al., 2008). Этот реликтовый кипарис насчитывал всего 231 дерево. При опылении *C. dupreziana* пыльцой *C. sempervirens* гибридные зародыши оказались диплоидными. Измерение содержания ДНК в пыльцевых зернах обоих видов показало, что пыльца *C. dupreziana* была диплоидной, в то время как пыльца *C. sempervirens* гаплоидной. В диплоидном потомстве *C. dupreziana* были выявлены только отцовские варианты. Эти данные были подтверждены анализом ДНК. Авторы заключили, что в данном случае имеет место уникальное явление “мужской апомиксис”. При опылении *C. dupreziana* пыльцой *C. sempervirens* были получены гаплоидные растения. Это позволило Пихоту с коллегами сделать вывод об отсутствии функциональных яйцеклеток у материнских деревьев *C. dupreziana*. На основании генетического анализа было сделано заключение об андрогенном бесполом типе размножения *C. dupreziana*. Данные Пихота с соавторами (Pichot et al., 2008) показывают, что апомиксис препятствует инбридингу и способствует выживанию кипариса. Не исключено, что апомиксис обнаруженный у данного вида может наблюдаться и у других видов хвойных.

Е.Г. Минина высказала предположение о том, что возникновение апомиксиса у хвойных может происходить при нарушениях в процессе нормаль-

ного семеношения дерева, особенно часто наблюдаемого у гетерозисных форм (Минина, Ларионова, 1979). Такие формы деревьев у *Pinus sibirica* редки, но систематически встречаются в Западном Саяне. Женские шишки и семена их развиваются по однолетнему циклу (вместо двухлетнего) и характеризуются высоким физиолого-биохимическим потенциалом вегетативных и генеративных органов, что проявляется в повышении углеводного, аминокислотного и гормонального обмена. Цитозембриологические исследования особей сосны сибирской с однолетним репродуктивным циклом показали, что формирование начальных этапов формирования гаметофитов у данных особей шло также как у типичных особей. Однако через один месяц после опыления у аномальных особей резко возросла активность женского гаметофита, через 2 мес. появились архегонии и формировались яйцеклетки. Однако оплодотворение яйцеклетки не происходило из-за отсутствия вторичного роста пыльцевых трубок или их медленного роста по направлению к архегониям. В этот период наблюдалось деление ядра яйцеклетки (Третьякова, 1990). Иногда шло образование проэмбрио, но зародыши у особей *Pinus sibirica* с однолетним репродуктивным циклом не образовывались. Признаки апомиксиса были обнаружены и при нарушении семеношения дерева у *Pinus sylvestris*, произрастающей в условиях экологического стресса (Третьякова, 1990). Деление в неоплодотворенных яйцеклетках сосны сибирской заслуживает особого внимания. Это явление говорит о возможности проявления начального этапа одного из разновидностей апомиксиса – партеногенеза. В данном случае проявляется гиногенез, при котором мужские гаметы приближаются к яйцеклетке, возможно, активируют ее морфогенез, но в дальнейшем развитии не участвуют. Следовательно, в семяпочках *Pinus sibirica* с однолетним циклом развития партеногенетическое развитие не реализуется. Согласно терминологии Т.Б. Батыгиной (2000), у таких особей происходит abortивный партеногенез.

По мнению Хохлова (1967, 1970а, 1970б) и Е.Г. Мининой и Н.А. Ларионовой (1979) апомиксис свойственен эволюционно продвинутым таксонам. Мы предполагаем, что деление неоплодотворенной яйцеклетки и значительное ускорение репродуктивного цикла у описанных выше форм *Pinus sibirica* являются признаками, свидетельствующими о эволюционной продвинутости кедров – акселератов (Tret'yakova, Lukina, 2017). В пользу последнего предположения свидетельствует ряд отличий в прохождении эмбрионального цикла у *Pinus sibirica*, связанных с акселерацией развития генеративных структур у данного вида по сравнению с другими соснами. Первое из них проявляется в период формирования женского гаметофита при опылении семяпочек. В пе-

риод опыления женский гаметофит у сосны сибирской находится в свободноядерной стадии развития, в то время как у других сосен ценоцитная стадия формирующегося женского гаметофита осуществляется только после опыления (Третьякова, 1990). Обычно по такому же пути идет развитие семяпочек у хвойных с однолетним циклом генеративного развития (*Larix, Picea, Abies*). Второе отличие эмбрионального развития связано с акселерацией развития мужского гаметофита. Мужской гаметофит сосны сибирской в год опыления развивается до трехклеточной структуры, т.е. проходит четвертый митоз из пяти, в то время как у других видов сосен развитие мужского гаметофита идет только до двухклеточной структуры (четвертый и пятый митоз идут в семяпочках второго года развития). Таким образом, семяпочки *Pinus sibirica* отличаются признаками продвинутой стадии среди сосен. Об этом же свидетельствует и появление форм-акселератов у сосны сибирской, у которой наблюдается прохождение эмбрионального цикла за один вегетационный период, вместо двух и, наконец, факты деления ядра яйцеклетки, свидетельствующие о том, что семяпочки *Pinus sibirica* могут развиваться по пути апомиксиса, на что указывали Е.Г. Минина и Н.А. Ларионова (1979). В целом, аномальные формы сосны сибирской с ускоренным циклом развития являются ценным материалом для биологических и селекционно-генетических исследований. Появление форм с однолетним репродуктивным циклом развития у *Pinus sibirica* представляют большой интерес для изучения эволюции хвойных.

Как указывалось выше, для эмбриогенеза видов хвойных характерно наличие полиэмбрионии. При этом особого внимания заслуживает кливажная полиэмбриония. Типы кливажной полиэмбрионии у голосеменных были описаны Х. Сингом (Singh, 1978), и нами у представителей семейства Pinaceae (Tret'yakova, Park, 2018). Согласно Ноглер (Nogler, 1984, 1994), у растений имеет место проявление монозиготической кливажной полиэмбрионии, которую он относит к апомиксису. У видов семейства Pinaceae один зиготический зародыш в результате кливажа расщепляется на четыре самостоятельных идентичных эмбриона. Возникновение таких зародышей происходит уже не половым путем. Следовательно, у голосеменных растений зародыши могут формироваться не только половым способом (амфимиксисом), но и бесполом (апомиксисом). Кливажная полиэмбриония у видов семейства Pinaceae успешно воспроизводится *in vitro*.

В литературе приводится описание опытов по индукции апомиксиса, как у покрытосеменных, так и голосеменных растений. При этом, кроме генетических способов, получивших широкое распространение (Петров, 1979), активно используются физиологические приемы с приме-

нением регуляторов роста. Обработка растворами гибберелловой кислоты сосны ладанной (*Pinus taeda*) и сосны румелийской (*P. peuce*) вызывало разрастание женских шишек, но семена в них не образовывались (Stuard, Gatheу, 1961). При обработке дуглассии растворами индолилмасляной кислоты и гибберелловой кислоты происходило образование вполне развитых семян с зародышами (Stuard, Gatheу, 1961). Под действием стимулирующих веществ у *Pinus pinaster* (Saxton, 1909), *Abies pindrow* (Dogra, 1966) и *Pseudotsuga menziessi* (Ogg-Ewing, 1957) образуются семена с зародышами без оплодотворения. Приведенные выше примеры деления неоплодотворенной яйцеклетки у *Pinus sibirica* (Третьякова, 1990), можно рассматривать в качестве предпосылки для появления бесполого размножения у голосеменных.

Для преодоления стерильности семян и выращивания недоразвитых зародышей наиболее перспективным является использование новых биотехнологий, направленных на культивирование мегагаметофитов и изолированных зародышей. Важным этапом в образовании растений в культуре *in vitro* является определение факторов, вызывающих активацию мегагаметофитов и развития зародышей у разных форм сосны сибирской и особенно аномальных семяпочек с однолетним циклом развития женских шишек.

Методы активации мегагаметофитов и партеногенетического развития зародыша в настоящее время разработаны только для покрытосеменных растений (Кашин и др., 2000, 2006). При этом было показано, что активация семяпочек у неоплодотворенных завязей *in vitro* представителей семейства Asteraceae происходит при смещении баланса фитогормонов в сторону цитокининов. Ранний эмбриогенез осуществляется при смещении баланса гормонов в сторону ауксинов.

Культивирование мегагаметофитов *Pinus sibirica*, в том числе и с однолетним циклом развития, проведенное на стадии развития вакуолизованных архегониев показало, что эмбриональные процессы продолжались. У 10% эксплантов осуществлялось деление яйцеклетки, и шли этапы формирования проэмбрио. Однако дальнейшее развитие останавливалось (Tret'yakova, Novoselova, 2002). При этом были получены эмбриогенные клеточные культуры, способные к самоподдержанию и продуцированию эмбриоидов, из мегагаметофитов. Проведенные исследования по культивированию мегагаметофитов позволили нам подойти к проблемам размножения уникальных особей кедра сибирского с однолетним циклом развития.

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ

Особым типом репродукции у растений является соматический эмбриогенез, который наиболее

ярко проявляется в культуре *in vitro*. Соматический эмбриогенез — асексуальный способ размножения, при котором формирование зародыша происходит из соматической клетки растения (von Aderkas, Bonga, 1988; von Aderkas et al., 1990; Lelu et al., 1994; Klimaszewska, Cyr, 2002; von Arnold et al., 2002). Это уникальное явление бесполой репродукции, открытое в 1985 г. у *Picea abies* (Hakman et al., 1985; Chalupa, 1985), можно отнести к одной из разновидностей апомиксиса (вегетативного апомиксиса), т.к. зародыши возникают из соматических клеток, а развитие их идет по типу зиготических (половых) зародышей. Соматический зародыш, или эмбриоид (по Т.Б. Батыгиной, 2000), — зачаток нового организма, образующийся асексуально, имеющий биполярную структуру с апексом побега и корня и новой полярной осью, как у полового зародыша. В результате формируются полноценные растения, идентичные родительскому экземпляру (Tret'yakova et al., 2016). Деревья *Larix*, полученные через технологию соматического эмбриогенеза, в течение 8 лет успешно растут в почве лесопитомника (Tret'yakova, Park, 2018).

Феномен соматического эмбриогенеза основан на тотипотентности растительных клеток — любые соматические клетки, могут сохранять или приобретать эмбриогенную компетентность (Fehrer et al., 2003). Соматический эмбриогенез был индуцирован у 45 видов голосеменных растений, включая пять родов *Pinus*, *Picea*, *Abies*, *Larix*, *Pseudotsuga menziesii* (Becwar et al., 1990; Klimaszewska, Cyr, 2002; Stasolla, Yeung, 2003; Park et al., 2006; Klimaszewska et al., 2009; Tret'yakova, Barsukova, 2012; Lelu-Walter et al., 2013; Tret'yakova, Shuvaev, 2016 и др.). Эксплантами могут быть зиготические зародыши незрелых семян, семядоли прорастающих семян (Lelu et al., 1994), а также однолетние побеги (Malabadi, van Staden, 2005) и незрелые микроспоры (андроклинные культуры) (Tret'yakova et al., 2006).

Выделяют два пути соматического эмбриогенеза. Первый путь — прямой соматический эмбриогенез, когда зародыши образуются непосредственно из клеток эксплантата без этапа каллусообразования. В этом случае соматические зародыши формируются из соматических клеток эксплантата (Tret'yakova, Park, 2018). Второй — непрямой, или косвенный, эмбриогенез, когда пролиферация каллуса является необходимым этапом. В непрямом соматическом эмбриогенезе задействованы “индуцированные эмбриогенные детерминированные клетки”. Наряду с первичным соматическим эмбриогенезом происходит вторичный эмбриогенез, когда на поверхности сформировавшихся соматических зародышей образуются добавочные эмбриоиды (Митрофанова, 2009).

Экспериментальным путем было показано, что индукция и реализация соматического эм-

бриогенеза у хвойных – процесс многоступенчатый, включающий применение разнообразных химических соединений, в том числе и гормональных.

Он включает:

- индукцию эмбрионных культур – формирование эмбрионально-суспензорной массы;
- пролиферацию эмбрионально-суспензорной массы и мультипликацию соматических зародышей;
- созревание соматических зародышей;
- прорастание соматических зародышей;
- формирование растений-регенерантов.

Все эти фазы характеризуются определенными молекулярными событиями (Klimaszewska et al., 1997; Mac-Kay et al., 2006; Trontin et al., 2015; Zang et al., 2019). Первая фаза (фаза индукции) соматического эмбриогенеза характеризуется проявлением у дифференцированных соматических клеток эмбрионной компетентности как прямой (без дедифференциации клеток), так и не прямой, через каллусообразование. Можно представить себе и третий путь соматического эмбриогенеза – комбинированный, когда образование соматических зародышей происходит непосредственно из соматических клеток (прямой путь) и образуется эмбрионный каллус с дальнейшей мультипликацией соматических зародышей в течение длительного периода времени (десятки лет).

Индукция клеточной компетентности к соматическому эмбриогенезу идет под влиянием сигналов – гормонов (ауксины, цитокинины), факторов стресса (осмотический, оксидазный и водный стрессы), ионы тяжелых металлов, pH, температуры, света, механических или химических повреждений и др. (Ikeda-Iwai et al., 2003). Любой стресс может вызвать реорганизацию хроматина и изменение экспрессии генов, а также изменение клеточного метаболизма и физиологических процессов и вызвать переход соматической клетки на эмбрионный путь развития (Feher et al., 2003). Имеются данные об изменении паттерна метилирования ДНК в процессе соматического эмбриогенеза (Morcillo et al., 2008; Duarte-Ake et al., 2016).

Разными исследователями были предложены следующие механизмы формирования соматических зародышей:

- формирование соматических зародышей в результате асимметричного деления отдельных клеток экспланта (von Arnold et al., 2002; Belorussova, Tret'yakova, 2008);
- кливажная полиэмбриония (von Aderkas et al., 1991; Stasolla, Yeung, 2003; Tret'yakova, Park, 2018).

В основе соматического эмбриогенеза, также, как и зиготического, лежит полярность и асим-

метричное деление. Апикально-базальная полярность оси проявляется уже в яйцеклетке и зиготе, которая сохраняется при дальнейшем развитии зародыша (Pullman, Webb, 1994; von Arnold et al., 2002). Первое деление зиготы асимметрично и приводит к образованию двух неравных клеток: маленькой терминальной, которая дает начало зародышу и большой базальной клетке, дающей начало клетке-трубки и суспензору, при этом полярность, заложенная в зиготе, в результате ее деления, поддерживается и передается дочерним клеткам. При индукции соматического эмбриогенеза происходит вытягивание клеток под действием ауксинов в питательной среде. Вытянутые клетки поляризуются и асимметрично делятся. Эти признаки, по-видимому, и являются основными морфологическими критериями, указывающими на переход соматических клеток на путь соматического эмбриогенеза (Tret'yakova, 2013; Tret'yakova, Park, 2018). В результате асимметричного деления на одном из полюсов вытянутой клетки образуется маленькая клетка, из которой будет формироваться и длинная вытянутая клетка суспензора (von Aderkas et al., 1991; Filonova et al., 2002; Tret'yakova, Park, 2018).

У голосеменных растений, особенно из семейства Pinaceae, ярко выражен феномен кливажной полиэмбрионии *in vivo*, в результате которого эмбриональные инициалы 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, 1933). 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 у соматических зародышей в культуре *in vitro* под действием гормонов.

Кливажная полиэмбриония – наиболее загадочный феномен соматических зародышей. Этот процесс протекает в течение всей жизни эмбрионной культуры. Так, например, в полученных нами пролиферирующих эмбрионных культурах *Larix sibirica* в течение десяти лет идет активная мультипликация соматических зародышей через кливаж (Tret'yakova, Park, 2018), которые при переводе на среду с АБК созревают и образуют регенеранты. Соматический полиэмбриогенез у *Larix sibirica*, также как у других хвойных, можно рассматривать как повторяющийся кливажный процесс (receptive cleavage process),

заложенный в зиготе (Gupta, Dursan, 1987). Реализация этого процесса активно происходит у лиственницы сибирской в культуре *in vitro* на стадии глобулы, где создаются оптимальные условия для кливажирования.

Как указывалось выше, к апомиксису относят и монозиготическую кливажную полиэмбрионию (образование однойцевых близнецов — двойней, тройней и т.д.) (Nogler, 1986, 1994). В отличие от цветковых растений, где кливажая полиэмбриония, как правило, встречается спорадически, в виде отклонений, у хвойных растений кливаж зародыша — естественный (закономерный) процесс, связанный с особенностью их размножения, и проявление его в культуре *in vitro* при соматическом эмбриогенезе закономерно. Активную кливажную полиэмбрионию у *Larix* на стадии развития глобулярного зародыша, вероятно, можно связать с компетентностью его клеток к различным воздействиям, в частности ауксинам. Импульс в виде притока ауксина в зародыш из питательной среды приводит к перепрограммированию клеток глобулы и приобретению способности ее к восприимчивости и транспорту ауксина. Возможное накопление ауксина в глобуле и снижение его в базальной части, создает градиент полярности, в результате которой образуются эмбриональные трубки (суспензор) и в которых, по данным нашего иммуно-гистохимического исследования (Tret'yakova et al., 2019) ауксина накапливается очень мало. Вероятно, разделение глобулы приводит к полному расщеплению суспензора и обособлению эмбрио. Кроме того, массовое размножение соматических зародышей у лиственницы происходит и в результате разобщения эмбриональных трубок суспензора (Stasolla, Yeung, 2003; Tret'yakova, Park, 2018). Разобщение эмбриональных трубок суспензоров в пролиферирующей эмбриональной-суспензорной массе лиственницы сибирской приводит к множественному формированию глобулярных соматических зародышей через асимметричное 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 суспензоры (Tret'yakova, Park, 2018).

Как указывалось выше, Nogler (1986, 1994) относил монозиготическую кливажную полиэмбрионию к разновидности апомиксиса. Кливажную полиэмбрионию, наблюдаемую у зиготических и особенно соматических зародышей хвойных, вероятно также можно отнести к апомиксису. Полиэмбриогенез соматических зародышей через кливаж у лиственницы сибирской в культуре идет уже более десяти лет (Tret'yakova, Park, 2018). Соматические зародыши вызревают на среде с АБК, и прорастают. Клонированные деревья успешно растут уже в

течении 8 лет в почве лесопитомника. Это бесполой тип размножения.

Ранее нами было показано, что размножение соматических зародышей в культуре *in vitro* происходит не только в результате кливажной полиэмбрионии, но и (значительно реже) за счет образования адвентивных почек на суспензоре (Tret'yakova, Park, 2018). Аналогичное почкообразование было описано у *Picea abies* (von Aderkas et al., 1990).

Подобная пролиферативная активность эмбриогенных культур была показана ранее в культуре мегагаметофитов *L. decudua* и культуре зародышей гибридов лиственницы (*Larix × eurolepis* и *Larix × marschlinsii*) (Lelu-Walter, Pâques, 2009), где образование ЭСМ шло в течение 9—17 лет. Таким образом, процесс соматического полиэмбриогенеза хвойных *in vitro* на примере *Larix sibirica* может идти за счет кливажной полиэмбрионии и почкования суспензора. Общность морфогенетических процессов, лежащих в основе развития зиготических и соматических зародышей хвойных видов (Tret'yakova, Park, 2018), подтверждает концепцию Т.Б. Батыгиной (2000) о параллелизме их развития *in vivo* в культуре *in vitro*.

Известно, что соматический эмбриогенез идет под строгим генетическим контролем. Только отдельные деревья-доноры способны формировать эмбриогенный каллус и соматические зародыши в культуре *in vitro* (MacKay et al., 2001, 2006; Tret'yakova et al., 2012). В настоящее время проводятся активные исследования по выяснению молекулярно-генетических механизмов соматического эмбриогенеза не только у покрытосеменных, но и голосеменных растений. Большое внимание уделяется геномике, транскриптомике, протеомике и метаболомике (Trontin et al., 2015). Выявлены ключевые гены, контролирующие соматический эмбриогенез у *Arabidopsis thaliana* — модельного растения в различного рода биологических исследованиях, в том числе и молекулярно-генетических. Несмотря на то, что модель эмбриогенеза у голосеменных растений значительно отличается от модели эмбриогенеза арабидопсиса, большинство генов (78%), контролирующих соматический эмбриогенез у представителей голосеменных растений являются генами-ортологами, кодирующими белки, выполняющие идентичные или сходные функции (Dong, Dunstan, 2000; MacKay et al., 2006; Cairney, Pullman, 2007; Li et al., 2013, 2014, 2016; Zhang et al., 2014; Rupps et al., 2016). Несмотря на многочисленные экспериментальные данные, мы еще далеки от понимания ключевых этапов перехода дифференцированных соматических клеток к тотипотентному и эмбриогенному состоянию. Идентификация генов (*SERK*, *BBM*, *LEC1*, *LEC2*, *LEC3*, *FUS3* и др.), экспрессия которых предположительно ассоциирована с апомиксисом у покрытосеменных растений

(Brukhin, 2017a, 2017b) или переходом соматических клеток в эмбрионное состояние у голосеменных растений *in vitro* (Aquea, Arce-Johnson, 2008; Li et al., 2013, 2014, 2016; Rupps et al., 2016), имеет важное значение для дальнейшего изучения механизма регуляции развития растений и их клонального размножения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У видов класса *Penopsida*, наряду с половой репродукцией, наблюдаются разные типы бесполого размножения (апомиксиса). К ним относится слияние брюшной канальцевой клетки с яйцеклеткой, нуцелярная эмбриония, гемигамия и андрогенез. Наиболее ярко бесполое размножение у хвойных проявляется при соматическом эмбриогенезе в культуре *in vitro*. Закономерности морфогенеза соматических и половых зародышей у хвойных идут по одной схеме: асимметричное деление клеток, образование глобулярных зародышей и длинных суспензоров, формирование тканей и органов зародыша в процессе созревания глобулярных соматических зародышей. Это подтверждает концепцию Т.Б. Батыгиной (1999, 2000) о параллелизме развития соматических и половых зародышей цветковых растений. Особого внимания заслуживает кливажная полиэмбриония. В естественных условиях у половых зародышей хвойных происходит разделение эмбрио на четыре самостоятельных зародыша. Этот тип бесполого размножения у хвойных реализуется в процессе соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* под действием регуляторов роста. Длительный кливажный процесс при соматическом эмбриогенезе растягивается на долгие годы и способствует активной мультимпликации глобулярных зародышей, а затем и клонируемых растений. Клональное воспроизводство растений через соматический эмбриогенез и криоконсервация эмбрионных клеточных линий, идентичных материнскому генотипу, является отличной платформой для лесовозобновления и лесовосстановления. Создание сортовых генетически тестированных плантаций через соматический эмбриогенез уже в течение 20 лет практикуется в Канаде, США и ряде евроейских стран (программа *Multi-Variety Forestry, MVF, Park, 2014*). Идентификация генов, регулирующих ключевые этапы соматического эмбриогенеза, будет способствовать развитию генной инженерии для получения самоконирующих растений с признаками гетерозиса. В качестве примера мы неоднократно приводили уникальные особи *Pinus sibirica* с однолетним репродуктивным циклом. Согласно теории немецкого ученого Ганса Винклера, созданной в начале XX в., к термину “апомиксис” относятся все типы бесполого размножения. Апомиктические зародыши возникают не в результате слияния женских и мужских клеток, а благодаря клонированию материн-

ских тканей. Соматический эмбриогенез у хвойных в культуре *in vitro* является ярким проявлением бесполого типа размножения. Мы предлагаем отнести тип репродукции через соматический эмбриогенез у хвойных к апомиксису – вегетативному апомиксису.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность Рецензенту за ценные советы при написании рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках бюджетного проекта ФГБНУ ИЛ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН (проект № 0356-2019-0024 “Биоразнообразие коренных хвойных и производных лесных экосистем”), а также при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ-Бел_а № 18-54-00010 “Молекулярно-генетические маркеры соматического эмбриогенеза у хвойных” и гранта РФФИ и Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки № 19-44-240009 “Регенерационный потенциал эмбрионных культур хвойных *in vitro*, обработанных антимикробными пептидами грибного и растительного происхождения”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы внесли равный вклад в обсуждении результатов анализа имеющихся данных по размножению растений класса *Pinopsida* и подготовку статьи для публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батыгина Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиол раст. 1999. Т. 46. № 6. С. 884–898.
- Батыгина Т.Б. Семенное размножение. Амфимиксис и апрмиксис. Часть 3. В кн. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 2000. С. 142–146.
- Батыгина Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: ДЕАН, 2014. 764 с.
- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. СПб: СПбГУ, 2002. 232 с.

- Кашин А.С., Блюднева Е.А., Седлецкая О.В., Григорьева В.В. Особенности развития мегагамет апомиктических и половых форм Asteraceae в культуре неоплодотворенных завязей *in vitro* // Физиол. раст. 2000. Т. 47. № 4. С. 548–554.
- Кашин А.С. Гаметофитный апомиксис как неустойчивая система семенного размножения у цветковых. Саратов: Научная книга, 2006. 309 с.
- Курдиакки С.З. Из биологии плодоношения лесных пород. О партенокарпии и партеноспермии // Сельское хозяйство и лесоводство. 1914. № 1. С. 60–74; № 2. С. 270–291; № 3. С. 455–476.
- Лутова Л.А., Ежова Т.А., Додуева И.Е., Осипова М.А. Генетика развития растений. СПбН-Л., 2010. 432 с.
- Минина Е.Г., Ларионова Н.А. Морфогенез и пол у хвойных. М.: Наука, 1979. 216 с.
- Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения растений // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41. № 6. С. 496–509.
- Носкова Н.Е., Третьякова И.Н., Муратова Е.Н. Микроспорогенез и формирование пыльцы у сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) в условиях современного климата Сибири // Известия РАН. Серия биол. 2009. Т. 3. С. 379–384.
- Петров Д.Ф. Генетически регулируемый апомиксис. Новосибирск: Наука, 1979. 278 с.
- Поддубная-Арнольди В.А. Цитозембриология покрытосеменных растений. М.: Наука, 1976. 500 с.
- Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных (Физиологические аспекты). Новосибирск: Наука, 1990. 157 с.
- Хохлов С.С. Бесполосеменные растения // Учен. Зап. Саратов. Гос. ун-та, 1949а. Вып. 11. С. 5–197.
- Хохлов С.С. Перспективы эволюции высших растений, Саратовский Госпединститут, 1949б.
- Хохлов С.С. Апомиксис: классификация и распространение у покрытосеменных растений // Успехи современной генетики. 1967. Вып. 1. С. 43–105.
- Хохлов С.С. Эволюционно-генетические проблемы апомиксиса у покрытосеменных растений. Апомиксис и селекция. М.: Наука, 1970а. С. 105–115.
- Хохлов С.С. Апомиксис: классификация и распределение у покрытосеменных растений. Апомиксис и селекция. М.: Наука, 1970б. С. 7–21.
- Ainsworth C. Sex redefined: The idea of two sexes is simplistic. Biologists now think there is a wider spectrum than that // Nature. 2015. V. 518(7539). P. 288–291.
- Aquea F., Arce-Johnson P. Identification of genes expressed during early somatic embryogenesis in *Pinus radiata* // Plant Physiology and Biochemistry. 2008. V. 46. P. 559–568.
- Asker S.E. Viewpoints on apomictic and sexual reproduction in angiosperms // Acta Soc. Bot. Polon. 1981. V. 50. № 1–2. P. 195–200.
- Battaglia E. Apomixis // Recent Advances in the Embryology of Angiosperms / Ed. Maheshwari P. Delhi, 1963. P. 221–264.
- Batygina T.B. Integrity and reliability system in ontogenesis and evolution // Intern. J. Plant Reprod. Biol. 2012. V. 4. № 2. P. 107–120.
- Becwar M.R., Nagmani R., Wann S.R. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*) // Can. J. Forest. Res. 1990. V. 20. P. 810–817.
- Belorussova A.S., Tretyakova I.N. Patterns of somatic embryo formation in Siberian larch: Embryological aspects // Russ. J. Dev. Biol. 2008. V. 39. № 2. P. 83–91.
- Brukhin V. Is sex irreplaceable? Towards the molecular regulation of apomixis // The International J. Plant Reproductive Biology. 2017a. V. 9(2) Jul. P. 153–169.
- Brukhin V. Molecular and genetic regulation of apomixis // Russian Journal of Genetics. 2017b. V. 53. № 9. P. 943–964.
- Buchholz J.T. Suspensor and early embryo of *Pinus* // Bot. Gaz. 1918. V. 66. № 3. P. 185–228.
- Buchholz L.T. Determinate cleavage polyembryony with special reference to *Darcrudium* // Bot. Gaz. 1933. V. 94. P. 579–588.
- 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.
- Cairney J., Pullman G. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis // New Phytologist. 2007. V. 176. P. 511–536.
- Dogra P.D. Observation on *Abies pindrow* with a discussion on the question of occurrence of apomixis in gymnosperms // Silvae Genet. 1966. V. 15. № 1. 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* // Stockholm: Studia Forestalia Suecica. 1967. V. 45. P. 5–97.
- Dong J.Z., Dunstan D.I. Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers // Molecular Biology of Woody Plants / Eds. Jain S.N., Minorca S.C. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic, 2000. P. 51–87.
- Duarte-Aké F., Castillo-Castro E., Pool F.B., Espadas F., Santamaría J.M., Robert M.L., De-la-Peña C. Physiological differences and changes in global DNA methylation levels in *Agave angustifolia* Haw. albino variant somaclones during the micropropagation process // Plant Cell Reports. 2016. V. 35. № 12. P. 2489–2502.
- Fagerlind F. Die Terminologie der Apomixis Prozesse // Hereditas. 1940. V. 25. № 1. P. 17–22.
- Feher A., Pasternak T.P., Dutits D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state // Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2003. V. 74. № 3. P. 201–228.
- Filonova L.H., von Arnold S., Daniel G., Bozhkov O.V. Programmed cell death eliminates all but inembryo in a polyembryonic plant seed // Cell Death and Differentiation. 2002. V. 9. P. 1057–1062.
- Grant V. Plant Speciation. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1981. P. 1–528.
- Grossniklaus U., Moore J.M., Brukhin V. et al., Engineering of apomixis in crop plants: what can we learn from sexual model systems // Plant Biotechnology 2002 & Beyond / Ed. Vasil J.K. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2003. P. 309–314.
- Gupta P.K., Durzan D.J., Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine // Bio. Technology. 1987. V. 5. P. 147–151.

- Gustafsson A.* Apomixis in higher plants. II. The causal aspects of apomixis // *Lunds Univ. Arsskr. NF Avd. II.* 1947. V. 43. 69 p.
- Hagman M., Mikkola L.* Observations on cross-self and interspecific pollination in *Pinus peuce* Grieseb // *Silvae Genet.* 1963. V. 12. № 3. P. 73–79.
- Hakman I., Fowke L.C., von Arnold S.* 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.
- Hand M.L., Vit P., Krahulcová A. et al.* Evolution of apomixes in *Pilapsella* and *Hieracium* (Asteraceae) interred from the conservation of apomixes – liked markers in natural and experimental populatins // *Heredity* (Edinburgh), 2015. V. 114. № 1. P. 17–26.
- Hutchinson A.H.* Fertilization in *Abies balsamea* // *Bot. Gaz.* 1915. V. 69. P. 457–470.
- Ikeda-Iwai M., Umehara M., Saton S., Kamada H.* Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana* // *The Plant J.* 2003. V. 34. P. 107–114.
- Klimaszewska K., Devantier Y., Lachance D., Lelu M.-A., Charest P.J.* *Larix laricina* (tamarack) somatic embryogenesis and genetic transformation // *Can. J. Forest Res.* 1997. V. 27. № 4. P. 96–208.
- Klimaszewska K., Noceda C., Pelletier G., Label P., Rodriguez R., Lelu-Walter M.-A.* Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.) // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2009. V. 45. № 1. P. 20–33.
- Klimaszewska K., Cyr D.R.* Conifer somatic embryogenesis: I. Development // *Dendrobiology.* 2002. V. 48. P. 31–39.
- Klimaszewska K., Hargreaves C., Lelu-Walter M.A., Trontin J.F.* Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. / *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants.* New York: Humana Press, 2016. P. 131–166.
- Koski V.* On self-pollination, genetic load, and subsequent inbreeding in some conifers // *Comm. Inst. For. Fenn.* 1973. V. 78. № 10. P. 1–40.
- 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.* V. 1994. 24. № 1. P. 100–106.
- Lelu-Walter M.A., Pâques L.E.* Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix × eurolepis* and *Larix × marschlinsii*). Perspectives for breeding // *Annals of Forest Science.* 2009. V. 66. № 1. P. 194.
- Lelu-Walter M.A., Thompson D., Harvengt L., Sanchez L., Toribio M., Paques L.* Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction // *Tree Genetics and Genomics.* 2013. V. 9. P. 883–899.
- Li S., Li W., Han S., Yang W., Qi L.* Stage-specific regulation of four HD-ZIPIII transcription factors during polar pattern formation in *Larix letolepis* somatic embryos // *Gene.* 2013. V. 522. P. 177–183.
- Li S., Li W., Han S., Yang W., Qi L.* The post-transcriptional regulation of LaSCL6 by miR 171 during maintenance of embryogenic potential in *Larix kampferi* (Lamb) // *Carr Tree Genetics and Genomics.* 2014. V. 100. № 1. P. 223–229.
- Li S., Li W., Han S., Li W., Xu H., Yang W., Lin Y., Fan Y., Qi I.* Over-expression of mi R166a inhibits cotyledons formation in somatic embryos and promotes lateral root development in seedlings of *Larix leptolepis* // *Plant Cell. Tissue and Organ Culture.* 2016. V. 127. № 2. P. 461–473.
- MacKay J., Becwar M., Park Y., Perfetti C., Cordero J., Pullman G., Lockhart L.* Genetics of somatic embryogenesis in loblolly pine // *Proceedings (publ no 48) 26th Southern Forest Tree Improvement Conference.* University of Georgia Athens, 2001. P. 40–47.
- MacKay J., Becwar M., Park V.-S., Cordero J.P., Pullman G.S.* Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implication for breeding // *Tree Genetics & Genomes.* 2006. V. 2. № 1. P. 1–9.
- Maheshwari P.* An Introduction to the Embryology of Angiosperms. N.Y.: McGraw-Hill Book Company, 1950. P. 1–453.
- Malabadi R.B., Van Staden J.* Somatic embryogenesis from vegetative shoots apices of mature trees of *Pinus patula* // *Tree Physiology.* 2005. V. 25. P. 11–16.
- McLemore B.F.* Anomalous growth of unpollinated sort leaf of *Pinus conelets* // *Forest Sci.* V. 1975. 21. № 4. P. 399–400.
- Mehra P.N., Dogra P.D.* Embryogeny of Pinaceae I. Proembryogeny II Proc. // *Indian. Nat. Sci. Acad.* 1975. V. 41. № 5. P. 486–497.
- Merkle S.A., Parrott W.A., Flinn B.S.* Morphogenic aspects of somatic embryogenesis // *In vitro Embryogenesis in Plants.* Dordrecht: Springer. 1995. P. 155–203.
- Morcillo F., Gagneur C., Adam H., Richard F., Singh H., Chean S.C., Rival Y., Duval Y., Treguer J.W.* Somaclonal variation in micropropagated oil palm. Characterization of two novel genes with enhanced expression in epigenetically abnormal cell lines and in response to auxin // *Tree Physiol.* 2008. V. 26. P. 585–594.
- Naumova T.K.* Apomixis in Angiosperms (Nucellar and Integumentary Embryony). London, Tokyo, CRC. Press. 1993. 141 p.
- Nogler G.A.* Gametophytic apomixis // *Embryology of Angiosperms* / Ed. Johri B.M. Berlin: Springer-Verlag, 1984. P. 476–518.
- Nogler C.A.* Gametophytes of apomixes – histological aspects // *Polish. Bot. Stud.* 1994. № 5. P. 5–11.
- Noskova N.E., Trtyakova I.N., Muratova E.N.* Microsporogenesis and pollrn formation of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) under moder climatic conditions of Siberia // *Biology Bulletin.* 2009. V. 3. P. 317–322.
- Orr-Ewing A.L.* Possible occurrence of viable unfertilized seeds in *Douglas fir* // *Forest Sci.* 1957. V. 3. № 3. P. 243–248.
- Orr-Ewing A.L.* Female sterility in Duglas-fir // *Silvae Genet.* 1966. Bd 26. № 2–3. P. 73–77.
- Park Y.S., Lelu-Walter M.A., Harvengt L., Trontin J.F., MacEacheron I., Klimaszewska K., Bonga J.M.* Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster* and *P. silvestris* at three laboratories in Canada and France // *Plant Cell Tissues and Organ Culture.* 2006. V. 86. P. 87–101.
- Park Y.-S.* Conifer somatic embryogenesis and multi-varietal forestry // *Challenges and Opportunities for the World's Forests in the 21st Century.* Forestry Sciences / Ed. Fenning T. Springer: Dordercht. 2014. V. 81. P. 425–439.

- Peng C., Gao F., Wang H., Shen H., Yang L. Physiological and biochemical traits in Korean pine // *Forest*. 2020. V. 11. P. 577–592.
- Pichot C., Liens B., Nava J.R. Cypress surrogate mother produces haploid progeny from alien pollen // *Genetics*. 2008. V. 178. № 1. P. 379–383.
- Pullman G.S., Webb D.T. An embryo staging system for comparison of zygotic and somatic embryo development // *Division Biological Sciences Symposium TAPPI*. Minneapolis. 1991. P. 31–34.
- Ranganath R.M. Harnessing the developmental potential of nucellar cells: barriers and opportunities // *Trends Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 504–510.
- Rupps A., Rasche J., Rummeler V., Linke B., Zoglauer K. Identification of putative homologs of *Larix decidua* to Baby Boom (BBM) LeafyCotyledon1 (LEG1), Wuschel-related Homeobox2 (WOX2) and Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase (SERK) during somatic embryogenesis // *Planta*. 2016. V. 243. № 2. P. 473–478.
- Saxton W.T. Parthenogenesis in *Pinus pinaster* // *Bot. Gaz.*, 1909. V. 47. P. 406–409.
- Sarvas R. Investigations on the flowering and seed crop of *Pinus silvestris* // *Metsätieteellisen Tutkimuslaitoksen Julkaisuja*. 1962. V. 53. № 4. P. 1–198.
- Singh H. Embryology of Gymnosperms. Berlin: Stuugard; Gebruder Borntraeger, 1978. 241 p.
- Stasolla C., Yeung E.C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003. V. 74. № 1. P. 15–35.
- Stattler R.F., Bawa K.S., Livingstone G.K. Experimental induction of haploid parthenogenesis in forest tree. Induced mutations in plants // Vienna: Intern. Atomic Energy Agency. 1969. P. 611–619.
- Stebbins G.L.J. Apomixis in angiosperms // *Bot. Rev.* 1941. V. 7. № 10. P. 507–542.
- Stuart N.W., Cathey H.M. Applied aspects of the gibberellins // *Annual Review of Plant Physiology*. 1961. V. 12. № 1. P. 369–394.
- Takhtajan A. Diversity and Classification of Flowering Plants. N.Y.: Columbia University Press. 643 p.
- Tretyakova I. Possibility apomixis in Conifers // *Apomixis Newsletter*. Mexico 1992. № 4. P. 11–13.
- Tretyakova I.N. Embryogenic cell lines and somatic embryogenesis in *in vitro* culture of Siberian larch // *Doklady Biological Sciences*. 2013. V. 45. № 1. P. 139–141.
- Tretyakova I.N., Pak M.E., Ivanitskaya A.S., Oreshkova N.V. Peculiarities of somatic embryogenesis of long-term proliferating embryogenic cell lines of *Larix sibirica in vitro* // *Russian J. Plant Physiology*. 2016. V. 63. № 6. P. 800–810.
- Tretyakova I.N., Barsukova A.S. Somatic embryogenesis in *in vitro* culture of three Larch species // *Russian J. Developmental Biology*. 2012. V. 43. № 6. P. 353–383.
- Tretyakova I.N., Kudoyarova G.R., Park M.E., Kazachenko A.S., Shuklina A.S., Akhiyarova G.R., Korobova A.V., Veselov S.U. Content and immunohistochemical localization of hormones during *in vitro* somatic embryogenesis in long-term proliferating *Larix sibirica* cultures // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2019. V. 136. № 3. P. 511–522.
- Tretyakova I.N., Lukina A.V. Acceleration of embryonic development of *Pinus sibirica* trees with a one year reproductive cycle // *Russian J. Developmental Biology*. 2016. V. 47. № 1. P. 41–48.
- Tretyakova I.N., Lukina A.V. Embryological peculiarities of interspecific hybridization of *Pinus sibirica* // *Russian J. Developmental Biology*. 2017. V. 48. № 5. P. 340–346.
- Tretyakova I., Novoselova N. Culture *in vitro* of megagametophytes and embryos of Siberian pine and formation of adventive buds // *Bulletin of the State Nikitsky Botanical Gardens*. № 86. Yalta, Ukraine, 2002. P. 23–26.
- Tretyakova I.N., Park M.E. Somatic polyembryogenesis of *Larix sibirica* in embryogenic *in vitro* culture // *Russian J. Developmental Biology*. 2018. V. 49. № 4. P. 222–233.
- Tretyakova I.N., Shuvaev D.N. Somatic embryogenesis in *Pinus pumila* and productivity of embryogenic lines during long-term cultivation *in vitro* // *Russian J. Developmental Biology*. 2018. V. 49. № 4. P. 222–233.
- Tretyakova I.N., Voroshilova E.V., Shuvaev D.N. Callusogenesis and somatic embryogenesis induction in hybrid embryos from seed of *Pinus sibirica* // *Russian J. Plant Physiology*. 2014. V. 61. № 4. P. 274–280.
- Tretyakova I.N., Vyazovetskova A.S., Ivanova A.N. Induction of Androgenic Cultures of Siberian Larch (*Larix sibirica* Ledeb.) // *Eurasian J. For. Res.* 2006. V. 9–1. P. 37–44.
- Trontin J.F., Klimaszewska K., Morel A., Hargreaves C., Lelu-Walter M.A. Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: a review of genome-wide approaches and recent insights // *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology*. 2015. V. 46. № 5. P. 276–693.
- Winkler H. Fortpflanzung der Gewishe / Vii Apomixis. Yandwörterbuch der Naturwissenschaft. Jena. 1934. № 4. P. 451–461.
- Von Aderkas P., Bonga J.M. Formation of haploid embryoids of *Larix decidua*: early embryogenesis // *American J. Botany*. 1988. V. 75. P. 690–700.
- Von Aderkas P., Bonga J., Klimaszewska K., Owens J. Comparison of larch embryology *in vivo* and *in vitro* // *Woody Plant Biotechnology* / Ed. Ahuja N.R. Plenum press. N.Y., 1991. P. 139–155.
- Von Aderkas P., Klimaszewska K., Bonga J.M. Haploid and diploid embryogenesis in *Larix leptolepis*, *L. decidua* and their reciprocal hybrids // *Can. J. For. Res.* 1990. V. 20. P. 9–14.
- Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyacho K.J., Filonova L. Developmental pathways of somatic embryogenesis // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2002. V. 69. P. 233–249.
- Zhang L., Li W.F., Xu H.Y., Qi L.W., Han S.Y. Cloning and characterization of four differentially expressed cDNAs encoding NEYA homologs involved in response to ABA during somatic embryogenesis in Japanese larch (*Larix leptolepis*) // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2014. V. 117. P. 293–304.
- Zang Q., Li W., Qi L. Regulation of *LaSCL6* expression by genomic structure, alternative splicing, and microRNA in *Larix kaempferi* // *Tree Genetics and Genomes*. 2019. V. 15. P. 57–67.

The Reproductive Potential of Conifers, Somatic Embryogenesis and Apomixis

I. N. Tretyakova^{1,*} and V. V. Mineev^{2,**}

¹*Sukachev Institute of Forest Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center SB RAS, Akademgorodok 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

²*Krasnoyarsk State Pedagogical University named after V.P. Astafiev, Ada Lebedeva ul. 89, Krasnoyarsk, 660049 Russia*

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

***e-mail: vvmineyev@mail.ru*

The article presents the results of the analysis of available data on the reproduction of plants of the Pinopsida class (sexual reproduction and asexual – apomixis). The possibilities of implementing apomixis in conifers are considered. This method of asexual reproduction is manifested when seed formation is disturbed. A special type of reproduction in conifers is somatic embryogenesis in in vitro culture. It is shown that the transition of somatic cells to the totipotent and embryogenic state in conifers occurs at the morphogenetic, physiological-biochemical, and molecular-genetic levels. The commonality of morphogenetic processes underlying somatic and zygotic embryogenesis is established. The place of somatic embryogenesis in the coniferous reproduction system is considered.

Keywords: reproduction, apomixis, somatic embryogenesis, Conifers