

УДК 581.143.6

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ МЕГАГАМЕТОФИТОВ И ЗАРОДЫШЕЙ СОСНЫ КЕДРОВОЙ СИБИРСКОЙ В КУЛЬТУРЕ *in vitro*<sup>1</sup>

© 2003 г. И. Н. Третьякова, Н. В. Новоселова

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН

660036 Красноярск, Академгородок

Поступила в редакцию 28.05.02 г.

Окончательный вариант получен 09.08.02 г.

Проводили эксперименты по выращиванию сеянцев из оплодотворенных яйцеклеток и незрелых зародышей у сосны кедровой сибирской в культуре *in vitro*. Культивирование мегагаметофитов в период от образования яйцеклетки до стадии глобулярного зародыша на среде Мурашиге-Скуга, содержащей гормоны, позволило манипулировать процессом оплодотворения и эмбриогенеза. Незрелые зародыши являются наиболее перспективными для культивирования *in vitro*. Их созревание и развитие проростков происходит через 7 сут культивирования. При культивировании зиготических зародышей наблюдается образование адвентивных почек из клеток в основании, а также кончиков семядолей. При субкультивировании адвентивных почек на среде, содержащей бензиламинопурин и нафтилуксусную кислоту, происходит образование органогенного каллуса и побегов. Таким образом, культивирование мегагаметофитов и зародышей сосны кедровой сибирской приводит к завершению эмбриогенеза и формированию жизнеспособных проростков.

**Ключевые слова:** сосна кедровая сибирская (*Pinus sibirica* Du Tour), мегагаметофиты, культура *in vitro*, зародыши.

Хвойные являются одним из наиболее трудных объектов при культивировании *in vitro* из-за слабой регенеративной способности, медленного роста и плохой укореняемости. Регенерация в культуре *in vitro* идет за счет адвентивного почкообразования и соматического эмбриогенеза (Cell and Tissue ..., 1987; Woody plant ..., 1989).

В последнее десятилетие выявлено, что наиболее высокая частота регенерации в культуре *in vitro* идет путем соматического эмбриогенеза, который широко используется у покрытосеменных растений и слабо изучен у хвойных. В настоящее время эмбриогенные ткани и соматический эмбриогенез обнаружены у шести видов ели: *Picea glauca* (Lu, Thorpe, 1987; Hakman, Fowke, 1987; Hakman, Arnold, 1988), *P. abies* (Arnold, Hakman, 1985, 1988; Hakman et al., 1985; Egertsdotter, Arnold, 1998; Vagner et al., 1998), *P. mariana* (Hakman, Fowke, 1987), *P. omorika* (Salopen et al., 1997), *P. engelmannii* (Roberts et al., 1991), *P. sitchensis* (Drake, John, 1997); у четырех видов сосны: *Pinus taeda* (Becwar et al., 1990; Liao, Amerson, 1995; Li et al., 1997), *P. elliotii* (Liao, Amerson, 1995), *P. strobus* (Finer et al., 1989; Klimaszewska, Smith, 1997), *P. lambertiana* (Gupta, Dursan, 1986); у двух видов лиственницы: *Larix decidua* (Nagmani, Bonda, 1985; Aderkas, Bonga, 1988; Behrendi, Zoglauer, 1996),

*L. leptolepis* (Ogita et al., 1997; Jourdain et al., 1997); у одного вида пихты: *Abies fraseri* (Guevin, Kirby, 1997) и у дугласии *Pseudotsuga menziesii* (Nagmani et al., 1991; Hong et al., 1991). При этом показано, что образование гаплоидных и диплоидных соматических эмбриоидов зависит от типа эксплантов (зародыши, мегагаметофиты), стадии развития зиготического зародыша, а также от применения активизирующей среды, включающей гормоны, углеводы, аминокислоты и другие вещества. Наиболее трудным при культивировании и выращивании соматических зародышей у хвойных, так же как и других культур *in vitro*, является их дозревание и образование зародышевых корней.

Для индукции соматического эмбриогенеза у хвойных в культуре *in vitro* необходимо знать закономерности, лежащие в основе эмбриональных процессов при формировании зиготических зародышей *in vivo* и *in vitro*. Сравнительные исследования эмбриогенеза *in vivo* и *in vitro* были проведены Адеркасом с соавт. (Aderkas et al., 1991) у видов *Larix*, эти авторы предложили терминологию для описания формирования зародышей *in vitro*; ход эмбриональных процессов в культуре *in vitro* изучен у *Picea abies* (Havel, Durzan, 1996), *Pinus aristata* и *P. monticola* (Fernando et al., 1998; Fernando, Owens, 2001), но культивирование мегагаметофитов *in vitro* у сибирских видов хвойных до сих пор не проводили.

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 99-04-48578, 02-04-48168).

Цитоэмбриологическая последовательность событий в процессе оплодотворения и раннего эмбриогенеза у *Pinus sibirica* и *P. sylvestris* была изучена нами (Третьякова, 1990). Она связана с длительным сроком формирования эмбриональных структур (от опыления до оплодотворения проходит 1 год), образованием нескольких архегониев (2-4), оплодотворением 2-3 яйцеклеток (в одной семязпочке), формированием 16-клеточного проэмбрио и, наконец, наличием кливажной полиэмбрионии, в результате которой каждая яйцеклетка дает начало четырем зародышам (Третьякова, 1990).

Таким образом, в коррозийной полости (зародышевом канале) одного гаметофита формируется до 16 зародышей, из которых только один (реже два) достигает стадии созревания. Кроме того, показано, что для эмбриогенеза сосны кедровой сибирской *Pinus sibirica* Du Tour характерно недоразвитие зародышей в зрелых семенах. Такие зародыши часто занимают менее половины длины зародышевого канала и требуют длительной холодной стратификации в течение 4-5 мес (Третьякова и др., 1997). Кроме того, у кедрового встречается гетерозисные генотипы (Ирошников, 1974; Минина, Ларионова, 1979), у которых созревание гаметофитов и в целом женской шишки проходит за один вегетационный период (вместо двух), а от опыления до созревания гаметофитов проходит 1.5-2 мес (вместо 1 года). Однако у данных особей в период созревания мужских и женских гамет оплодотворения не происходит, зародыши не образуются, но формиру-

ются беззародышевые семена с развитым эндоспермом (Третьякова, 1990).

Таким образом, для мегагаметофитов кедрового сибирского наряду с указанными выше особенностями эмбрионального процесса, характерного для *Pinus*, отмечается незавершенность эмбриогенеза и даже полное выпадение этой стадии развития из эмбрионального цикла у гетерозисных форм. Культивирование мегагаметофитов у кедрового сибирского в контролируемых условиях *in vitro* позволит понять закономерности формирования зиготических зародышей и определить условия, необходимые для появления соматических эмбрионов.

В настоящей статье впервые представлены результаты изучения особенностей развития мегагаметофитов и закономерностей формирования зародыша кедрового сибирского в контролируемых условиях в культуре *in vitro*. Также рассмотрены условия, необходимые для индукции соматического эмбриогенеза и адвентивного почкообразования.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объекты исследования - клоновые прививки кедрового сибирского *Pinus sibirica* Du Tour на сосну обыкновенную *Pinus sylvestris* L., растущие на территории экспериментальной базы Института леса "Погорельский бор", находящейся в 38 км от г. Красноярск, а также типичные и аномальные (гетерозисные с однолетним генеративным циклом) деревья, растущие в естественных древосто-

**Таблица 1.** Характеристика деревьев и их репродуктивной сферы

Объекты изучения	Характеристика женских генеративных органов	Генеративный цикл	Длина шишек, мм	Возраст, лет	Ли, см	$H_{1M}$	Длина хвои, см
Клон 2391*	Зрелые шишки средней величины. Семена некрупные	Двухлетний	50 ± 0.5	36	15.7	7.5	8.8
Клон 2301*	То же	То же	61 ± 0.9	36	<b>16.5</b>	7.9	8.7
Клон 2179*	»	»	61 ± 0.7	36	15.3	8.8	10.6
Клон 1649*	»	»	55 ± 0.7	36	17.3	8.5	9.1
№476	Типичное дерево. Зрелые шишки средней величины. Семена некрупные	»	63 ± 0.9	102	<b>65</b>	40	10.5
№492	Семенные чешуи в нижней части однолетних шишек иногда приближаются к чешуйкам второго года. Зрелые шишки и семена крупные. Повышенная встречаемость полиэмбрионии до 39%	»	64 ± 0.7	109	<b>68</b>	43	10.8
№ 1ш	Шишки и семена мелкие. Семена с развитым эндоспермом, но без зародыша	Однолетний	37 ± 0.5	100	<b>68</b>	40	13.5
№ 100	Развитие шишек с двумя вершинами. Характерно образование мелких семян с развитым эндоспермом, но без зародыша	То же	42 ± 0.3	100	70	42	13

\* По данным: Кузнецова, 2001.

**Таблица 2.** Варианты используемых сред MS с гормональными добавками

Среда MS, №	Гормоны, мг/л				
	ИУК	НУК	2,4Д	6-БАП	кинетин
1		0.1		0.5	
2	0.2			1	
3		0.1	0.2	0.03	
4		0.1	0.2		0.03
5			2		0.2
6	1				0.2
7	0.5				0.2
8				1	
9				2	
10		2		2	
11	Безгормональная				

ях Западного Саяна. Характеристики деревьев и женской генеративной сферы приведены в табл. 1.

С указанных выше деревьев в 1999-2001 гг. проводили сбор шишек (у типичных - 2-й г. развития, у аномальных - 1-й г. развития) в период, предшествующий оплодотворению, а также в периоды оплодотворения и последующего формирования проэмбрио и зародышей. Исследования были начаты 8 июня, сбор образцов шишек осуществляли систематически через каждые три дня до 5 июля и далее один раз в 10 дней до конца августа (срок созревания семян).

Из каждой шишки извлекали семяпочки, которые в каждом сборе делили на две партии: одну фиксировали смесью Навашина для приготовления постоянных препаратов (Паушева, 1980), а другую вводили в культуру *in vitro*.

Культивирование проводили на среде MS (Murashige, Skoog, 1962) со следующими гормонами: индолилуксусной кислотой (ИУК), нафтилуксусной кислотой (НУК), 2,4 дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4 Д), 6-бензиламинопурином (6-БАП) и кинетином (табл. 2).

При этом семяпочки стерилизовали в 3%-ном растворе йода и промывали три раза по 20 мин в стерильной дистиллированной воде. Затем в антисептических условиях семяпочки освобождали от жестких верхних покровов и помещали на агаризованную среду MS с фитогормонами.

При культивировании семяпочек в стадии зрелой яйцеклетки ткани нуцеллуса, в котором находились пыльцевые трубки, отрывались от мегагаметофита, поэтому в культуру вводили два варианта эксплантов: мегагаметофиты с нуцеллусом и изолированные.

Культивирование мегагаметофитов на стадии центральной клетки, архегониев со зрелой яй-

цеклеткой и в период оплодотворения осуществляли в два этапа, различающиеся составом компонентов модифицированной среды MS (Кашин и др., 2000). Первый этап был направлен на активизацию деления яйцеклетки и образование проэмбрио; ведущую роль в нем отводили цитокинам, концентрация которых превышала таковую ауксинов в пять раз, - MS1, MS2 (табл. 2). Второй этап был направлен на индукцию развития зародыша, он начинался со стадии глобулярного зародыша и его дифференциации (через 2-3 нед после оплодотворения). На данном этапе культивирования преимущество отдавали ауксинам - MS3-MS6 (табл. 2).

На более поздних сроках развития (конец июня-начало июля до окончания эмбриогенеза) проводили культивирование как зародышей вместе с мегагаметофитами, так и изолированных зародышей. Незрелые зародыши вместе с мегагаметофитами культивировали на средах MS5, MS6, изолированные недоразвитые зародыши (занимающие менее половины длины зародышевого канала) - на средах MS7, MS 11 (табл. 2), недоразвитые зародыши (занимающие более половины длины зародышевого канала) вместе с мегагаметофитами - на безгормональной среде MS11. Для получения адвентивных почек изолированные зиготические зародыши культивировали на средах MS8, MS9, а культивирование адвентивных почек проводили на средах MS9, MS 10 (табл. 2).

Для цитологического анализа образцы фиксировали, резали на микротоме, окрашивали проционовыми красителями (Иванов, 1982), гематоксилином по Гайденгайну и реактивом Фельгена-Шиффа; приготовление постоянных препаратов вели по общеизвестной методике (Паушева, 1980). Фиксацию семяпочек проводили в смеси Навашина в течение 24 ч, далее образцы промывали водой, проводили через серию спиртов и ксилола и заключали в парафин. Просмотр микроскопических образцов осуществляли на микроскопе "МБИ-6", СССР. Морфологические изменения фиксировали цифровой видеокамерой "Nikon", Япония.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Культивирование изолированных семяпочек и мегагаметофитов.* Культивирование изолированных зрелых семяпочек кедрового сибирского, собранных на стадии центральной клетки вакуолизованных архегониев (за 5-7 сут до оплодотворения), на средах MS1, MS2 показало, что эмбриональные процессы при двухэтапном режиме культивирования продолжаются очень редко. Слияние гамет, деление зиготы и образование проэмбрио происходит только у 10% эксплантов. У изолированных от нуцеллуса мегагаметофитов при данном режиме культивирования не наблю-

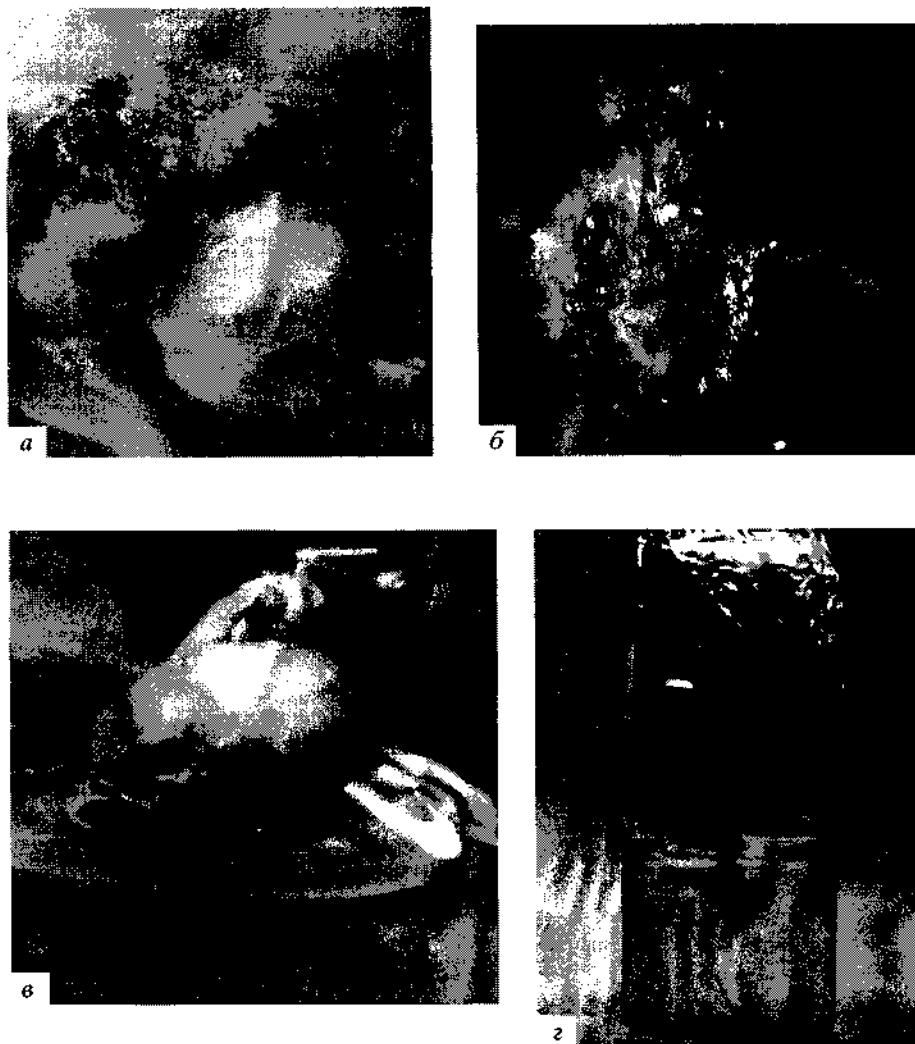


Рис. 1. Культивирование мегагаметофитов сосны кедровой сибирской на разных стадиях: *а* - центральной клетки архегония, среда MS2, образование каллуса; *б* - внедрения полового зародыша в зародышевый канал, среда MS2, образование эмбриогенной ткани; *в* - пятиклеточного образования зародыша, среды MS5 и MS6, образование проростков; *г* - ранней дифференциации зародыша, среды MS5 и MS6, образование проростков. Масштаб: *а, б, в* - ув. хб; *г* - ув. х2.

дали деление ядра яйцеклетки и образование проэмбрио. У большей части эксплантов при данном режиме культивирования в мегагаметофите, изолированном от нуцеллуса, не удалось стимулировать деление яйцеклетки и образование зародышей, образовывался только каллус (рис. 1, *а*). Также не удалось индуцировать развитие мегагаметофитов с однолетним циклом развития у гетерозисных особей кедр сибирского на этой стадии развития. Мегагаметофиты увеличивали свои размеры в два-три раза и сохраняли жизнеспособность в культуре *in vitro* в течение 2-3 мес, но никаких визуальных изменений не наблюдали. Вероятно, яйцеклетка в мегагаметофите кедр сибирского находится в глубоком покое и не обладает способностью к самостоятельному деле-

нию; для выведения ее из покоя необходим триггер в виде пыльцевых трубок, несущих гаметы.

При культивировании изолированных мегагаметофитов на стадии зиготы и образования проэмбрио на средах MS 1-MS6 с различным сочетанием гормонов эмбриональные процессы в культуре *in vitro* продолжались. При этом мегагаметофиты, взятые на стадии яйцеклетки и проэмбрио, выдерживали на средах MS1, MS2 и затем пересаживали на среды MS3-MS6. При данном режиме культивирования мегагаметофиты, так же как в условиях *in vivo*, проходят последовательно все стадии эмбриогенеза, однако образования проростков из таких зародышей не происходило.

Наиболее перспективными для культивирования оказались мегагаметофиты через 10 сут после оплодотворения. В этот период происходит



Рис. 2. Варианты культивирования зародышей сосны кедровой сибирской: *a* - формирование проростка из изолированных зародышей через 7 сут после посадки на среду MS7; *б, в* - развитие проростков на среде MS7 (*в*) и MS11 (*б*) через 2 мес культивирования; *г* - образование боковых корней на среде MS7 через 3 мес культивирования; *д* - культивирование зародыша вместе с мегагаметофитами на среде MS11 через 1 мес после посадки. Масштаб: ув.  $\times 4$ .

внедрение полового зародыша в зародышевый канал и его кливаж. При совместном воздействии цитокинина и ауксина (среда MS2) удалось получить поликливаж полового зародыша и образование эмбрионной ткани, способной в дальнейшем дать соматические эмбриониды (рис. 1, б).

Зиготические зародыши на стадии расщепленного 5-клеточного образования (2 нед после оплодотворения) в клетках мегагаметофита способны проходить полный эмбриогенез в культуре *in vitro* на средах MS5, MS6 и через 2 мес формировать проростки. Однако у таких проростков корневая система не развивается (рис. 1, в).

Культивирование мегагаметофитов, содержащих незрелые зародыши (точковые зародыши) на стадии ранней дифференциации (образование семядолей, 4 нед после оплодотворения), на средах MS5 и MS6 показало, что эмбриогенез не останавливается. У таких мегагаметофитов при непрерывном культивировании *in vitro* активизируется рост и развитие зиготических зародышей. Через 2 мес (I декада сентября) при культивировании *in vitro* на агаризованной среде MS5 (рис. 1, г) и через 3 мес (I декада ноября) на среде MS6 зародыши прорастали, у них четко выделялись семядоли (6-8 мм), гипокотиль (5-7 мм) и зародышевый корешок (4-6 мм). Образовавшиеся проростки достигали длины 16-22 мм.

**Культивирование изолированных зиготических зародышей.** Культивирование изолированных недоразвитых зародышей (занимающих менее половины длины зародышевого канала) показало, что при введении их в культуру *in vitro* на среды MS7, MS11 через 1 сут наступала стадия быстрого насыщения клеток питательными ве-

ществами, на 2-е сут происходило увеличение размера в 1,5 раза и раскрытие семядолей, на 3-й - наблюдалось разрастание семядолей и приобретение ими зеленой окраски (80% эксплантов). На 7-е сут культивирования у таких зародышей появляется зародышевый корешок, происходит позеленение гипокотилия, семядоли активно разрастаются - образуются проростки (рис. 2, а). Таким образом, вместо 4-5 мес стратификации семян созревание и прорастание зиготических зародышей происходит за 7 сут. При дальнейшем культивировании (через 2 мес) на среде MS без гормонов происходит рост эпикотилия, однако корешок остается в зачаточном состоянии (рис. 2, б).

Активный рост зародышевых корешков наблюдался на среде MS7. Через 2 мес культивирования у таких проростков длина корешков составляла от 10 до 13, а эпикотилия - от 3 до 5 мм (рис. 2, в). Через 3 мес культивирования на той же среде у эксплантов кедрового сибирского наблюдали образование боковых корешков (0,5-1 мм) (рис. 2, г), а через 4 мес длина корешков составляла 17-20 мм, боковых корешков - 0,3-2 мм, эпикотилия - 5-8 мм (рис. 3).

Культивирование недоразвитых зародышей кедрового сибирского (более половины длины зародышевого канала) вместе с мегагаметофитами и без них на среде MS11 привело к развитию полноценных сеянцев через 1 мес после посадки (рис. 2, д). Однако изолированные зародыши на среде без гормонов (MS11) проростков не образовывали, у таких эксплантов шло интенсивное образование каллуса.

Таким образом, недоразвитость зародышей у зрелых семян кедрового сибирского является вынуж-

денным феноменом, при непрерывном культивировании *in vitro* эмбриогенез семян у данного вида завершается прорастанием.

При культивировании зиготических зародышей кедр сибирского на средах MS8, MS9 наблюдали развитие адвентивных почек (4–10 шт/зародыш) из клеток в основании и кончиков семядолей через 1,5 мес после посадки (рис. 4, а). Спустя 4 мес культивирования размеры адвентивных почек увеличивались и составляли от 2 до 4 мм (рис. 4, б, в), при перенесении последних на среду MS 10 наблюдали увеличение размеров в 1,5–2 раза, появление брахибластов и корней. В результате экспериментов получено 5–6 адвентивных почек на семядолю. При дальнейшем культивировании из таких почек образуются жизнеспособные растения (рис. 4, г).

При пересадке адвентивных почек кедр сибирского на среду MS9 в ряде случаев (30%) происходило активное образование каллуса, через 2–3 нед он увеличивался в размерах в 10 раз, и в однородной структуре каллусных клеток возникали меристематические очаги – 7–10 меристем на каллус (рис. 4, д). В таких меристемах идет активный морфогенез: закладываются примордии хвои и побегов (рис. 4, е).

Анатомическое исследование адвентивных почек кедр сибирского показало, что все почки, которые были продуцированы *de novo*, имели идентичную структуру, типичную для апикальных меристем хвойных. Внутри почки находится конусовидная сердцевина из паренхимных клеток, по краям которой расположены несколько слоев прокамбия, плавно переходящего в апикальную меристему.

Таким образом, проведенные исследования показали, что эмбриональные процессы в мегагаметофитах и изолированных зародышах сосны кедровой сибирской завершаются в культуре *in vitro*. Внесение и регуляция содержания цитокининов и ауксинов на разных стадиях развития эмбриональных структур позволили манипулировать событиями эмбриогенеза и способствовать образованию проростков (без стратификации семян), а также формированию адвентивных почек и побегов у сосны кедровой сибирской.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Важным этапом в индукции раннего онтогенеза и образования растений в культуре *in vitro* является определение факторов, вызывающих активацию мегагаметофитов, искусственного оплодотворения яйцеклетки и развития зародышей у разных форм кедр сибирского так же, как у других видов хвойных.

К сожалению, первые опыты по культивированию мегагаметофитов у кедр сибирского на

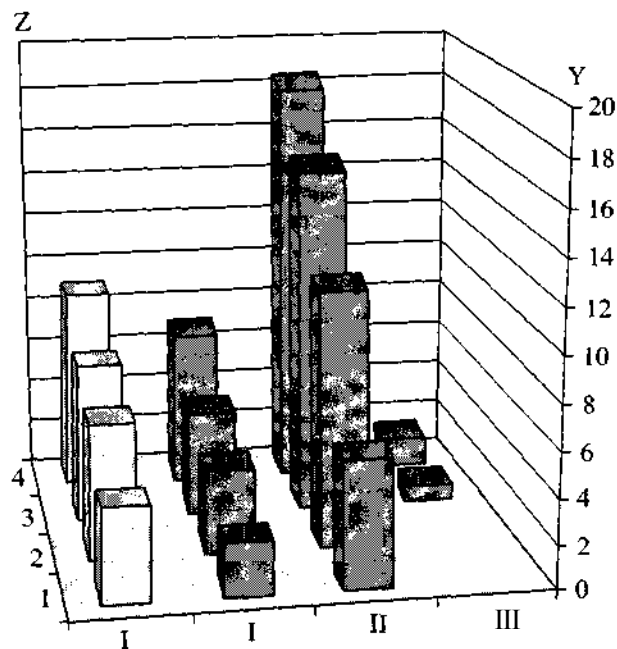
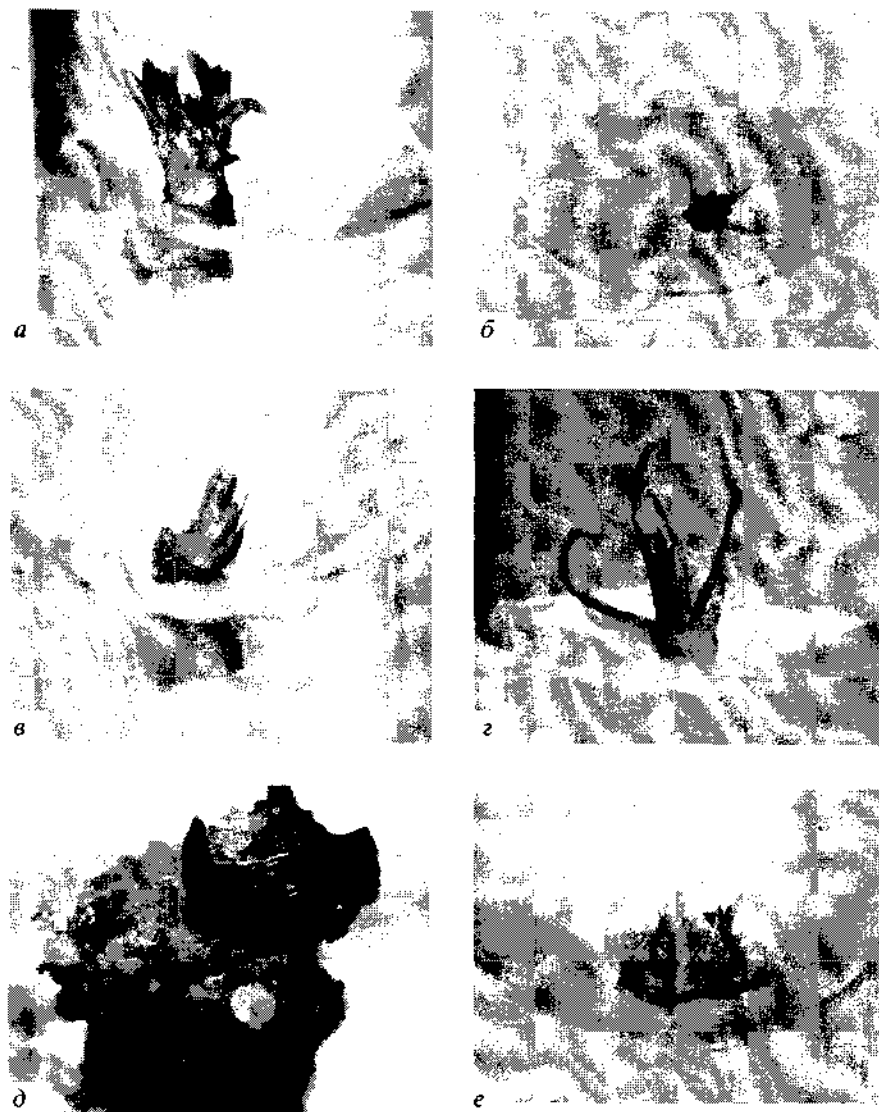


Рис. 3. Рост и развитие эпикотили (I), зародышевого (II) и бокового (III) корешков сосны кедровой сибирской в культуре *in vitro*. По оси Y – длина, мм; по оси Z – время культивирования, мес. Среды: (□) – MS11, (■) – MS7.

стадиях образования центральной клетки архегония и яйцеклетки (с нукелусом и без него) оказались неудачными. В изолированных мегагаметофитах на данной стадии происходило только развитие каллусной массы из клеток самого мегагаметофита. Как у типичных, с двухлетним циклом развития, так и у гетерозисных семяпочек с аномальным однолетним циклом эмбриональное развитие женского гаметофита в культуре *in vitro* останавливалось. Яйцеклетки подвергались деградации через 10–14 сут после созревания так же, как неоплодотворенные яйцеклетки *in vivo*.

Подобные отрицательные результаты были получены при проведении опытов по искусственному оплодотворению в культуре *in vitro* у дуглаши *Pseudotsuga menziesii* и двух видов сосны (*Pinus aristata* и *P. monticola*) (Fernando et al., 1998; Fernando, Owens, 2001). При этом опыты были направлены на стимуляцию роста пыльцевых трубок в культуре *in vitro* и последующее соединение мужской гаметы с изолированной яйцеклеткой. Однако сингамия гамет в данных условиях осуществить не удалось из-за потери жизнеспособности яйцеклетки. Показано лишь, что проникновение пыльцевых трубок в яйцеклетку происходит только через шейковые клетки так же, как в семяпочках *in vivo*.

Тем не менее канадские ученые возлагают большие надежды на опыты по проведению искусственного оплодотворения в культуре *in vitro* для преодоления разного рода нескрещиваемос-



**Рис. 4.** Образование и культивирование адвентивных почек у сосны кедровой сибирской: *a* - развитие адвентивных почек у основания семядолей через 1,5 мес культивирования на средах MS8, MS9; *б, в* — субкультивирование адвентивных почек на средах MS9, MS 10; *г* - формирование побега из адвентивной почки на среде MS 10; *д* - развитие органогенного каллуса на среде MS9; *е* - образование меристем в каллусной массе через 2-3 нед культивирования на среде MS9. Масштаб: *a, в, г, д*, - ув. х4; *б, е*-ув. х2.

ти, наблюдаемой при гибридизации хвойных видов. Основанием для такого оптимизма могут служить эксперименты в культуре *in vitro* с *Picea abies* (Havel, Dursan, 1996), во время которых проводились манипуляции с ядрами яйцеклетки и брюшной канальцевой клетки, которые внедрялись в суспензорные клетки зародышей. В результате таких экспериментов был получен диплоидный партеногенез (Havel, Dursan, 1996).

Методы активации мегагаметофитов и партеногенетического развития зародышей в настоящее время разработаны только для покрытосеменных (Кашин и др., 2000). При этом было показано, что активация мегагамет у неоплодотворенных

завязей *in vitro* представителей семейства Asteraceae происходит при смещении баланса фитогормонов в сторону цитокининов. Ранний эмбриогенез осуществляется при смещении баланса в сторону ауксинов. Растянutosть сроков формирования зародыша и начальных структур у кедра сибирского, так же как у других хвойных, усложняет манипуляции с гормонами в период оплодотворения.

Однако культивирование мегагаметофитов на более поздних сроках развития (начиная со стадии деления зиготы и последующего проэмбриогенеза) у кедра сибирского на средах MS5 и MS6 показало, что эмбриогенез идет по обычной схеме, характерной для данного вида: формируется

16-клеточное проэмбрио, идут начальные этапы эмбриогенеза. На первых этапах онтогенеза (первые деления проэмбрио) внесение цитокининов в среду ускоряло процессы формирования проэмбрио. Через 3-5 сут после дробления зиготы клетки проэмбрио уже вторгались в зародышевый канал, в то время как в природе этот процесс идет через 7-10 сут после оплодотворения. На дальнейших этапах культивирования (спустя 2-3 нед после оплодотворения) на среде, содержащей ауксины (MS3, MS4), где цитокинины или вообще исключали из среды, или вносили в очень маленьких концентрациях, зиготические зародыши полностью проходили эмбриогенез.

Опыты по культивированию мегагаметофитов кедр сибирского на стадии образования зародышей оказались более успешными. При воздействии высоких концентраций ауксинов (2 мг/л 2,4 Д и 1 мг/л ИУК) и низких концентраций цитокининов (среды MS5 и MS6) удалось создать условия для получения поликливажа при внедрении зародышей в зародышевый канал.

Культивирование мегагаметофитов кедр сибирского на среде MS5, содержащей преимущественно ауксины, на стадии раннего эмбриогенеза (от расщепленного до глобулярного зародыша) полностью способствовало прохождению стадии эмбриогенеза и последующему образованию проростков (через 2 мес культивирования). Однако такие проростки в культуре *in vitro* корней не развивали. Проростки с зародышевыми корешками были получены из незрелых зародышей, на стадии ранней дифференциации семядолей, помещенных на среду с преобладанием ауксинов.

Введение в культуру *in vitro* недоразвитых зародышей, занимающих менее половины длины зародышевого канала, приводило к развитию проростков уже через 7 сут после посадки, однако на безгормональной среде зародышевые корешки не образовывались. Культивирование таких же зародышей вместе с мегагаметофитами замедляло процесс эмбриогенеза до 2 мес. Образование корней у семян наблюдалось только на среде, содержащей гормоны (MS7).

Таким образом, эмбриогенез в мегагаметофитах и изолированных зародышах кедр сибирского в культуре *in vitro* идет быстрым темпом. Если *in vivo* внутрисемейной рост зародышей в мегагаметофитах идет в течение 6-7.5 мес (2.5 мес - в мегагаметофите до отпада шишек и 3.5-5 мес - в процессе холодной стратификации), то при культивировании *in vitro* время, за которое зародыши развиваются в активно фотосинтезирующие проростки, сокращается до 2.5 мес, а у изолированных зародышей это проходит всего за 7 сут. Более медленный ход эмбриогенеза у зародышей, культивированных вместе с мегагаметофитами, свидетельствует о том, что ткани мегагаметофи-

тов оказывали ингибирующее влияние на рост зародыша. В целом недоразвитость зародышей кедр сибирского, вероятно, является вынужденным феноменом, обусловленным завершением вегетационного периода в Сибири (в конце августа). При создании благоприятных условий в культуре *in vitro* зародыши кедр сибирского полностью завершают эмбриогенез. Проведение подобных экспериментов будет особенно перспективным при выращивании недоразвитых зародышей, полученных при гибридизации у сосен.

Особое внимание заслуживают опыты по стимуляции развития адвентивных почек у эксплантов зародышей кедр сибирского. Такие почки образовывались у проростков в культуре *in vitro* на семядолях. При пересадке адвентивных почек на среду MS10 с большой концентрацией фитогормонов шел активный морфогенез и образовывались побеги. При помещении адвентивных почек на среду MS9 происходило образование каллуса, в котором возникали новые меристематические очаги, закладывались примордии хвои и побегов, т.е. шел активный морфогенез, который приводил к образованию побегов. Аналогичную каллусную ткань с меристематическими очагами адвентивных почек получали из зрелых зиготических зародышей у *Pinus taeda* на среде, содержащей НУК, 6-БАП, гидролизат казеина и глютамин. В дальнейшем на безгормональной среде происходило вытягивание адвентивных побегов и их укоренение на среде с индолмасляной кислотой (ИМК) и 6-БАП (Tang et al., 1998).

Ранее сообщалось об образовании адвентивных почек у некоторых видов хвойных: у *Picea sitchensis* (Drake, John, 1997), у гибридов *Larix* (Jourdain et al., 1997), *Pinus nigra* (Salaj, Salajova, 1998) и *P. pinaster* (Calixto, Pais, 1997). При этом на среде с 6-БАП индуцировали до 14-26 почек на эксплант. При последующем перенесении эксплантов на безгормональную среду или среду, содержащую ИМК, абцизовую кислоту и активированный уголь, шел усиленный морфогенез побегов и образование корней.

Проведенные манипуляции с адвентивными почками у кедр сибирского показали, что их заложение и морфогенез идут так же, как у описанных выше видов хвойных: происходит образование каллуса, последующая его меристематизация и формирование побегов. Эти эксперименты представляют большой интерес при исследовании раннего онтогенеза у хвойных видов, так как показана способность кедр сибирского, одного из представителей сибирских видов хвойных, развиваться в культуре *in vitro*, впервые проведены опыты по выращиванию в культуре *in vitro* проростков из мегагаметофитов и зиготических зародышей на начальных этапах их формирования, а также описаны видовая специфика заложения и



особенность гистогенеза адвентивных почек у кедров сибирского.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

Ирошников А.И. Изменчивость некоторых морфологических признаков и эколого-физиологических свойств кедров сибирского // Изменчивость древесных растений Сибири. Красноярск: ИЛИД СО АН СССР, 1974. С. 77-103.

Кашин А.С., Блюднева Е.А., Седлецкая О.В., Григорьева В.В. Особенности развития мегагаметофитных и половых форм *Asteraceae* в культуре неоплодотворенных завязей *in vitro* // Физиология растений. 2000. Т. 47. № 4. С. 548-554.

Кузнецова Г.В. Особенности роста и развития кедровых сосен на лесосеменных объектах Средней Сибири: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Красноярск: Ин-т леса СО РАН, 2001. 25 с.

Минина Е.Г., Ларионова Н.А. Морфогенез и проявление пола у хвойных. М.: Наука, 1979. 215 с.

Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980. 340 с.

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

Третьякова И.Н., Невзоров В.Н., Голубев И.В., Филиппова И.П. Биологическая характеристика семян кедров сибирского разной крупности // Материалы Международ. науч.-практ. конф. "Генетика и селекция - на службе лесу". Воронеж: Родная речь, 1997. С. 349-353.

Aderkas P., Bonga J.M. Morphological definition of phenocritical period for initiation of haploid embryogenic tissue from explants of *Larix decidua* I I Somatic cell genetics of woody plants / Ed. M.R. Ahuja. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1988. P. 29-38.

Aderkas P., Bonga J.M., Klimaszewska K., Owens J. Comparison of larch embryogeny *in vivo* and *in vitro* // Woody Plants Biotechnology. Placerville, California: Plenum Press, 1991. P. 139-155. (Ser. A: Life Sciences. V. 210.)

Arnold S., Hakman I. Effect of sucrose on initiation of embryogenic callus cultures from mature zygotic embryos of *Picea abies* (L.) karst. (Norway spruce) // J. Plant Physiol. 1985. V. 122. № 3. P. 261-265.

Arnold S., Hakman I. Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA) // Ibid. 1988. V. 132. № 2. P. 164-169.

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. № 6. P. 810-817.

Behrendt U., Zoglauer K. Boron controls suspensor development in embryogenic cultures of *Larix decidua* // Physiol. Plant. 1996. V. 97. № 3. P. 321-326.

Calixto F., Pais S.M. Adventitious shoot formation and plant regeneration from *Pinus pinaster* Sol. ex Aiton // *In vitro* Cell. Devel. Biol. 1997. V. 33. № 2. P. 119-124.

Cell and Tissue culture in Forestry / Ed. J.M. Bonga, D.J. Durzan. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publ., 1987. 422 p.

Drake P.M.W., John A. Cytokinin pulse-mediated shoot organogenesis from cotyledons of *Sitka spruce* [*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.] and high frequency *in vitro* rooting of shoots // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1997. V. 50. № 2. P. 147-151.

Egertsdotter U., Arnold S. Development of somatic embryos in *Norway spruce* // J. Experim. Bot. 1998. V. 49. № 319. P. 155-162.

Fernando D.D., Owens J.N., Aderkas P. *In vitro* fertilization from co-cultured pollen tubes and female gametophytes of *Douglas fir* (*Pseudotsuga menziesii*) // Theor. Applied Genet. 1998. V. 10. № 4. P. 1057-1063.

Fernando D.D., Owens J.N. Development of resistance to White pine blister rust through *in vitro* fertilization // Internat. conference "Breeding and genetic resources of five-needle pines". Oregon, USA: JUFRO; Working Party, 2001. P. 112.

Finer J.J., Kriebel H.B., Becwar M.R. Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.) // Plant Cell Rep. 1989. V. 8. № 2. P. 203-206.

Guevin T.G., Kirby E.G. Induction of embryogenesis in cultured mature zygotic embryos of *Abies fraseri* (Pursh) Poir // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1997. V. 49. № 3. P. 219-222.

Gupta R.K., Durzan D.J. Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos // Biotech. 1986. V. 4. № 5. P. 643-645.

Hakman I., Fowke L.C., Arnold S., Eriksson T. The development of somatic embryos in callus cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* // Plant Sci. 1985. V. 38. № 1. P. 53-59.

Hakman I., Fowke L.C. Somatic embryogenesis in *Picea glauca* (white spruce) and *P. mariana* (black spruce) // Can. J. Bot. 1987. V. 65. № 4. P. 656-659.

Hakman I., Arnold S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (white spruce) // Physiol. Plant. 1988. V. 72. № 3. P. 579-587.

Havel L., Durzan D.J. Apoptosis during diploid parthenogenesis and early somatic embryogenesis of *Norway spruce* // Internat. J. Plant Sci. 1996. V. 157. № 1. P. 8-16.

Hong L., Boulay M., Gupta P.K., Durzan D.J. Variations in somatic polyembryogenesis: induction of adventitious embryonal-suspensor masses on developing *Douglas fir* embryos // Woody plants biotechnology. Placerville, California: Plenum Press, 1991. P. 105-121. (Ser. A: Life Sciences. V. 210.)

Jourdain J., Lelu M. A., Label P. Hormonal changes during growth of somatic embryogenic masses in hybrid larch // Plant Physiol. Biochem. 1997. V. 35. № 9. P. 741-749.

Klimaszewska K., Smith D.R. Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gelatin gum // Physiol. Plant. 1997. V. 100. № 4. P. 949-957.

Li X.Y., Huang F.H., Gbur E.E. Effect of basal medium, growth regulators and Phytigel concentration on initiation of embryogenic cultures from immature zygotic embryos of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) // Plant Cell Reports. 1997. V. 17. № 4. P. 298-301.

Liao Y. K., Amerson H.V. Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) somatic embryogenesis. I. Initiation of embryogenic cultures from immature zygotic embryos // New For. 1995. V. 10. № 2. P. 145-163.

Lu C.Y., Thorpe T.A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in cultured immature embryos of *Picea glauca* // Plant Physiol. 1987. V. 128. № 4. P. 297-302.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. № 4. P. 473-497.

Nagmani R., Bonga J.M. Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua* // Can. J. For. Res. 1985. V. 15. № 5. P. 1088-1091.

Nagmani R., Johnson M.A., Dinus J. Effect of explant and media on initiation, maintenance, and maturation of somatic embryos in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco {Douglas fir} // Woody plant biotechnology. Placerville, California: Plenum Press, 1991. P. 171-178. (Ser. A: Life Sciences. V. 210.)

Ogita S., Kubo T., Fushitani M. Anatomical characteristics in early embryogenesis from immature embryos of *Larix leptolepis* // For. Res. Environment. Tokyo. 1997. № 35. P. 45-51.

Roberts D.R., Webster F.B., Flinn B.S. et al. Application of somatic embryogenesis to clonal propagation of interior Spruce // Woody plant biotechnology. 1991. P. 157-169. (Ser. A: Life Sciences. V. 210.)

Salaj J., Salajova T. Histological observations of adventitious bud development in *Pinus nigra* // Biologia. 1998. V. 53. № 1. P. 107-110.

Salopen B., Milakovic T.T., Mihaljevic S., Jelaska S. Storage product accumulation during the maturation of *Picea omorika* (Pane.) Purk. Somatic embryos // Periodic. Biol. 1997. V. 99. № 1. P. 117-124.

Tang W., Ouyano F., Guo Z.C. Plant regeneration through organogenesis from callus induced from mature zygotic embryos of loblolly pine // Plant Cell Reports. 1998. V. 17. № 6/7. P. 557-560.

Wagner M., Vondrakova Z., Strnadova Z., Eder J. Mones during early stages of somatic embryogenesis of *Picea abies* // Adv. Horticult. Sci. 1998. V. 12. № 1. P. 11-18.

Woody plant biotechnology / Ed. M.R. Ahuja. Placerville, California: Plenum Press, 1991. 373 p. (Ser. A: Life Sciences. V. 210.)

## Specific Features of Development of Megagametophytes and Embryos of the Siberian Stone Pine *in vitro*

I. N. Tret'yakova and N. V. Novoselova

Sukachev Institute of Forestry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia

E-mail: [institute@forest.akadem.ru](mailto:institute@forest.akadem.ru)

Abstract—Seedlings were grown *in vitro* from fertilized eggs and immature embryos of the Siberian stone pine. Cultivation of megagametophytes on a hormone-containing Murashige-Skoog medium from the egg formation until the globular embryo stage made it possible to manipulate fertilization and embryogenesis. Immature embryos are the most promising for *in vitro* cultivation. Their maturation and germination proceed within seven days of cultivation. When zygotic embryos were cultivated, adventitious buds were formed from cells at the cotyledon base and tips. When adventitious buds were subcultivated on a medium containing benzylaminopurine and naphthylacetic acid, organogenic callus and shoots were formed. Thus, cultivation of megagametophytes and embryos of the Siberian stone pine led to the completion of embryogenesis and formation of viable of seedlings.

Key words: Siberian stone pine (*Pinus sibirica* Du Tour), megagametophytes, *in vitro* culture, embryos.