

Резюме

Среди различных таксономических групп микроорганизмов — митоспоровых грибов и бактерий были селекционированы штаммы продуценты CoA *Fusarium sambucinum* и *Corynebacterium ammoniagenes*. С применением методов мутагенеза получен сверхсинтетик *Corynebacterium ammoniagenes B-6*. Разработан биотехнологический способ получения CoA на основе микробных клеток-продуцента в сочетании с химически синтезированными предшественниками, что позволит получать препараты CoA с высоким его содержанием.

Серед різних таксономічних груп мікроорганізмів — мітоспорових грибів та бактерій були селекціоновані штами продуценти CoA *Fusarium sambucinum* і *Corynebacterium ammoniagenes*. З використанням методів мутагенезу одержано надсинтетик *Corynebacterium ammoniagenes B-6*. Розроблено біотехнологічний засіб одержання CoA на основі мікробних клітин-продуценту в поєднанні з хімічно синтезованими попередниками, що дозволить отримувати препарати CoA з його високим вмістом.

We have selected CoA producers strains *Fusarium sambucinum* and *Corynebacterium ammoniagenes* among different taxonomic groups of microorganisms — mitospore fungi and bacteria. It was obtained CoA supersynthetic strain *Corynebacterium ammoniagenes B-6* using mutagenic methods. The biotechnological method of CoA production was developed based on microbial producer cells in cooperation with chemically synthesized precursors. This method will allow to produce CoA preparations with its high content.

ТРЕТЬЯКОВА И.Н.

Учреждение академии наук, Институт леса им.В.Н.Сукачева

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, e-mail: culture@rsc.krasn.ru

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ РЕПРОДУКТИВНОГО ПРОЦЕССА ХВОЙНЫХ *IN VIVO* И В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

У представителей хвойных растений потенциально заложены множественные пути реализации их репродуктивного потенциала: наличие полиархегониальности, кливажа и полиэмбрионии, а также возможность асексуального возникновения зародыша (Минина, Ларионова, 1979; Третьякова, 1990). В развитии гаметофита от архегоният к *Coniferales* в филогенезе прослеживаются следующие тенденции: 1 — постепенная ликвидация заростка; 2 — акселерация генеративного цикла; 3 — акселерация гаметофитогенеза; 4 — усиление физиологической активности гаметофита; 5 — проявление апомиксиса. Последний наиболее часто встречается у прогрессивных и высокоорганизованных семейств покрытосеменных растений (Хохлов, 1970; Минина, Ларионова, 1979).

Цель данной работы — проанализировать особенность репродуктивного процесса у хвойных видов *in vivo* и в культуре *in vitro* и обсудить возмож-

ность применения эмбриологических признаков для эволюционных построений у данного класса растений.

Материал и методы

В исследованиях были использованы хвойные виды — *Pinus sibirica*, *Pinus pumila*, *Pinus sylvestris*, *Larix sibirica*, *Abies sibirica*, *Picea obovata*, *Picea ajanensis*, произрастающие в естественных древостоях и клоновых плантациях Сибири: Западного и Восточного Саяна, хребта Хамар-Дабан и Кузнецкого Алатау.

В течении вегетационного периода проводили периодический сбор образцов семян у хвойных видов для цитозембриологического анализа и ввода зародышей семян в культуру *in vitro*. Цитозембриологические исследования вели на парафинированных постоянных и временных препаратах (Паушева, 1980). Просмотр микроскопических образцов осуществляли на микроскопе МБИ-6.

Для инициации соматического эмбриогенеза из зиготических зародышей хвойных видов использовали базовые среды 1/2 MS (Murashige Scoog, 1962), MSG (Vecwar et al., 1990) и MA (неопубликованные данные), с добавлением мезоинозита (1 г/л), аскорбиновой кислоты (0,4 г/л), казеина (1 г/л), глутамина (0,5 г/л), сахарозы (30 г/л) и агара (7 г/л)). В качестве регуляторов роста использовали 2,4-Д (2 мг/л) и БАП (1 мг/л).

Для пролиферации полученной эмбриональной массы применялась базовые среды с уменьшенной в 2 раза концентрацией цитокининов. Эксперименты по вызреванию соматических зародышей выполняли на базальных средах, содержащих, АБК (60–120 мМ) и ПЭГ (5–10%) в различных вариациях

Результаты и обсуждение

Онтогенез женского гаметофита семейства сосновых (Pinaceae) зависит от продолжительности генеративного цикла. У видов с однолетним генеративным циклом (*Larix*, *Picea*, *Abies*) гаметогенез занимает 30–40 дней, у видов с двухлетним генеративным циклом (*Pinus*) до 1 года. Разница в сроках формирования гаметофита обусловлена значительной растянутостью свободной стадии развития у рода *Pinus*. Одним из признаков в эволюционной продвинутости таксонов является темп развития женских генеративных структур на период опыления (Третьякова, 1991). Этот признак можно рассматривать как начальный этап взаимодействия мужского и женского гаметофитов в семяпочке, свидетельствующий об относительной автономности развития гаметофитов или их тесном взаимодействии. У сосновых с однолетним генеративным циклом на период опыления семяпочки макроспорогенез заканчивался или развивался свободнойядерный женский гаметофит (ценоцитная стадия развития). Семяпочки у таких видов могли развиваться и формировать пустые семена при отсутствии в них мужского гаметофита. Развитие эмбриологических структур у семяпочек *Pinus sibirica* приближается к хвойным с однолетним генеративным циклом. На период опыления в семяпочках идет макроспорогенез или развивается женский гаметофит, Неопыденные

семяпочки *Pinus sibirica* могут трансформироваться в мелкие недоразвитые семена. Семяпочки *Pinus sylvestris* по развитию на период опыления отстают от семяпочек *Larix*, *Picea*, *Abies* и *Pinus sibirica*, так как имеет лишь макроспороцит. Неопыленные семяпочки *Pinus sylvestris* не развиваются.

Факты акселерации развития гаметофитов и, в целом женских шишек, периодически встречаются у деревьев *Pinus sibirica* в Западном Саяне. Такие формы деревьев формируют женские шишки и семена в течение одного вегетационного периода (вместо двух). Акселерация идет за счет сокращения свободноядерной стадии развития женского гаметофита, которая осуществляется за 30–40 дней (также как у *Larix*, *Picea*, *Abies*). Однако оплодотворение зрелых яйцеклеток у особей *Pinus sibirica* с ускоренным генеративным циклом не происходит из-за несовместимости мужских и женских гамет (Третьякова, 1990). Как правило яйцеклетки таких семяпочек подвергаются гаплоидному делению, т.е. встают на путь партеногенеза. Иногда наблюдается формирование проэмбрио, но развитие зародыша не происходит. Беззародышевые семена гетерозисных форм образуют развитый эндосперм. Физиолого-биохимические исследования аномальных особей *Pinus sibirica* показали, что вегетативные и генеративные органы их характеризуются высоким физиолого-биохимическим потенциалом, проявляющимся в углеводном, аминокислотном и гормональном обмене (Минина, Ларионова, 1979).

Имеются немногочисленные литературные данные, свидетельствующие о встречаемости апомиксиса у голосеменных растений (Минина, Ларионова, 1979). Образование семян без оплодотворения было обнаружено у ряда видов сосен *Pinus pinaster*, *Pinus nigra*, *Pinus wallichiana* (Saxton, 1909; Mehra Dogra, 1975) и *Pseudotsuga menziesii* (Ort-Ewing, 1957). Явление, близкое к апомиксису, было выявлено у *Abies pindrow*, у которой происходило слияние ядра брюшной канальцевой клетки с ядром яйцеклетки (Dogra, 1966). Сходное с апомиксисом явление — партеноспермия, или формирование семян без оплодотворения, описывалось у различных видов лиственниц, можжевельников, пихты европейской, ели обыкновенной, дуглассии и, значительно реже, у сосны обыкновенной (Минина, Ларионова, 1979). Партеноспермия могла выражаться в разрастании шишек без семян и образовании семян разной степени сформированности.

Мининой Е.Г. было высказано предположение о том, что возникновение элементов апомиксиса у хвойных происходит при нарушении семеношения дерева, особенно часто проявляющегося у аномальных форм *Pinus sibirica* с однолетним генеративным циклом, обладающих высокой физиолого-биохимической активностью тканей. Все это свидетельствует о эволюционной продвинутости таких форм (Минина, Ларионова, 1979), а также эволюционной продвинутости *Pinus sibirica* в системе рода *Pinus* (Третьякова, 1991).

Индукцию апомиксиса, как у покрытосеменных, так и голосеменных растений можно вызвать веществами гормональной природы, экстремальными температурами, облучением и другими факторами. Так, у сосны ладанной (*P. taeda*) и сосны румелийской (*P. peuce*) при опрыскивании растворами

ГК неопыленных женских шишек наблюдалось их разрастание (Stuard, Cathey, 1961). При обработке дуглассии растворами ИМК и ГК происходило образование вполне развитых семян (Stettler et al., 1969). Таким образом предпосылки для возникновения растительных организмов асексуально (минуя половой процесс) у голосеменных в природных условиях встречаются и они могут быть индуцированы обработкой фитогормонами и особенно в культуре *in vitro*.

Кроме того, хорошо известно, что для семязпочек голосеменных растений характерно наличие полиархеогониальности и полиэмбрионии (Singh, 1978). Оплодотворение двух и более яйцеклеток в пределах семязпочки хвойных и последующий кливаж клеток зиготического зародыша приводит к возникновению многозародышевости, полученной от разных “отцов” в одном мегагаметофите (у видов *Pinus* до 16) (Третьякова, 1990). Реализация этого репродуктивного потенциала широко проявляется в экспериментальных условиях культуры *in vitro*, и, прежде всего, через соматический эмбриогенез.

Соматический эмбриогенез был индуцирован у родов *Pinus*, *Picea*, *Abies* и *Larix*, не только из зиготических зародышей и семядолей прорастающих семян, а также вегетативных побегов (Lelu, 1994; Lelu-Walter et al, 2009; Klimaszewska, Cyr, 2002; Stasolla et al, 2002). Экспериментальным путем было показано, что соматический эмбриогенез — процесс многоступенчатый, включающий применение разнообразных химических соединений и многочисленных различных предобработок. Он включает: индукцию эмбриогенного каллуса (эмбриональной массы), пролиферацию эмбриогенной массы, созревание соматических зародышей, прорастание зародышей и формирование регенерантов.

Индукция эмбриогенного каллуса у представителей хвойных видов проявлялась в появлении эмбрионально-суспензорной массы (ЭМ), состоящей из эмбриональных трубок и инициалей эмбрио. Возникновению ЭМ предшествовало резкое увеличение длины соматических клеток, которые подвергались асинхронному делению и формировали на одном из полюсов маленькие эмбриональные клетки. Пролиферация ЭМ приводила к образованию отдельных клеточных конгломератов, активно продуцирующих новые эмбриональные глобулы и эмбриональные трубки, из которых при дальнейшем развитии образовывался суспензор. Процесс пролиферация ЭМ идет от 1 мес. до 2 лет. При этом периодический перенос кусочков эмбриогенного каллуса на безгормональную среду (на 1 нед.), а затем на среду с АБК, способствовал вызреванию соматических зародышей. У *Larix sibirica* соматические зародыши вызревали в течении 1–1,5 мес., у *Picea ajanensis* — 2 мес. у *Pinus sibirica* 3–4 мес. Весь процесс регенерации через соматический эмбриогенез у *Larix* и *Picea* занимал 4–6 мес., у *Pinus sibirica* 7–10 мес. Полученные соматические зародыши не отличались от зиготических зародышей и имели ярко-выраженную полярную структуру. Соматический эмбриогенез у хвойных растений повторяет путь развития половых зародышей: проэмбриогенез, ранний эмбриогенез и поздний эмбриогенез.

Соматический эмбриогенез наиболее успешно инициировался из незрелых зиготических зародышей введенных в культуру на стадии развития примордиев семядолей. При этом образование ЭМ происходило в области прилегания зародышевого корешка к суспензору зиготического зародыша. Вероятно, клетки этой зоны являются наиболее активными, и не исключено, что они представляют собой стволовые клетки, способные к неограниченному росту в культуре *in vitro*.

Успешность соматического эмбриогенеза тесно связана с генотипом донорского растения. Зародыши семян с плюсовых деревьев и гибридных семян, полученные в результате опыления клонов пыльцой, взятой с деревьев *Pinus sibirica* с однолетним генеративным циклом более активно формировали ЭМ и соматические зародыши, в то время как экспланты других деревьев не способны образовывать подобные структуры в культуре *in vitro*. У деревьев *Larix sibirica*, устойчивых к листовенничной почковой галлице получено 5 клеточных линий, которые могут неограниченно долго пролиферировать и формировать соматические зародыши и регенеранты. Не исключено, что гетерозисные деревья, обладающие высоким репродуктивным потенциалом и проявляющие признаки апомиксиса, будут наиболее перспективными при введении в культуру *in vitro* с целью получения соматических зародышей и создания банка пролиферирующего эмбриогенного каллуса при проведении генетико-селекционных исследований.

Выводы

Наличие полиархеогониальности, кливажа, полиэмбрионии и признаков апомиксиса, а также возможность клонирования через соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* у хвойных видов свидетельствует об их высоком репродуктивном потенциале.

Периодическая встречаемость в популяциях генотипов *Pinus sibirica* с акселерацией генеративного цикла, а также выявление генотипов, потомство которых обладает высокой регенерационной способностью в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез, может дать материал не только для массового тиражирования улучшенных форм хвойных растений, но и для эволюционных построений.

Вероятно, что в ходе эволюции у хвойных, наряду с половым размножением, возникли типы бесполого (вегетативного) размножения, направленные на сохранение вида. Не исключено, что множественные пути реализации репродуктивного потенциала, вероятно архивированы у хвойных видов.

Литература

1. Минина Е.Г., Ларионова Н.А. Морфогенез и пол у хвойных.— М.: Наука.— 1979.— 216 с.
2. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений.— М.: Колос.— 1980.— 34 с.
3. Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных (Физиологические аспекты).— Новосибирск: Наука.— 1983.— 157 с.
4. Третьякова И.Н. Об эволюции гаметофита в семействе Pinaceae. Общебиологические аспекты филогении растений.— М.: Наука.— 1991.— С. 103–105.

5. Хохлов С.С. Апомиксис: классификация и распределение у покрытосеменных растений. Апомиксис и селекции.— М.: Наука.— 1970.— С. 7–21.

6. Вецвар М.Р., Нагмани Р., Ванн С.Р. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*) // Can. J. For. Res.— 1990.— Vol.20.— P. 810–817.

7. Dogra P.D. Observation on *Abies pindrow* with a discussion on the question of occurrence of apomixes in Gymnosperms // *Silvae Genet.*— 1966.— Vol.15, N1.— P. 1–20.

8. Lelu M.A., Bastien C., Klimaszewska K., Ward C., Charest P.J. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): Part I. Somatic embryo maturation // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*— 1994.— Vol.36.— P. 107–115.

9. Lelu-Walter M.-A., Paques L.E. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x marschlinii*). Perspectives for breeding // *Ann. For. Sci.*— 2009.— Vol.66.— P. 104.

10. Klimaszewska K., Cyr D.R. Conifer somatic embryogenesis: I. Development // *Dendrobiology.*— 2002.— Vol.48.— P. 31–39.

11. Mehra P.N., Dogra P.D. Embryogeny. of Pinaceae. I Prombryogeny // *Proc. Indian. Nat. Sci. Acad.*— 1975.— 41, N5.— P. 406–409.

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

13. Orr-Ewing A.L. Possible occurrence of viable unfertilized seeds in Douglas — fir. *Forest Sci.*— 1966.— Bd.26.— P. 73–77.

14. Saxton W.T. Partenogenesis in *Pinus pinaster* // *Bot. Gaz.*— 1909.— Vol.47, N1.— P. 192–194.

15. Stasolla C., Yeung E. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality // *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.*— 2003.— Vol.74.— P. 15–35.

16. Singh H. Embryology of gymnosperms.— Berlin: Stuugard; Gebruder Borntraeger.— 1978.— P. 187–241.

17. Stettler 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.

18. Stuard W.N., Cathey H.M. Applied aspects of the gibberellins // *Annu. Rev. Plant Physiol.*— 1961.— Vol.12.— P. 369–394.

Резюме

Цель работы заключалась в анализе особенностей репродуктивного процесса у хвойных видов *in vivo* и в культуре *in vitro* и обсуждении возможности использования эмбриологических признаков в эволюции данного класса растений. Наличие полиархеогонии, кливажа, полиэмбрионии и признаков апомиксиса, а также возможность клонирования через соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* свидетельствует о высоком репродуктивном потенциале хвойных. Многовариантные пути реализации репродуктивного процесса, вероятно, архивированы у хвойных.

The aim of the studying is the analysis of peculiarities of reproductive processes in coniferous species and discussion of using embryological signs in evolution. A lot of archeogonia, cleavage, polyembryony, as also cloning by somatic embryogenesis in culture *in vitro* are due to the high reproductive potential of Conifer. Possible, a lot of variants of reproductive processes are archived in coniferous species.

**ФИЛИПЕНКО Е.А., СИДОРЧУК Ю.В., ЗАГОРСКАЯ А.А., ЖАРИКОВ Т.Ю.,
ДЕЙНЕКО Е.В.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, г. Новосибирск, 630090,
пр-т Лаврентьева, д. 10, e-mail: filipenko@bionet.nsc.ru*

АНАЛИЗ СПЕКТИНОМИЦИН-УСТОЙЧИВЫХ КАЛЛУСНЫХ ЛИНИЙ МОРКОВИ (*DAUCUS CAROTA*), ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Технология получения трансгенных растений включает два принципиальных этапа. Первый связан с переносом и интеграцией чужеродного гена в геном растительной клетки. На втором этапе производится отбор трансформантов (по фенотипическим признакам) на селективных средах. Одним из антибиотиков, часто используемых в качестве селективного агента при создании транспластомных растений (с трансформированным хлоропластным геномом), является спектиномицин, действие которого приводит к нарушению синтеза хлоропластных белков. В этом случае генетическая конструкция, предназначенная для встраивания в хлоропластный геном, содержит ген *aadA*, кодирующий фермент аминогликозид-3'-аденилтрансферазу, который переводит спектиномицин в функционально неактивную форму — 3'-аденилилспектиномицин (1). При отборе на селективной среде с антибиотиком нетрансформированные растения обесцвечиваются, в то время как растения, в геном которых вошел трансген, остаются зелеными.

Длительный период культивирования растительных клеток на селективной среде может сопровождаться возникновением в хлоропластном геноме мутаций, обуславливающих резистентность к антибиотику (2–4).

Растения, обладающие устойчивостью к антибиотику вследствие произошедших в геноме спонтанных мутаций, фенотипически не отличимы от истинных трансгенных растений. Поэтому в работе по получению транспластомных растений необходимо учитывать вероятность появления растений, в пластомах которых появились мутации, и проводить дополнительный молекулярный анализ с целью их выявления и элиминирования.

При биобаллистической трансформации пластома моркови (*Daucus carota* L.) нами были выделены каллусные линии, резистентные к антибиотику спектиномицину. ПЦР-анализ не выявил наличия экзогенной ДНК в их геномах. Полученные результаты свидетельствуют, что устойчивость к антибиотику у каллусных линий моркови могла быть обусловлена спонтанными мутациями, возникшими как в пластидном, так и в ядерном геномах. В связи с этим целью данной работы являлось определение типа мутаций и их локализации в геномах выделенных линий.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили устойчивые к спектиномицину каллусные линии, выделенные в ходе экспериментов по биобаллистической обработке каллусных культур клеток моркови плазмидой, содержащей ген устойчивости к спектиномицину *aadA*, и последующем отборе на среде с