

УДК 581.3:576.5:582.475.4

ОСОБЕННОСТИ ИНИЦИАЦИИ ЭМБРИОИДОВ ИЗ МЕГАГАМЕТОФИТОВ *PINUS SIBIRICA* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

© 2014 г. И. Н. Третьякова, Е. В. Ворошилова*

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН
660036 Красноярск, Академгородок 50, стр. 28

*Сибирский федеральный университет
660041, Красноярск, пр. Свободный 79

E-mail: culture@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 03.06.13 г.
Окончательный вариант получен 11.09.13 г.

Мегагаметофиты кедр сибирского вводили в культуру *in vitro* на среду 1/2 LV, дополненную регуляторами роста 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) бензиламинопурином (6-БАП) с целью образования эмбриоидов. Компетентность соматических клеток эксплантов к эмбриогенезу проявлялась в организованном росте и полярности. В культуре мегагаметофитов происходило образование длинных вакуолизированных клеток — формировался ценоцит. Далее наблюдалась миграция ядер к одному из полюсов клетки, их деление и формирование эмбриоидов. Культура мегагаметофитов кедр сибирского отличалась от культуры зиготических зародышей отсутствием асимметричного деления в вакуолизированной клетке.

Ключевые слова: *Pinus sibirica*, мегагаметофиты, соматический эмбриогенез, эмбриоиды.

DOI: 10.7868/S0475145014020074

ВВЕДЕНИЕ

Соматический эмбриогенез является наиболее перспективным направлением в лесной биотехнологии и широко применяется за рубежом при реализации программы MVF (Park, 2002, 2010). В качестве эксплантов, как правило, используют зрелые и незрелые зиготические зародыши (Nagmani, Bonga, 1985), реже мегагаметофиты (Klimaszewska, Cug, 2002) и сегменты вегетативных побегов (Malabadi, Van Staden, 2005).

Гаплоидный каллус из мегагаметофитов хвойных впервые был получен в 1985 г. у *Larix decidua* (Nagmani, Bonga, 1985; von Aderkas, Bonga, 1988), а затем у *Picea abies* (Simola, Santanen, 1990). В дальнейшем эксперименты по исследованию гаплоидных культур и эмбриоидов не проводились, т.к. внимание ученых было сосредоточено на изучении соматического эмбриогенеза, полученного из диплоидных тканей и получении сеянцев для плантационного лесовыращивания. В 2009 г. нами впервые были опубликованы результаты биотехнологической работы по индукции соматического эмбриогенеза из незрелых зародышей вместе с мегагаметофитами у *Pinus sibirica*. При этом эмбриогенный каллус развивался в единичных случаях (Третьякова, Ижболдина, 2009).

Сосна сибирская, кедр сибирский (*Pinus sibirica* Du Tour) — один из основных лесообразователей гор Южной Сибири, подвергается хищническому истреблению из-за антропогенной нагрузки. Между тем, репродуктивные процессы данного вида имеют ряд особенностей, отличающих его от других представителей хвойных, произрастающих на территории Сибири. Это высокая полиэмбриональность (до 16 зародышей в одном мегагаметофите) и необходимость длительной стратификации семян (4–7 мес.) (Третьякова, 1990), а также встречаемость в природных популяциях уникальных гетерозисных генотипов деревьев с однолетним циклом развития женской шишки, у которых наблюдается акселерация генеративного цикла (Ирошников, 1974; Минина, Ларионова, 1979). Акселерация генеративного развития у рассматриваемых форм кедр сибирского проявлялась в сверхраннем развитии гаметофитов. Стадия гаметогенеза, происходила за 1.5–2 мес. (вместо 1 года) и завершалась развитием архегониев. Однако оплодотворения яйцеклеток не происходило из-за медленного роста пыльцевых трубок и зародыши не образовывались (Третьякова, 1990). Таким образом, размножение уникальных гетерозисных форм *Pinus sibirica* естественным половым путем невозможно, что обусловило необходимость раз-

работки биотехнологий воспроизведения данных генотипов.

Целью настоящей работы явилось разработка биотехнологии получения гаплоидного эмбрионного каллуса в культуре мегагаметофитов и изучение особенностей эмбриоидогенеза у *Pinus sibirica*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на прививочной клоновой плантации сосны сибирской, кедра сибирского (*Pinus sibirica* Du Tour), созданной Ю.А. Череповским с сотрудниками в начале 1990-х г., расположенной на территории Даурского лесничества вблизи поселка Ермаковское (53°16' с.ш. и 92°23' в.д., высота над уровнем моря 300–320 м). Плантация занимает площадь 10 га. Каждый клон представлен прививками плюсовых деревьев кедра сибирского из естественного древостоя Западного Саяна, и состоит из 12–15 деревьев (рамет), возраст которых составил 18–20 лет.

Клоны кедра сибирского отличаются неравномерным урожаем женских шишек в погодичном цикле. Обильные урожаи (2009, 2011) сменяются неурожайными годами (2010, 2012) (Третьякова и др., 2012, в печати). В 2012 г. на клоновой плантации урожай женских шишек практически отсутствовал. Только у пяти клонов (№№ 277/22, 281/26, 283/26, 145/4 и 153/13) были обнаружены немногочисленные женские шишки (от 1 (клон № 277/22) до 7 шт. (клон № 145/4)).

Для исследований по культуре ткани в первой декаде июля с каждого клона кедра сибирского проводили сбор женских шишек, полученных в результате свободного опыления и самоопыления клонов. В период взятия образцов зародыши находились на кливажной и глобулярной стадиях развития.

Для введения в культуру *in vitro* мегагаметофитов кедра сибирского, семена предварительно обрабатывали водным раствором перманганата калия, затем отмывали в проточной воде и очищали от покровов. Извлеченные мегагаметофиты стерилизовали гипохлоритом натрия в течение 10 мин, трижды промывали в стерильной дистиллированной воде и помещали на 5 мин в 10% раствор перекиси водорода. Затем в стерильных условиях мегагаметофиты рассекали на две части или отделяли сегменты, удаляли зародыш и помещали на питательную среду срезом вверх или вниз, по 6–7 эксплантов на колбу.

Для индукции соматического эмбриогенеза использовали базовую питательную среду 1/2LV (Litvae et al., 1985), с добавлением сахарозы (30 г/л), глутамина (1 г/л), гидролизата казеина (0.5 г/л), мезоинозита (1 г/л) и аскорбиновой кис-

лоты (0.3 г/л). В качестве регуляторов роста использовали 2,4-Д и 6-БАП в концентрации 2 и 1 мг/л соответственно. рН среды доводили до 5.8 перед автоклавированием. Помещенные на среду экспланты культивировали в темноте при $25 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 60 сут. Далее образовавшийся каллус переносили на среду для пролиферации, с пониженным содержанием сахарозы (20 мг/л) и 6-БАП (0.5 мг/л). Пересадку на свежую питательную среду проводили каждые 14 сут. Для сравнения интенсивности роста культур, образующийся каллус взвешивали при каждой пересадке и брали образцы для цитологического анализа.

Для проведения цитологического анализа готовили давленные препараты по стандартной методике (Паушева, 1990). Каллус помещали на предметное стекло, взвешивали, окрашивали гематоксилином с добавлением капли железных квасцов в течение 5–10 мин, добавляли каплю глицерина, накрывали предметным стеклом, после чего слегка придавливали.

Препараты просматривали на микроскопе “МИКРОМЕД-6” ЛОМО, при увеличении 10×4 , 10×10 и 10×40 . Замеры клеток и эмбриональных структур проводили при помощи системы Score Photo, с последующим переводом полученных единиц в микрометры. Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам (Рокицкий, 1973) при помощи программы Microsoft Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При введении эксплантов кедра сибирского в культуру *in vitro*, на 7–10 сут культивирования происходило формирование каллуса в коррозионной полости вдоль продольной оси мегагаметофита, расположенного срезом вверх. Каллусная масса имела белый цвет, плотную или рыхлую структуру. У мегагаметофитов, расположенных срезом вниз, образования каллуса не происходило.

Через 1 мес. культивирования у значительного большинства эксплантов каллус покрывал всю поверхность среза (рис. 1). К концу стадии инициации (60 сут) вес каллуса составлял от 0.052 ± 0.001 г (клон № 283/26) до 0.088 ± 0.001 г (клон № 281/26) (рис. 2). Первичный отклик эксплантов составил от 20 (клон № 281/26) до 85.7% (клон № 145/4) (рис. 3).

При перенесении каллусов на среду для пролиферации с пониженным содержанием сахарозы и 6-БАП, эмбриогенный каллус образовывался только у двух клонов — № 283/26 и № 153/13. Число эксплантов, вышедших на стадию пролиферации, у данных клонов составило 68.7 и 66.7% соответственно. На 120 сут культивирования вес пролиферирующих каллусов составил $0.077 \pm$

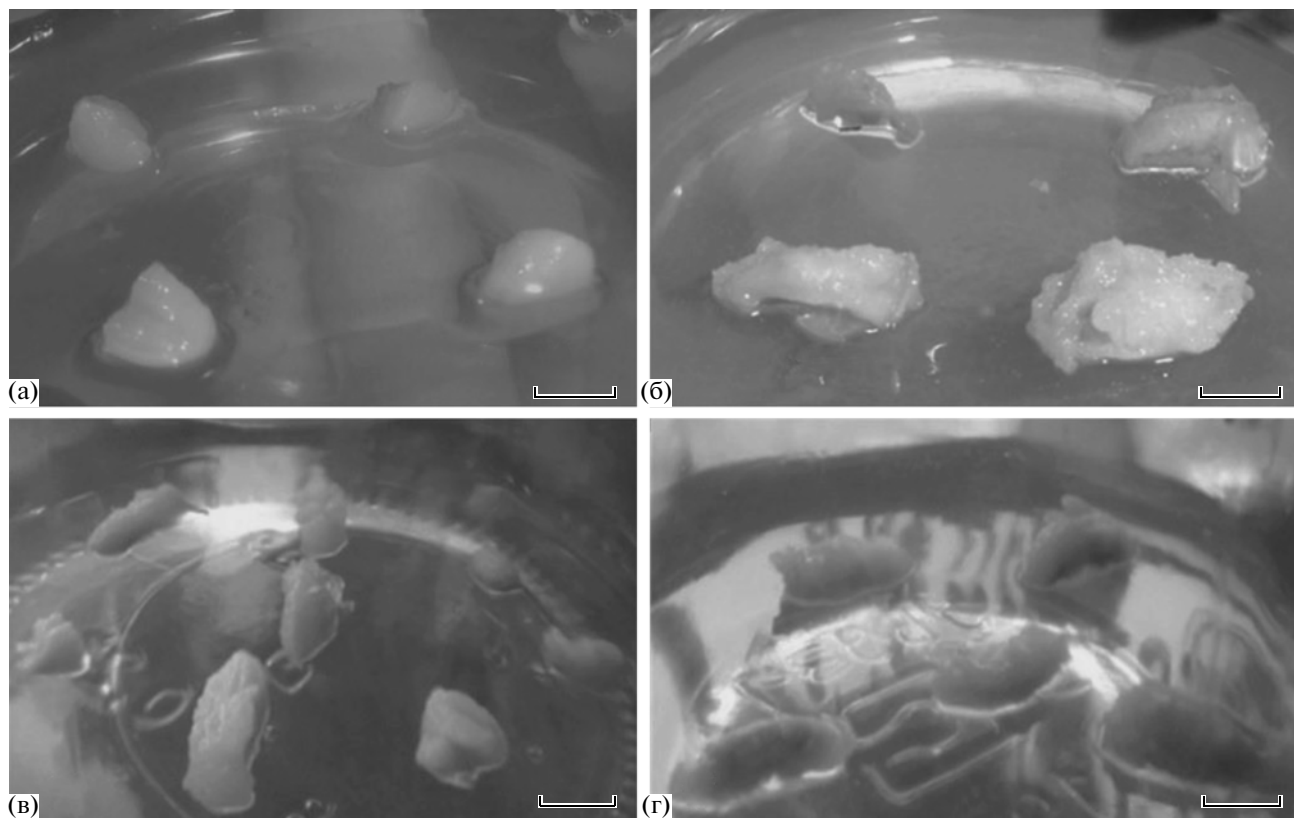


Рис. 1. Культуры мегагаметофитов клонов 277/22 (а) и 281/26 (б), 283/26 (в), 153/13 (г) (бар 1 см).

± 0.001 г (клон № 283/26) и 0.098 ± 0.001 г (клон № 153/13) (рис. 2).

Каллусы, полученные от свободноопыленных и самоопыленных клонов №№ 277/22, 281/26 и 145/4 характеризовались плотной структурой и оказались неэмбриогенными. Через 4 мес. культивирования каллусы клона № 281/26 полностью некротизировали. Рост остальных каллусов продолжался.

Цитологический анализ

На 7–10 сут культивирования мегагаметофитов вдоль продольной оси среза наблюдалось растяжение клеток у четырех клонов, за исключением клона № 277/22, у которого клетки сохраняли изодиаметрическую форму, характерную для клеток мегагаметофита. К концу первого месяца культивирования на среде для инициации образовавшийся каллус состоял из вытянутых вакуолизированных клеток, длина которых в среднем составляла 495 ± 24.2 мкм. Большинство данных клеток не завершали цитокинез, в результате чего в клетке образовывались два ядра (рис. 4а), которые делились, и формировался четырехядерный ценоцит. Эти четыре ядра мигрировали к одному из полюсов длинной клетки (рис. 4б), где проис-

ходило формирование клеточных стенок, и образовывались четыре маленькие клетки с темно-окрашенной цитоплазмой (инициалей эмбриоида). К базальному концу этих клеток примыкали безъядерная длинная клетка, которая затем, вероятно, отмирала (рис. 4в). Инициальные клетки эмбриодов продолжали делиться, образуя агрегаты, а затем глобулы соматических эмбриоидов.

Через 2 мес. культивирования, при перенесении каллусов клонов № 283/26 и № 153/13 на пролиферационную среду клетки нижней части глобулы (к которой прилежала длинная деградировавшая вакуолизированная клетка) начинали удлиняться и формировали суспензор (рис. 4г, 4д), состоящий из 6–7 длинных, линейно расположенных вакуолизированных клеток. Формировался соматический эмбриоид, который включал эмбриональную глобулу и суспензор (рис. 4е). В каллусе шло активное формирование эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) (рис. 4ж). В крайних клетках суспензоров наблюдалось образование нескольких ядер, которые мигрировали к дистальному концу (рис. 4з), образуя четырехядерный ценоцит, затем из четырех клеток формировались агрегаты и, наконец, глобулы новых соматических зародышей (рис. 4и). Таким об-

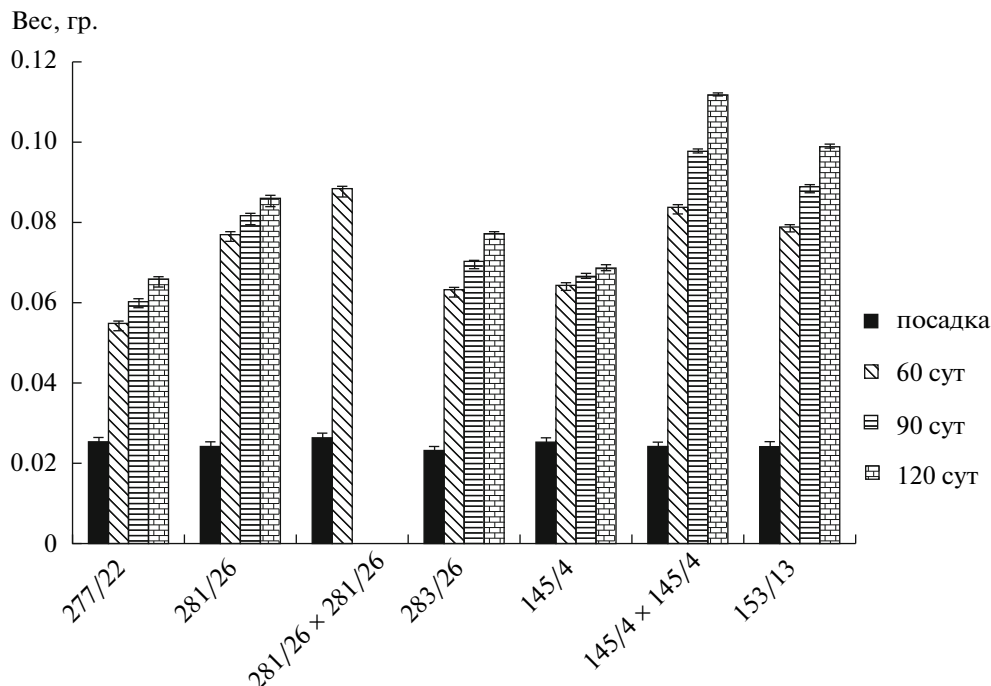


Рис. 2. Вес каллусов в культуре мегагаметофитов кедр сибирского (№№ 277/22, 281/26, 283/26, 145/4, 153/13 — свободноопыленные клоны; №№ 281/26 × 281/26, 145/4 × 145/4 — самоопыленные клоны).

разом, полученный эмбриогенный каллус состоял из активно пролиферирующей эмбрионально-сuspензорной массы, в которой шло образование эмбриоидов.

Следует отметить, что при переносе каллусных культур, полученных из мегагаметофитов, на среду для пролиферации, у клонов № 281/26 и № 145/4 наблюдалась потеря эмбриогенной компетентности — длинные клетки исчезали, и ткань полностью состояла из округлых недифференцированных клеток, которые оставались без изменения на протяжении всего периода культивирования — формировался неэмбриогенный каллус (рис. 5).

Таким образом, нами впервые получены эмбриогенные клеточные культуры, способные к самоподдержанию и продуцированию эмбриоидов, из мегагаметофитов кедр сибирского. Проведенные исследования по культивированию мегагаметофитов позволят нам подойти к проблемам размножения уникальных особей кедр сибирского с однолетним циклом развития.

ОБСУЖДЕНИЕ

У покрытосеменных растений развитие соматических зародышей в культуре *in vitro* происходит как прямым путем через массовое образование эмбриогенных клеток (прямое образование эмбриоидов из клеток экспланта, из перифериче-

ских клеток экспланта, а также через почкование и кливаж), так и непрямым путем через каллус, сuspензионную культуру и культуру протопластов (Williams, Maheswaran, 1986). У голосеменных растений также были описаны случаи развития соматических зародышей прямым путем через кливаж (Gupta, Durzan, 1986) и непрямым путем через дедифференциацию клеток сuspензора (Hakman et al., 1985; Gupta et al., 1986, 1987). Однако, как правило, инициация соматического эмбриогенеза у представителей данного класса растений идет через удлинение соматических клеток и последующего их асимметричного деления с образованием глобулы зародыша и клеток сuspензора (von Arnold et al., 2002; Stasolla, Yeung, 2003). Образуется эмбриогенный каллус, состоящий из эмбрионально-сuspензорной массы.

Модель соматического эмбриогенеза была разработана для *Picea abies* (von Arnold et al., 2002). Согласно этой модели, в раннем эмбриогенезе у ели идет удлинение клеток, происходит образование агрегатов, состоящих из мелких клеток с густой цитоплазмой и вакуолизированных клеток, расположенных на разных полюсах — формируются глобула соматического зародыша и клетки сuspензора. В указанную схему укладываются и полученные ранее нами данные по соматическому эмбриогенезу у видов *Larix sibirica* и *L. sukaczewii* (Третьякова, Барсукова, 2012; Третьякова 2013) и *P. sibirica* (Третьякова и др., 2012), у которых в

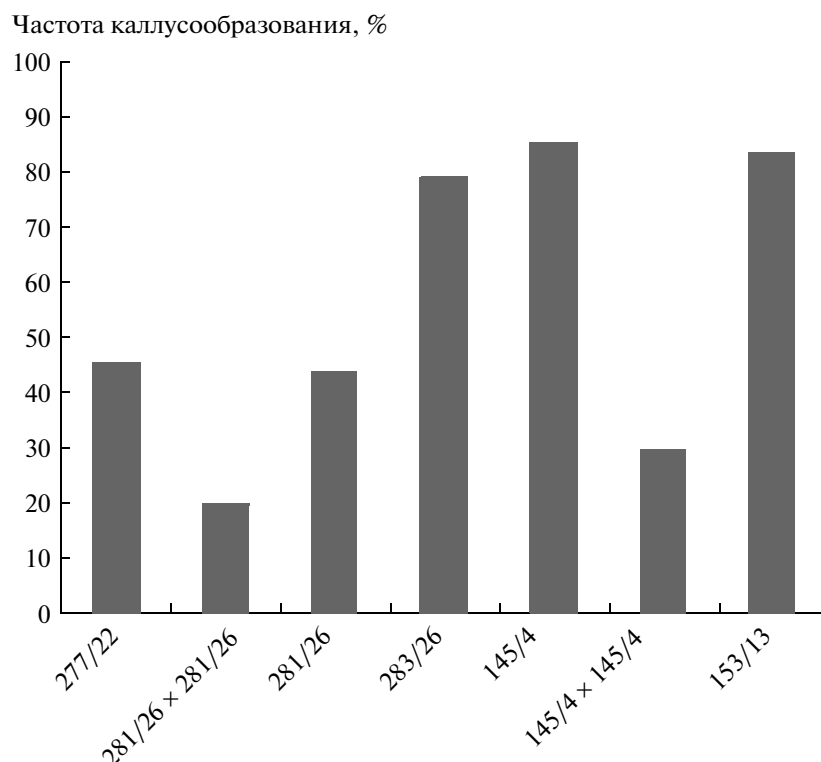


Рис. 3. Первичный отклик эксплантов мегагаметофитов кедр сибирского (30 сут культивирования) (№№ 277/22, 281/26, 283/26, 145/4, 153/13 — свободноопыленные клоны; №№ 281/26 × 281/26, 145/4 × 145/4 — самоопыленные клоны).

культуре изолированных зародышей эмбриогенная компетентность клеток шла через удлинение клеток и их поляризацию. В этих удлинённых клетках, названных нами “эмбриональными трубками”, происходило асимметричное деление, в результате которого образовывались клеточные инициалы на одном из полюсов, происходило образование “клеточных агрегатов” и образование глобул соматических зародышей, и суспензоров, состоящих из эмбриональных трубок. Формировалась эмбрионально-суспензорная масса.

Образование эмбриогенного каллуса в культуре мегагаметофитов (“гиногенная культура”) было описано для *L. decidua*, где клетки эксплантов начинали продуцировать длинные (суспензоридные) клетки, в которых возникали многоядерные структуры. Ядра мигрировали к одному из полюсов, где вокруг них образовывались клеточные стенки, и шло формирование кластеров — формировались эмбриониды (von Aderkas, Bonga, 1988; von Aderkas et al., 1991). Образование эмбрионидов в культуре мегагаметофитов кедр сибирского шло аналогично лиственнице европейской. Прежде всего, у кедр сибирского, происходило удлинение клеток, в которых формировался четырехядерный ценоцит, затем наблюдалась миграция ядер к одному из полюсов, где происходи-

ло формирование четырех клеток. Эти клетки активно делились и формировали глобулу соматического зародыша на дистальном конце которой развивались клетки суспензора. Следовательно, первым этапом проявления соматического эмбриогенеза как в культуре мегагаметофитов, так и в культуре зародышей у хвойных видов является приобретение соматическими клетками эмбриогенной компетентности, которая выражается в удлинении клеток и их поляризации. Далее в культуре зародышей шло асимметричное деление длинных клеток по типу зиготического эмбриогенеза, а в культуре мегагаметофитов образование четырехядерного ценоцита по типу развития зиготического проэмбрио.

Известно, что ауксин является необходимым условием для появления полярности клеток, которая проявляется уже в зиготе яйцеклетки и на самых ранних этапах эмбриогенеза. Ключевыми регуляторами полярности являются PIN-белки. Экспрессия генов PIN1, PIN7, MP и BDi начинается уже на стадии двухклеточного зародыша в зиготическом эмбриогенезе, и это определяет первичную разметку доменов зародыша и, в целом, формирование апикально-базальной оси зародыша (см. Лутова и др., 2010). Вероятно, такой же процесс под действием ауксина происходит и при соматическом эмбриогенезе. В процессе со-

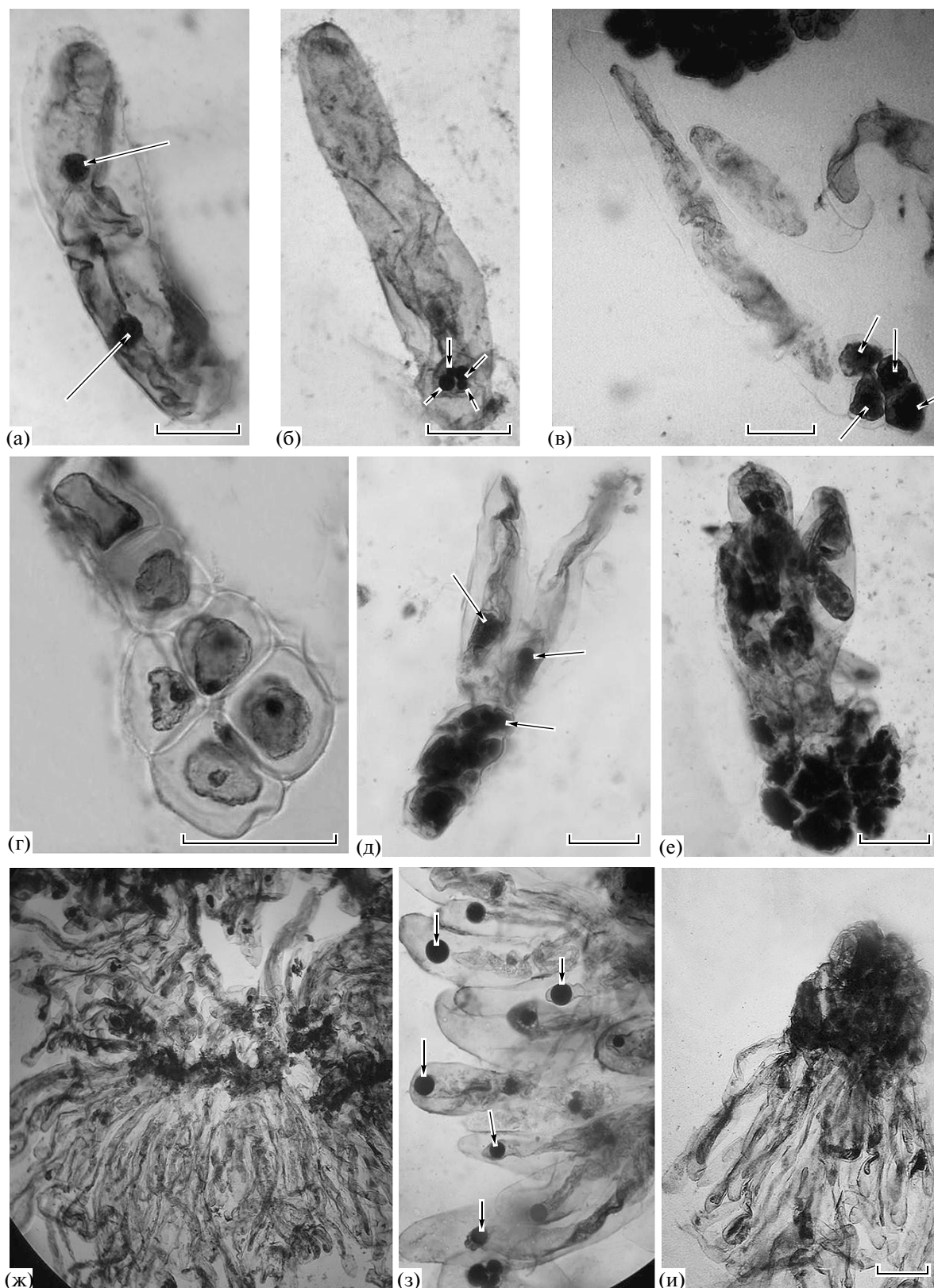


Рис. 4. Формирование эмбрионидов в культуре мегагаметофитов кедр сибирского (бар 100 мкм, стрелками указаны ядра): а — образование двуядерного ценоцита; б — миграция четырех ядер ценоцита к полюсу длинной клетки; в — формирование четырех инициальных клеток и безъядерной клетки-трубки; г — образование клетки суспензора; д — формирование двух клеток суспензора; е — глобулярный эмбрионид с суспензором; ж — группа эмбрионидов; з — миграция ядер в клетках суспензора на дистальный конец; и — сформированный эмбрионид.

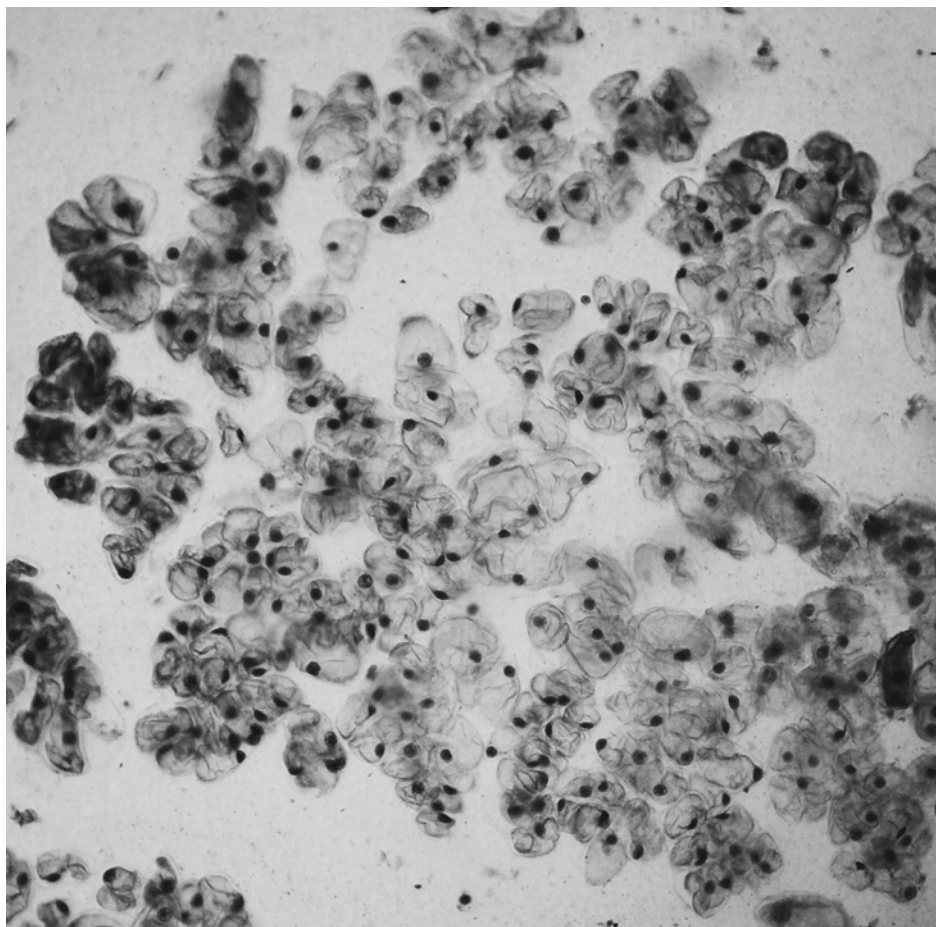


Рис. 5. Неэмбриогенный каллус из мегагаметофитов кедра сибирского (размерность 100 мкм).

матического эмбриогенеза возникновение биполярных структур происходит не из зиготы, а из соматических клеток экспланта прямым путем. Дальнейшая судьба клеток в культуре, вероятно, определяется в зависимости от их положения в системе глобулярного эмбриоида, также как в зиготическом эмбриогенезе.

Можно предположить, что компетентность соматических клеток к эмбриогенезу — это организованный рост и полярность. Каждая соматическая клетка имеет достаточную генетическую информацию, необходимую для созревания полного функционирующего растения (von Arnold et al., 2002). Предполагается, что один из возможных механизмов экспрессии определенных генов при соматическом эмбриогенезе происходит под действием метилирования ДНК, которое индуцируется ауксином (Lo Schiavo et al., 1989). Кроме того не исключено, что гормоны (ауксин и цитокинин) являются сигналом, который вызывает каскад, приводящий к репрограммированию экспрессии генов, вызывающие поляризованный

рост, приводящий к соматическому эмбриогенезу (Dudits et al., 1995).

Таким образом, у видов *Larix* и *P. sibirica* в культуре зародышей, и культуре мегагаметофитов первый этап эмбриогенной компетентности эксплантов выражался в образовании длинных вакуолизированных клеток. Далее в культуре зародышей шло асимметричное деление с образованием глобулы, а в культуре мегагаметофитов — образование ценоцита на одном из полюсов, затем переход к клеткообразованию и дифференциации эмбриоида на собственно зародыш и суспензор. Это свидетельствует о том, что соматический эмбриогенез у голосеменных является хорошо организованной системой и может служить модельной системой в изучении молекулярно-генетических событий на самых ранних этапах развития растительного организма.

Работа выполнена при поддержке гранта р-Сибирь-а, № 13-04-98045.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ирошников А.М. Полиморфизм популяций кедра сибирского // Изменчивость древесных растений Сибири. Красноярск: Институт леса СО РАН, 1974. С. 73–103.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1973. 343 с.
- Лутова Л.А., Ежова Т.А., Додуева И.Е. и др. Генетика развития растений. Ленинград: Наука, 2011. 432 с.
- Минина Е.Г., Ларионова Н.А. Морфогенез и проявление пола у хвойных. М.: Наука, 1979. 134 с.
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980. 340 с.
- Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Минск: Высшая школа, 1973. 320 с.
- Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных: физиологические аспекты. Новосибирск: Наука, 1990. 157 с.
- Третьякова И.Н., Ижболдина М.С. Индукция соматического эмбриогенеза у кедра сибирского // Лесоведение. 2009. Т. 5. С. 41–47.
- Третьякова И.Н., Барсукова А.С. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы // Онтогенез. 2012. Т. 43. № 6. С. 1–11.
- Третьякова И.Н. Эмбриогенные клеточные линии и соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* у лиственницы сибирской // Доклады Академии наук. 2013. Т. 450. № 1. С. 122–125.
- Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Шуваев Д.Н., Пак М.Э. Перспективы микроклонального размножения хвойных в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез // Хвойные бореальной зоны. 2012. Т. 28. № 1–2. С. 180–186.
- Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Шуваев Д.Н. Каллусогенез и индукция соматического эмбриогенеза у зародышей гибридных семян *Pinus sibirica* // Физиология растений (в печати).
- Dudits D., Gyorgyey J., Borge L. et al. Molecular Biology of Somatic Embryogenesis / *In vitro* Embryogenesis in Plants. Ed. Thorpe T.A. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 1995. P. 267–308.
- Gupta P.K., Durzan D.J. Somatic polyembryogenesis from subcultured callus of immature sugar pine embryos // Bio/Technology. 1986. V. 4. P. 643–645.
- Gupta et al., Shaw D., Durzan D.J. Loblolly pine; Micropropagation, Somatic Embryogenesis and Encapsulation. In J.M. Bonga and D.J. Durzan [eds.] // Cell and tissue culture in forestry. 1986. V. 3. P. 101–108.
- Gupta P.K., Durzan D.J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine // Bio/Technology. 1987. V. 5. P. 147–153.
- 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 Science. 1985. V. 38. P. 53–59.
- Klimaszewska K., Cyr D.R. Conifer Somatic Embryogenesis: I. Development // Dendrobiology. 2002. V. 48. P. 31–39.
- Lo Schiavo F., Pitto L., Giuliano G. et al. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by maturation, differentiation, hormones and hypomethylation drugs // Theoretical and Applied Genetics. 1989. V. 77. P. 325.
- Litvae J.D., Verma D.C., Johnson M.A. Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.) // Plant Cell Reports. 1985. V. 4. P. 325–328.
- Malabadi R.B., Van Staden J. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula* // Tree Physiology. 2005. V. 25. P. 11–16.
- Nagmani R., Bonga J.M. Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua* // Canadian Journal of Forest Research. 1985. V. 15. P. 1088–1091.
- Park Y.-S. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations // Annals of Forest Science. 2002. V. 59. P. 651–656.
- Park Y.-S., Bonga J. Application of somatic embryogenesis in forest // Management and research IUFRO working party 2.09.02 somatic embryogenesis of forest trees conference advances in somatic embryogenesis of trees and its application for the future forests and plantations / Suwon, Republic of Korea. August 19–21, 2010. P. 3–8.
- Simola L.K., Santanen A. Improvement of nutrient medium for growth and embryogenesis of megagametophyte and embryo callus lines of *Picea abies* // Physiology of Plants. 1990. V. 80. P. 27–35.
- Stasolla C., Yeung E. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2003. V. 74. P. 15–35.
- Von Aderkas P., Bonga J.M. Formation of haploid embryoids in *Larix decidua*: early embryogenesis // American Journal of Botany. 1988. V. 75. P. 619–628.
- Von Aderkas P., Bonga J., Klimaszewska K. et al. Comparison of larch embryogeny *in vivo* and *in vitro* // Woody plant biotechnology / New York: Plenum press. 1991. P. 139–155.
- Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Kyachok J., Filonova L. Developmental pathways of somatic embryogenesis // Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2002. V. 69. P. 233–249.
- Williams E.G., Maheswaran G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an Embryogenic group // Annals of Botany. 1986. V. 57. P. 443–462.

Embryo Initiation from *Pinus sibirica* Megagametophytes in *In Vitro* Culture**I. N. Tret'yakova^a and E. V. Voroshilova^b**^a *Sukachev Institute of Forestry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Akademgorodok 50, bld. 28, Krasnoyarsk, 660036 Russia*^b *Siberian Federal University, Svobodnyi pr. 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia*
e-mail: culture@ksc.krasn.ru

Received June 3, 2013; in final form, September 11, 2013

Abstract—Megagametophytes of Siberian pine were cultured on an in vitro culture medium 1/2 LV supplemented with growth regulators 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and benzylaminopurine (6-BAP) to form embryos. The competency of somatic cell of explants to embryogenesis manifested itself in an organized growth and polarity. A coenocyte consisting of long vacuolated cells was formed in the megagametophyte culture. Then, the migration of the nuclei to one of the poles of the cell, their division, and formation of embryos was observed. The megagametophyte culture of the Siberian pine differed from the zygotic embryo culture by the absence of asymmetric division in the vacuolated cell.

Keywords: *Pinus sibirica*, megagametophytes, somatic embryogenesis, embryos