ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru

УДК 57.085.23:582.475.2 UDC 57.085.23:582.475.2

Влияние стадии развития зиготического зародыша на инициацию соматического эмбриогенеза *Pinus sibirica*

Лукина А.В., Третьякова И.Н.

Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия
*E-mail: yunnatu@ksc.krasn.ru

Аннотация

В последние годы происходит снижение репродуктивного потенциала *Pinus sibirica* Du Tour в связи с изменениями климата и массовой заготовкой кедрового ореха. Для воспроизводства данного вида необходимо применение современных методов размножения, одним из которых является технология соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro*. *P. sibirica* относится к неподатливым («recalcitrance») к соматическому эмбриогенезу видам. Ранее получить пролиферирующие эмбриогенные культуры у данного вида не удавалось. Цель данной работы заключалась в инициации соматического эмбриогенеза у *P. sibirica*. При культивировании эксплантов на среде DCR с регуляторами роста 2,4-Д (2 мг/л) и 6-БАП (1 мг/л) было выявлено, что инициация соматического эмбриогенеза зависит от стадии развития экспланта (зиготического зародыша). Максимальный уровень инициации получен от зиготических зародышей на посткливажной стадии развития.

Ключевые слова

Pinus sibirica ◆ зиготический зародыш ◆ соматический эмбриогенез ◆ кливаж ◆ эмбрионально-суспензорная масса

The effect of the zygotic embryo developmental stage on the initiation of *Pinus sibirica* somatic embryogenesis

Lukina A.V., Tret'yakova I.N.

Sukachev Forest Institute, Siberian Branch, RAS – a separate division of FRC KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
*E-mail: yunnatu@ksc.krasn.ru

Abstract

In recent years, there has been a decline in the reproductive potential of *Pinus sibirica*, in connection with climate change and the mass harvesting of pine nuts. To reproduce this species, it is necessary to use modern reproduction methods, one of which is the technology of somatic embryogenesis in vitro culture. *P. sibirica* is a species that is not susceptible ("recalcitrance") to somatic embryogenesis. Previously, it was not possible to obtain proliferating embryogenic cultures of this species. The aim of the work was to study the influence of the developmental stage of the zygotic embryo on the initiation of somatic embryogenesis in *Pinus sibirica*. When culturing explants on DCR medium with growth regulators of 2 mg/l 2,4D and 1 mg/l 6-BAP, we found that the initiation of somatic embryogenesis depends on the stage of development of the explant (zygotic embryo). The maximum level of initiation is derived from the post-cleavage stage of the implant.

Keywords

Pinus sibirica ◆ zygotic embryo ◆ somatic embryogenesis ◆ cleavage ◆ embryonal-suspensor mass

Поступила в редакцию: 17.03.2025
Принято в печать: 10.04.2025

Received: 17.03.2025
Accepted: 10.04.2025

Цитировать | Cite as

DOI: 10.31163/2618-964X/2025-12 EDN: HWTYHQ

ВВЕДЕНИЕ

Pinus sibirica Du Tour – сосна сибирская (кедр сибирский) – единственный орехоплодный вид Сибири, имеющий большое экономическое и экологическое значение. Урожайность кедра сибирского подвержена значительным колебаниям, при этом в последние годы наблюдается тенденция к сокращению и снижению качества урожаев [Novikova et al. 2024; Velisevich, Popov 2024]. Кроме того, массовая заготовка кедрового ореха также оказывает негативное влияние на репродуктивный потенциал данного вида. Для сохранения и восстановления кедровых лесов, возникает необходимость создания

искусственных насаждений данного вида, способных компенсировать масштабное изъятие семенного материала [Горошкевич 2000; Бородинцева *и др.* 2023]. В ряде стран все более широкое применение получают программы плантационного лесовыращивания (программа Multi-Varietal Forestry, MVF) [Park *et al.* 2016], через технологию соматического эмбриогенеза позволяющие обеспечить получение неограниченного количества генетически идентичного посадочного материала с заданными характеристиками [Hazubska-Przybyl *et al.* 2022; Ramírez-Mosqueda 2022; Zhu *et al.* 2022; Zhao 2024].

Соматический эмбриогенез хвойных включает нескольких ключевых стадий: инициация, пролиферация, созревание и прорастание [Шуклина, Третьякова 2019; Gao *et al.* 2024]. Инициация соматического эмбриогенеза является критическим событием, определяющим возможность всех дальнейших процессов. Общепризнанно, что по сравнению с другими хвойными, представители сосновых являются сложными («recalcitrance») объектами для инициации соматического эмбриогенеза [Bonga *et al.* 2010; Ignatenko *et al.* 2022].

Ранее нами проводились исследования с клеточными культурами *in vitro* сосны сибирской [Третьякова, Новоселова 2003; Третьякова *и др.* 2013; Третьякова, Ворошилова 2014], однако получить пролиферирующие эмбриогенные линии не удалось. Поэтому исследование факторов, влияющих на инициацию соматического эмбриогенеза *P. sibirica*, продолжает оставаться актуальной задачей.

Среди множества факторов, влияющих на успешность инициации соматического эмбриогенеза сосновых, важную роль отводят морфофизиологическому статусу эксплантa [Bonga *et al.* 2010; Zhu *et al.* 2022]. Установлено, что для представителей рода *Pinus* эмбриогенным потенциалом обладают только незрелые зиготические зародыши, причем их эмбриогенная компетентность ограничена очень небольшим промежутком времени [Arya 2000; Bonga *et al.* 2010; Lara-Chavez *et al.* 2011; Kim, Moon 2014; Lelu-Walter *et al.* 2016]. Соответственно, для максимальной эффективности процесса индукции соматического эмбриогенеза необходима точная идентификация стадии развития зиготического зародыша, используемого для введения в культуру *in vitro*.

Цель данной работы – изучение влияния стадии развития зиготического зародыша *P. sibirica* на индукцию соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили свободноопыленные шишки *P. sibirica* деревьев, произрастающих на территории Красноярского лесничества (20 км к северо-западу от г. Красноярска). Район произрастания не подвержен действию загрязнений антропогенного характера. Сбор шишек производили с 15 июня по 6 июля 2024 г. с интервалом 3 сут.

Срезанные шишки помещали в пакеты из крафт-бумаги и хранили при температуре +4° С. В течение 1-3 сут после сбора осуществляли введение в культуру *in vitro*, фиксацию и определение стадии развития зиготических зародышей

Для приготовления постоянных препаратов образцы фиксировали раствором Навашина и далее действовали согласно общепринятой методике [Круглова *и др.* 2013]. Постоянные препараты окрашивали гематоскилином. Временные препараты окрашивали 0,1% раствором сафранина и 2% процентным раствором ацетокармина.

Для определения стадий эмбриогенеза использовали периодизацию, основанную на фундаментальных эмбриологических работах [Buchholz 1926; Singh 1978], с учетом сведений прикладных исследований [Koski 1971; Skinner 1992; Pullman Webb 1994]. Соответственно, выделяли следующие фазы: проэмбриогенез (от оплодотворения до выхода проэмбрио за пределы архегония), кливаж (расщепление проэмбрио на четыре идентичные единицы), глобулы (кливажные зародыши, состоящие из нескольких клеток), начало дифференцировки (появляются различия в размерах между лидирующим и субординантными зародышами), выраженная дифференцировка (хорошо просматривается лидирующий зародыш), семядольное кольцо (у лидирующего зародыша формируется семядольное кольцо).

Стадию развития определяли по 50 мегагаметофитам в каждую дату отбора. В культуру вводили по 144 эксплантa.

Для введения в культуру и инициации соматического эмбриогенеза использовали среду DCR [Gupta, Durzan, 1987]. Среды дополняли гормонами 2,4-D и 6-БАП в концентрации 2 мг/л и 1 мг/л соответственно, сахарозой (30 г/л), глутамином (0,5 г/л), гидролизатом казеина (0,5 г/л), мезоинозитом (0,1 г/л) и аскорбиновой кислотой (0,1 г/л). В качестве желирующего компонента использовали агар в концентрации 7 г/л. Перед автоклавированием pH среды доводили до 5,7. После автоклавирования, когда среда остывала до 50°C, через фильтр (полиэфирсульфоновая мембрана, диаметр пор 0,22 мкм (TPP, Швейцария)) добавляли глутамин и аскорбиновую кислоту. Среды разливали в стеклянные сосуды по 25 мл.

Мегагаметофиты извлекали из мегастробилов, проводили поверхностную стерилизацию 15%-ным раствором перекиси водорода в течение 12 мин с последующим промыванием в стерильной воде. Дальнейшие работы проводили в условиях бокса антибактериальной воздушной среды БАВп-01 («Ламинар-С», Россия). Мегагаметофиты освобождали от покровов, производили еще одну стерилизацию (8%-ным раствором перекиси водорода, в течение 10 мин) и помещали в сосуды с питательной средой, по 8 эксплантов на сосуд.

Культивирование осуществляли в темноте, при температуре 22-23°C. Регистрацию отклика эксплантов на введение в условия культуры проводили еженедельно в течение 10 недель.

Во время 1-го пассажа через 45-50 сут после введения в культуру проводили цитологический анализ эксплантов с использованием постоянных и временных препаратов. Просмотр образцов осуществляли на микроскопе «МИКРОМЕД-6» (ЛОМО, Россия).

Полученные клеточные культуры подразделяли на обладающие и не обладающие эмбриогенной компетентностью. В соответствии с литературными данными, к эмбриогенным относили клеточные линии, представленные клетками двух типов: мелкими округлыми интенсивно окрашенными и примыкающими к ним удлиненными, сильно вакуолизированными, слабо удерживающими краситель [Cairney, Pullman 2007; Castander-Olarieta *et al.* 2022].

Статистическую обработку данных проводили по стандартным программам MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Период исследования в 2024 г. охватывал развитие зиготического зародыша *P. sibirica* от оплодотворения и начала дробления зиготы до формирования семядолей (рис. 1).

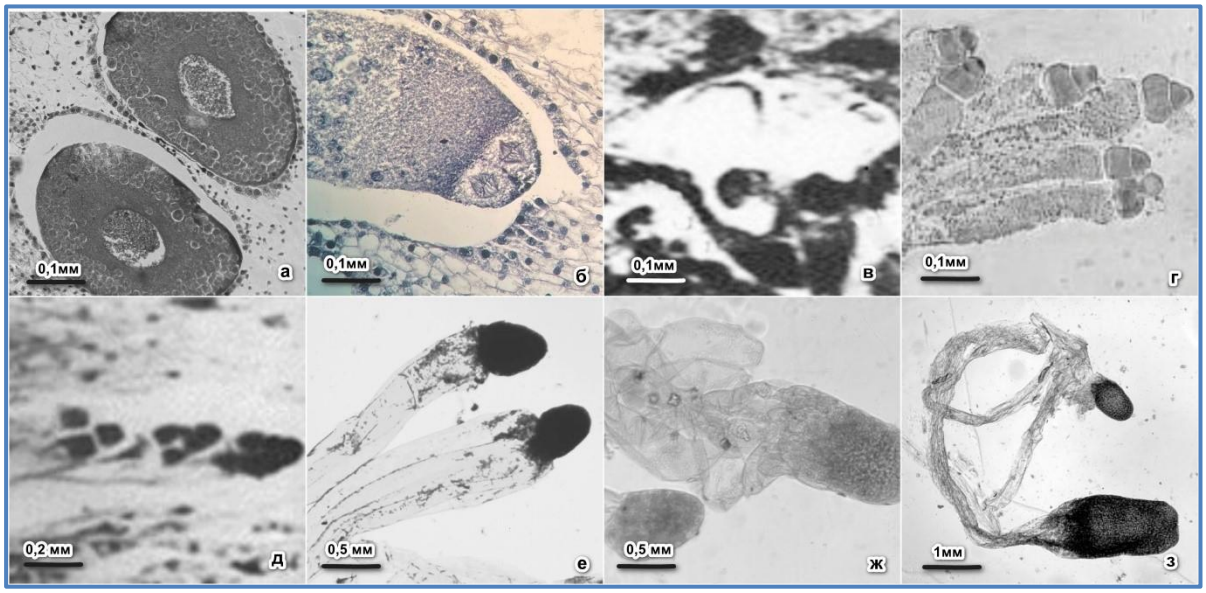

Рис. 1. Зиготический эмбриогенез в эксплантах *P. sibirica*. а) зрелые архегонии, в центре расположено ядро яйцеклетки. Фиксация 15.06; б) проэмбриогенез, деление оплодотворенной яйцеклетки. Фиксация 15.06; в) проэмбриогенез, начало растяжения эмбрионального суспензора. Фиксация 18.06; г-д) кливажные зародыши. Фиксация 21.06; е) глобулярные зародыши, до появления различия в размерах. Фиксация 24.06; ж) начало дифференцировки. Фиксация 27.06; з) выраженная дифференцировка: у доминантного зародыша формируется предсемядольное кольцо, субординантный зародыш остается на стадии глобулы. Фиксация 30.06. *Примечание:* Продольные срезы; а, б, д – постоянные препараты, в, г, е-з – временные препараты.

Начало рассеивания пыльцы в районе исследования в 2024 г. отмечено 10 июня, что соответствует норме. Пыление и оплодотворение у *P. sibirica* совпадают по времени [Третьякова, 1990], соответственно, в течение 7-10 сут после вылета пыльцы мегагаметофиты семяпочек второго года развития находятся на стадии проэмбриогенеза (рис. 1 а, б). Начиная с 18 июня (7-9 сут после опыления), в коррозионной полости можно обнаружить несколько (от 4 до 12) зародышей (рис. 1 г, д), что отражает явление полиэмбрионии, характерное для раннего эмбриогенеза сосновых [Buchholz 1926; Singh 1978; Dogra 1979]. Изначально зародыши не различаются размерами, но к 27 июня происходит дифференциация их на лидирующий и субдоминантные зародыши (рис. 1 ж, з). Ряд исследователей предполагают, что определяющее значение в установлении доминантности имеет пространственное расположение, и преимущественное развитие получает зародыш, оказавшийся глубже других продвинутым в коррозионную полость мегагаметофита [Williams 2009; von Arnold *et al.* 2019]. После установления доминантности субординантные зародыши останавливаются в развитии, и все последующие процессы морфогенеза и созревания характерны только для лидирующего зародыша.

Известно, что сроки наступления отдельных стадий эмбриогенеза могут варьировать как в связи с текущими погодными условиями, поскольку эмбриогенез тесно связан с суммой эффективных температур [Третьякова 1990; Ershova *et al.* 2025], так и между деревьями в одной популяции вследствие индивидуальной изменчивости [Singh 1978; Васильева *и др.* 2012]. В начальном периоде эмбриогенеза возможно расхождение стадий

развития зародышей даже в пределах одного мегастробила [Третьякова 1990], что может быть обусловлено разной скоростью роста и развития мужского гаметофита в тканях женского гаметофита [Williams 2008].

Наши результаты соответствуют имеющимся в литературе данным: в каждую дату сбора было обнаружено несовпадение стадий развития, а также выявлены количественные и качественные различия результатов введения мегагаметофитов в культуру *in vitro* (табл. ~~1~~).

Таблица ~~1~~. Развитие зиготических зародышей в эксплантах *P. sibirica* и результат их введения в культуру *in vitro*

	Стадия развития зиготических зародышей, %						
	проэмбрио-генез	кливаж	глобулы	начало дифферен-цировки	дифферен-цировка	формирование семядольного кольца	эмбриогенные клеточные линии%
15.06	100	0	0	0	0	0	0
18.06	92	8	0	0	0	0	0
21.06	20	72	8	0	0	0	2
24.06	0	32	68	0	0	0	10
27.06	0	0	56	44	0	0	3
30.06	0	0	0	0	100	0	0
3.07	0	0	0	0	84	16	0
6.07	0	0	0	0	48	56	0

Экспланты, отобранные 15 и 18 июня (мегагаметофиты на стадии проэмбриогенеза), в условиях культуры *in vitro* не развивались (табл. 1). Первый отклик на введение в условия *in vitro* – выдавливание клеточной массы через микропиле мегагаметофита (экструзия) – был получен у эксплантов, собранных 21 июня. Максимальное число экструзий (10%) было получено у эксплантов, собранных 24 июня, когда 68% мегагаметофитов заключали в себе зиготические зародыши на посткливажной стадии. У эксплантов, отобранных 27 июня, число экструзий снижается. В этот период у зиготических зародышей начинались процессы дифференцировки и устанавливалось явное преобладание в размерах одного зародыша над прочими (субдоминантными). С 30 июня и в последующие даты отбора эксплантов получить экструзии не удавалось. Однако при механическом повреждении мегагаметофитов или при введении в культуру изолированных зародышей возможно формирование клеточных линий, не проявляющих эмбриогенной компетентности (данные не приведены).

Все полученные клеточные линии после 45–50 сут культивирования на среде для инициации были перенесены на свежую среду. Одновременно производили цитологический анализ полученных клеточных линий (рис. 2).

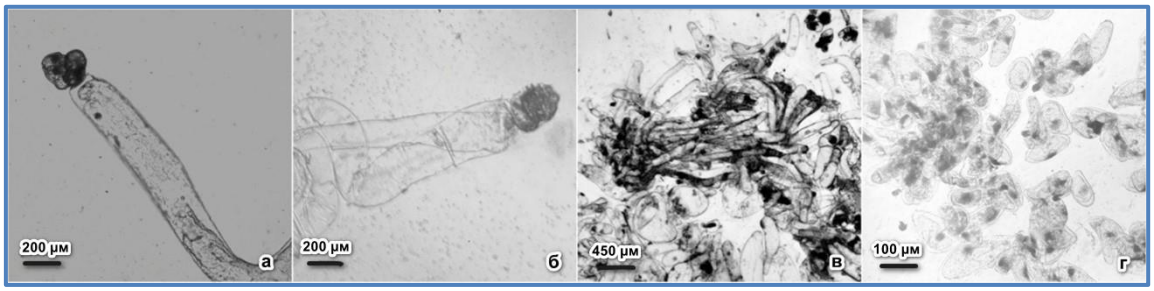

Рис. 2. Инициация соматического эмбриогенеза у *P. sibirica*. а–б) зародышеподобные структуры, состоящие из округлых темных клеток (глобулы соматичского зародыша) и вытянутых бесцветных клеток (суспензор); в) общий вид

эмбрионально-суспензорной массы; г) неэмбриогенный каллус. *Примечание:* временные препараты.

Полученные в результате экструзии клеточные линии характеризовались присутствием в культуре двух типов клеток: мелких округлых, ярко окрашенных, составляющих глобулу соматического зародыша, и прилегающих к ним прозрачных удлиненных эмбриональных трубок, слагающих суспензор. Принято считать, что наличие подобных структур позволяет относить культуры к обладающим эмбриогенной компетентностью, которая может быть реализована при дальнейших манипуляциях [Carney, Pulman 2007]. В иностранной литературе такие типы клеточных культур называют проэмбриональной массой (PEM), в отечественных источниках более широкое распространение имеет термин эмбрионально-суспензорная масса (ЭСМ) [Третьякова, Шуклина 2019].

Кроме эмбрионально-суспензорной массы был получен и другой тип клеточных линий, представленный однородными крупными клетками, не обладающими полярностью и представляющими собой каллус (рис. 2 г). Каллусные клеточные линии неспособны непосредственно продуцировать соматические зародыши. При этом ряд исследователей не исключают возможности индукции непрямого соматического эмбриогенеза, являющегося проявлением свойства тотипотентности растительных клеток [Fehér *et al.* 2016; Zhao 2024].

Максимальная частота инициации отмечена в период, когда зиготические зародыши находятся на посткливажной стадии, что согласуется с данными, полученными на других представителях рода *Pinus* [Arya *et al.* 2000]. Особое внимание к данной стадии вызвано тем, что ряд исследователей предполагают, что именно многократное повторение кливажных процессов в условиях культуры является механизмом формирования и пролиферации эмбриогенных клеточных культур [Fehér *et al.* 2016)].

В нашем исследовании критическим событием для инициации соматического эмбриогенеза является появление лидирующего зародыша, после чего формирования эмбриогенных клеточных линий не наблюдали (табл. ~~1~~). Продолжительность периода компетентности незрелых зиготических зародышей *P. sibirica* к инициации соматического эмбриогенеза составила одну неделю, что, возможно отражает продолжительность периода в развитии между кливажным расщеплением и проявлением доминантного зародыша. Природа и механизмы супрессии субдоминантных зародышей продолжают оставаться предметом исследований [Filonova *et al.* 2001; Vuosku *et al.* 2009].

В большинстве работ по инициации соматического эмбриогенеза хвойных период между отбором эксплантов составляет одну неделю [Lara-Chavaz *et al.* 2011; Montalbán *et al.* 2012; Ershova *et al.* 2025]. Наши исследования показали, что у *P. sibirica* в течении 7 сут происходят значительные эмбриологические события, и для отбора эксплантов в наиболее благоприятный для инициации соматического эмбриогенеза период необходим тщательный мониторинг стадий развития. Возможно, что отмеченные многими авторами вариации эффективности инициации соматического эмбриогенеза представителей р. *Pinus* по годам [Klimaszewska *et al.* 2001; Kim, Moon 2014] в значительной мере обусловлены разной скоростью прохождения процессов развития зиготических зародышей, в связи с текущими погодными условиями. Соответственно, точная привязка наблюдений к процессу оплодотворения позволит определить оптимальные сроки введения в культуру зиготических зародышей для инициации соматического эмбриогенеза.

ВЫВОДЫ:

Частота инициации соматического эмбриогенеза у *P. sibirica* может быть повышена отбором эксплантов в оптимальной фазе развития.

Максимальный выход эмбрионально-суспензорной массы получен от эксплантов на посткливажной стадии развития зиготического зародыша.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках базового проекта «Биоразнообразие лесов Сибири: эколого-динамический, генетико-селекционный, физико-химический и ресурсно-технологический аспекты» (2024–2026 гг.) FWES-2024-0028. Регистрационный номер НИОКТР 124012900557-0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бородинцева Л.И., Тараканов В.В., Гончарова Т.В. (**2023**) Продуктивность и качество семян кедра сибирского на лесосеменных объектах в республике Алтай // *Сибирский лесной журнал*. (4): 52–57. https://doi.org/10.15372/SJFS20230405

Васильева Г.В., Жук Е.А., Попов А.Г. (**2010**) Фенология цветения кедра сибирского (*Pinus sibirica* du tour), кедрового стланика (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) и гибридов между ними // *Вестник Томского государственного университета. Биология*. (1(9)): 61–67.

Горошкевич С.Н. (**2000**) Селекция кедра сибирского как орехоплодной породы // *Лесное хозяйство*. (4): 25–27.

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

Третьякова И.Н. (**1990**) Эмбриология хвойных: физиологические аспекты. Наука. Сиб. отд-ние. Новосибирск: 157.

Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В. (**2014**) Особенности инициации эмбриоидов из мегагаметофитов *Pinus sibirica* в культуре *in vitro* // *Онтогенез*. **45**(2): 112.

Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Шуваев Д.Н., Лукина А.С. (**2013**) Образование каллуса и индукция соматических зародышей в культуре *in vitro* у *Pinus sibirica* Du Tour // *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*. **6**(1): 44–60.

Третьякова И.Н., Новоселова Н.В. (**2003**) Особенности развития мегагаметофитов и зародышей сосны кедровой сибирской в культуре *in vitro* // *Онтогенез*. **34**(4): 282–291.

Шуклина А.С., Третьякова И.Н. (**2019**) Соматический эмбриогенез видов рода *Pinus* в культуре *in vitro* // *Успехи современной биологии*. **139**(2): 184–195. https://doi.org/10.1134/S004213241902008X

Arya S., Kalia R.K., Arya I.D. (**2000**) Induction of somatic embryogenesis in *Pinus roxburghii* Sarg // *Plant Cell Reports*. **19**: 775–780.

Becwar M.R., Wann S.R., Johnson M.A., Verhagen S.A., Feirer R.P., Nagmani R. (**1988**) Development and Characterization of in Vitro Embryogenic Systems in Conifers // *In: Ahuja M.R. (ed.) Somatic Cell Genetics of Woody Plants: Proceedings of the IUFRO Working Party S2. 04–07 Somatic Cell Genetics, held in Grosshansdorf, Federal Republic of Germany, August 10–13, 1987.* Springer Netherlands. Dordrecht: 1–18. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2811-4_1

Bonga J.M., Klimaszewska K.K., von Aderkas P. (**2010**) Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. **100**(3): 241–254. https://doi.org/10.1007/s11240-009-9647-2

Buchholz J.T. (**1926**) Origin of cleavage polyembryony in conifers // *Botanical Gazette*. **81**(1): 55–71.

Cairney J., Pullman G.S. (**2007**) The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis // *New Phytologist*. **176**(3): 511–536. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02239.x

Castander-Olarieta A., Moncaleán P., Montalbán I.A. (**2022**) Somatic Embryogenesis in Pines // *In: Ramírez-Mosqueda M.A. (ed.) Somatic Embryogenesis: Methods and Protocols*. Humana. New York, NY: 41–56. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2485-2_4

Dogra P.D. (**1978**) Morphology, development and nomenclature of conifer embryo // *Phytomorphology*. **28**(7): 307–322.

Doyle J. (**1961**) Proembryogeny in Pinus in relation to that in other conifers: a survey // *Proceedings of the Royal Irish Academy. Section B: Biological, Geological, and Chemical Science*. **62**: 181–216.

Ershova M.A., Ignatenko R.V., Chirva O.V. (**2025**) The state of the explant as a key factor influencing the initiation of *Pinus sylvestris* L. somatic embryogenesis // *Plant Biotechnology Reports*. **19**(1): 29–41. https://doi.org/10.1007/s11816-024-00947-9

Fehér A., Bernula D., Gémes K. (**2016**) The Many Ways of Somatic Embryo Initiation // *In: Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds.) Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Springer International Publishing. Cham: 23–37. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_3

Fei Q., Chen Y.-M., Ke X., Ye J.-R., Zhu L.-H. (**2024**) Somatic embryogenesis of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.): initiation, maturation, germination and mycorrhization of regenerated plantlets // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. **157**(3): 65. https://doi.org/10.1007/s11240-024-02789-3

Filonova L.H., Bozhkov P. V., Brukhin V.B., Daniel G., Zhivotovsky B., Arnold S. von (**2000**) Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce // *Journal of Cell Science*. **113**(24): 4399–4411. https://doi.org/10.1242/jcs.113.24.4399

Gao F., Peng C., Wang H., Tretyakova I.N., Nosov A.M., Shen H., Yang L. (**2020**) Key Techniques for Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of *Pinus koraiensis* // *Forests*. **11**(9): 912. https://doi.org/10.3390/f11090912

García-Mendiguren O., Montalbán I.A., Goicoa T., Ugarte M.D., Moncaleán P. (**2016**) Environmental conditions at the initial stages of *Pinus radiata* somatic embryogenesis affect the production of somatic embryos // *Trees*. **30**(3): 949–958. https://doi.org/10.1007/s00468-015-1336-7

Gupta P.K., Durzan D.J. (**1987**) Biotechnology of Somatic Polyembryogenesis and Plantlet Regeneration in Loblolly Pine // *Nature Biotechnology*. **5**(2): 147–151. https://doi.org/10.1038/nbt0287-147

Hazubska-Przybył T., Wawrzyniak M.K., Kijowska-Oberc J., Staszak A.M., Ratajczak E. (**2022**) Somatic Embryogenesis of Norway Spruce and Scots Pine: Possibility of Application in Modern Forestry // *Forests*. **13**(2): 155. https://doi.org/10.3390/f13020155

Ignatenko R. V., Chirva O. V., Ershova M.A., Galibina N.A. (**2022**) Some Problems Arising during the Initiation of Somatic Embryogenesis in *Pinus sylvestris* L. // *The 3rd International Electronic Conference on Forests - Exploring New Discoveries and New Directions in Forests*. November 1, 2022. MDPI. Basel Switzerland: 48. https://doi.org/10.3390/IECF2022-13364

Kim Y.-W., Moon H.-K. (**2014**) Relationship between initiation of embryogenic suspensor mass (ESM) and zygotic embryo development in *Pinus densiflora* // *Forest Science and Technology*. **10**(3): 166–171. https://doi.org/10.1080/21580103.2014.889611

Klimaszewska K., Park Y.-S., Overton C., Maceacheron I., Bonga J.M. (**2001**) Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. // *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. **37**(3): 392–399. https://doi.org/10.1007/s11627-001-0069-z

Koski V. (**1971**) Embryonic lethals of *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. // *Communicationes Instituti Forestalis Fenniae*. **75**(3): 1–30.

Lara-Chavez A., Flinn B.S., Egertsdotter U. (**2011**) Initiation of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of Oocarpa pine (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schlectendal) // *Tree Physiology*. **31**(12): 1422–1422. https://doi.org/10.1093/treephys/tpr126

Lelu-Walter M.-A., Klimaszewska K., Miguel C., Aronen T., Hargreaves C., Teyssier C., Trontin J.-F. (**2016**) Somatic Embryogenesis for More Effective Breeding and Deployment of Improved Varieties in *Pinus* spp.: Bottlenecks and Recent Advances // *In: Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds.) Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Springer International Publishing. Cham: 319–365. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_19

Montalbán I.A., Castander-Olarieta A., Pereira C., Canhoto J., Moncaleán P. (**2020**) Use of Biotechnology in Forestry Breeding Programs for Natural Resources and Biodiversity Conservation: Creating Super Trees for the Future // *In: Chong P., Newman D., Steinmacher D. (eds.) Agricultural, Forestry and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery*. Springer International Publishing. Cham: 103–115. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51358-0_6

Montalbán I.A., De Diego N., Moncaleán P. (**2012**) Enhancing initiation and proliferation in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) somatic embryogenesis through seed family screening, zygotic embryo staging and media adjustments // *Acta Physiologiae Plantarum*. **34**(2): 451–460. https://doi.org/10.1007/s11738-011-0841-6

Novikova S. V., Oreshkova N. V., Sharov V. V., Kuzmin D.A., Demidko D.A., Bisirova E.M., Zhirnova D.F., Belokopytova L. V., Babushkina E.A., Krutovsky K. V. (**2024**) Study of the Genetic Mechanisms of Siberian Stone Pine (*Pinus* sibirica Du Tour) Adaptation to the Climatic and Pest Outbreak Stresses Using Dendrogenomic Approach // *International Journal of Molecular Sciences*. **25**(21): 11767. https://doi.org/10.3390/ijms252111767

Owens J.N., Simpson S.J., Molder M. (**1982**) Sexual reproduction of *Pinus contorta*. II. Postdormancy ovule, embryo, and seed development // *Canadian Journal of Botany*. **60**(10): 2071–2083. https://doi.org/10.1139/b82-254

Park Y.-S., Beaulieu J., Bousquet J. (**2016**) Multi-varietal forestry integrating genomic selection and somatic embryogenesis // *In: Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. (eds.) Vegetative propagation of forest trees*. National Institute of Forest Science (NiFos) Seoul.: 302–322.

Pullman G.S. (**2018**) Embryogenic Tissue Initiation in Loblolly Pine (*Pinus Taeda* L.) // *In: Jain S., Gupta P. (eds.) Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Forestry Sciences, vol 84*. Cham: 13–31. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6_2

Pullman G.S., Webb D.T. (**1994**) An embryo staging system for comparison of zygotic and somatic embryo development // *TAPPI R&D Division biological sciences symposium*. October 3, 1994. Minneapolis: 31–34.

Ramírez-Mosqueda M.A. (**2022**) Perspectives of Somatic Embryogenesis: Concluding Remarks // *In: Ramírez-Mosqueda M.A. (ed.) Somatic Embryogenesis. Methods in Molecular Biology, vol 2527*. Humana. New York, NY: 267–270. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2485-2_19

Singh H. (**1981**) Embryology of gymnosperms. Encyclopedia of plant anatomy XII // Gebr. Borntraeger. Berlin: 302.

Skinner D.R. (**1992**) Ovule and embryo development, seed production and germination in orchard grown control pollinated loblolly pine (*Pinus taeda* L.) from coastal South Carolina // University of Victoria. Victoria, BC, Canada: 89. [Master of Science Thesis]

Velisevich S., Popov A. (**2024**) Climate warming disturbances periodicity of Siberian stone pine seed production (*Pinus sibirica* Du Tour) // *BIO Web of Conferences*. **130**: 01018. https://doi.org/10.1051/bioconf/202413001018

Von Arnold S., Clapham D., Abrahamsson M. (**2019**) Chapter Five - Embryology in conifers // *In: Cánovas F.M. (ed.) Advances in Botanical Research*. Academic Press. Málaga, Spain: 157–184. https://doi.org/10.1016/bs.abr.2018.11.005

Vuosku J., Sutela S., Tillman-Sutela E., Kauppi A., Jokela A., Sarjala T., Häggman H. (**2009**) Pine embryogenesis: many licences to kill for a new life // *Plant signaling & behavior*. **4**(10): 928–932.

Williams C.G. (**2008**) Selfed embryo death in *Pinus taeda*: a phenotypic profile // *New Phytologist*. **178**(1): 210–222.

Williams C.G. (**2009**) Conifer reproductive biology // Springer. Dordrecht: 170. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9602-0

Zhao H., Zhang J., Zhao J., Niu S. (**2024**) Genetic transformation in conifers: current status and future prospects // *Forestry Research*. **4**(1): e010. https://doi.org/10.48130/forres-0024-0007

Zhu T., Wang J., Hu J., Ling J. (**2022**) Mini review: Application of the somatic embryogenesis technique in conifer species // *Forestry Research*. **2**: 18. https://doi.org/10.48130/FR-2022-0018

REFERECES

Borodintseva L.I., Tarakanov V.V., Goncharova T.V. (**2023**) Productivity and quality of seeds of the siberian stone pine on forest seed orchards in the republic of Altai // *Siberian Forest Journal*. (4): 52–57. https://doi.org/10.15372/SJFS20230405 (in Rus.)

Vasilieva G.V., Zhuk E.A., Popov A.G. (**2010**) Flowering phenology of the Siberian stone pine (*Pinus sibirica* Du Tour), Japanese stone pine (*Pinus pumila* (Pall.) Regel.) and their hybrids // *Tomsk State University Journal. Biology*. (1(9)): 61–67. (in Rus.)

Goroshkevich S.N. (**2000**) Breeding of Siberian cedar as a nut-bearing breed // *Forestry*. (4): 25–27.

Kruglova N.N., Egorova O.V., Seldimirova O.A., Zaitsev D.Yu., Zinnatullina A.E. (**2013**) The light microscope as a tool in plant biotechnology. Gilem. Ufa: 128. (in Rus.)

Tretyakova I.N. (**1990**) Embryology of conifers: physiological aspects. Nauka Publ. Novosibirsk: 157. (in Rus.)

Tretyakova I.N., Voroshilova E.V. (**2014**) Embryo initiation from *Pinus sibirica* megagametophytes *in vitro* culture // *Russian Journal of Developmental Biology*. **45**(2): 93-100. https://doi.org/10.1134/S1062360414020064

Tretyakova I.N., Voroshilova E.V., Shuvaev D.N., Lukina A.S. (**2013**) Formation of Callus and Induction of Somatic Embryos in vitro Culture in *Pinus sibirica* du Tour // *Journal of Siberian Federal University. Biology*. **6**(1): 44–60. (in Rus.)

Tretyakova I.N., Novoselova N.V. (**2003**) Specific features of development of megagametophytes and embryos of the Siberian stone pine *in vitro* // *Ontogenez*. **34**(4): 282–291. (in Rus.)

Shuklina A.S., Tretyakova I.N. (**2019**) Somatic embryogenesis of species of the genus *Pinus* in culture *in vitro* // *The successes of modern biology*. **139**(2): 184–195. https://doi.org/10.1134/S004213241902008X (in Rus.)

Arya S., Kalia R.K., Arya I.D. (**2000**) Induction of somatic embryogenesis in *Pinus roxburghii* Sarg // *Plant Cell Reports*. **19**: 775–780.

Becwar M.R., Wann S.R., Johnson M.A., Verhagen S.A., Feirer R.P., Nagmani R. (**1988**) Development and Characterization of in Vitro Embryogenic Systems in Conifers // *In: Ahuja M.R. (ed.) Somatic Cell Genetics of Woody Plants: Proceedings of the IUFRO Working Party S2. 04–07 Somatic Cell Genetics, held in Grosshansdorf, Federal Republic of Germany, August 10–13, 1987*. Springer Netherlands. Dordrecht: 1–18. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2811-4_1

Bonga J.M., Klimaszewska K.K., von Aderkas P. (**2010**) Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. **100**(3): 241–254. https://doi.org/10.1007/s11240-009-9647-2

Buchholz J.T. (**1926**) Origin of cleavage polyembryony in conifers // *Botanical Gazette*. **81**(1): 55–71.

Cairney J., Pullman G.S. (**2007**) The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis // *New Phytologist*. **176**(3): 511–536. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02239.x

Castander-Olarieta A., Moncaleán P., Montalbán I.A. (**2022**) Somatic Embryogenesis in Pines // *In: Ramírez-Mosqueda M.A. (ed.) Somatic Embryogenesis: Methods and Protocols*. Humana. New York, NY: 41–56. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2485-2_4

Dogra P.D. (**1978**) Morphology, development and nomenclature of conifer embryo // *Phytomorphology*. **28**(7): 307–322.

Doyle J. (**1961**) Proembryogeny in Pinus in relation to that in other conifers: a survey // *Proceedings of the Royal Irish Academy. Section B: Biological, Geological, and Chemical Science*. **62**: 181–216.

Ershova M.A., Ignatenko R.V., Chirva O.V. (**2025**) The state of the explant as a key factor influencing the initiation of *Pinus sylvestris* L. somatic embryogenesis // *Plant Biotechnology Reports*. **19**(1): 29–41. https://doi.org/10.1007/s11816-024-00947-9

Fehér A., Bernula D., Gémes K. (**2016**) The Many Ways of Somatic Embryo Initiation // *In: Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds.) Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects*

and Applications. Springer International Publishing. Cham: 23–37. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_3

Fei Q., Chen Y.-M., Ke X., Ye J.-R., Zhu L.-H. (**2024**) Somatic embryogenesis of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.): initiation, maturation, germination and mycorrhization of regenerated plantlets // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. **157**(3): 65. https://doi.org/10.1007/s11240-024-02789-3

Filonova L.H., Bozhkov P. V., Brukhin V.B., Daniel G., Zhivotovsky B., Arnold S. von (**2000**) Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce // *Journal of Cell Science*. **113**(24): 4399–4411. https://doi.org/10.1242/jcs.113.24.4399

Gao F., Peng C., Wang H., Tretyakova I.N., Nosov A.M., Shen H., Yang L. (**2020**) Key Techniques for Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of *Pinus koraiensis* // *Forests*. **11**(9): 912. https://doi.org/10.3390/f11090912

García-Mendiguren O., Montalbán I.A., Goicoa T., Ugarte M.D., Moncaleán P. (**2016**) Environmental conditions at the initial stages of *Pinus radiata* somatic embryogenesis affect the production of somatic embryos // *Trees*. **30**(3): 949–958. https://doi.org/10.1007/s00468-015-1336-7

Gupta P.K., Durzan D.J. (**1987**) Biotechnology of Somatic Polyembryogenesis and Plantlet Regeneration in Loblolly Pine // *Nature Biotechnology*. **5**(2): 147–151. https://doi.org/10.1038/nbt0287-147

Hazubska-Przybył T., Wawrzyniak M.K., Kijowska-Oberc J., Staszak A.M., Ratajczak E. (**2022**) Somatic Embryogenesis of Norway Spruce and Scots Pine: Possibility of Application in Modern Forestry // *Forests*. **13**(2): 155. https://doi.org/10.3390/f13020155

Ignatenko R. V., Chirva O. V., Ershova M.A., Galibina N.A. (**2022**) Some Problems Arising during the Initiation of Somatic Embryogenesis in *Pinus sylvestris* L. // *The 3rd International Electronic Conference on Forests - Exploring New Discoveries and New Directions in Forests*. November 1, 2022. MDPI. Basel Switzerland: 48. https://doi.org/10.3390/IECF2022-13364

Kim Y.-W., Moon H.-K. (**2014**) Relationship between initiation of embryogenic suspensor mass (ESM) and zygotic embryo development in *Pinus densiflora* // *Forest Science and Technology*. **10**(3): 166–171. https://doi.org/10.1080/21580103.2014.889611

Klimaszewska K., Park Y.-S., Overton C., Maceacheron I., Bonga J.M. (**2001**) Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. // *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. **37**(3): 392–399. https://doi.org/10.1007/s11627-001-0069-z

Koski V. (**1971**) Embryonic lethals of *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. // *Communicationes Instituti Forestalis Fenniae*. **75**(3): 1–30.

Lara-Chavez A., Flinn B.S., Egertsdotter U. (**2011**) Initiation of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of Oocarpa pine (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schlectendal) // *Tree Physiology*. **31**(12): 1422–1422. https://doi.org/10.1093/treephys/tpr126

Lelu-Walter M.-A., Klimaszewska K., Miguel C., Aronen T., Hargreaves C., Teyssier C., Trontin J.-F. (**2016**) Somatic Embryogenesis for More Effective Breeding and Deployment of Improved Varieties in *Pinus* spp.: Bottlenecks and Recent Advances // *In: Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds.) Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*.

Springer International Publishing. Cham: 319–365. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_19

Montalbán I.A., Castander-Olarieta A., Pereira C., Canhoto J., Moncaleán P. (**2020**) Use of Biotechnology in Forestry Breeding Programs for Natural Resources and Biodiversity Conservation: Creating Super Trees for the Future // *In: Chong P., Newman D., Steinmacher D. (eds.) Agricultural, Forestry and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery*. Springer International Publishing. Cham: 103–115. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51358-0_6

Montalbán I.A., De Diego N., Moncaleán P. (**2012**) Enhancing initiation and proliferation in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) somatic embryogenesis through seed family screening, zygotic embryo staging and media adjustments // *Acta Physiologiae Plantarum*. **34**(2): 451–460. https://doi.org/10.1007/s11738-011-0841-6

Novikova S. V., Oreshkova N. V., Sharov V. V., Kuzmin D.A., Demidko D.A., Bisirova E.M., Zhirnova D.F., Belokopytova L. V., Babushkina E.A., Krutovsky K. V. (**2024**) Study of the Genetic Mechanisms of Siberian Stone Pine (*Pinus sibirica* Du Tour) Adaptation to the Climatic and Pest Outbreak Stresses Using Dendrogenomic Approach // *International Journal of Molecular Sciences*. **25**(21): 11767. https://doi.org/10.3390/ijms252111767

Owens J.N., Simpson S.J., Molder M. (**1982**) Sexual reproduction of *Pinus contorta*. II. Postdormancy ovule, embryo, and seed development // *Canadian Journal of Botany*. **60**(10): 2071–2083. https://doi.org/10.1139/b82-254

Park Y.-S., Beaulieu J., Bousquet J. (**2016**) Multi-varietal forestry integrating genomic selection and somatic embryogenesis // *In: Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. (eds.) Vegetative propagation of forest trees*. National Institute of Forest Science (NiFos) Seoul.: 302–322.

Pullman G.S. (**2018**) Embryogenic Tissue Initiation in Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) // *In: Jain S., Gupta P. (ред.) Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Forestry Sciences, vol 84*. Cham: 13–31. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6_2

Pullman G.S., Webb D.T. (**1994**) An embryo staging system for comparison of zygotic and somatic embryo development // *TAPPI R&D Division biological sciences symposium*. October 3, 1994. Minneapolis: 31–34.

Ramírez-Mosqueda M.A. (**2022**) Perspectives of Somatic Embryogenesis: Concluding Remarks // *In: Ramírez-Mosqueda M.A. (ed.) Somatic Embryogenesis. Methods in Molecular Biology, vol 2527*. Humana. New York, NY: 267–270. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2485-2_19

Singh H. (**1981**) Embryology of gymnosperms. Encyclopedia of plant anatomy XII. Gebr. Borntraeger. Berlin: 302.

Skinner D.R. (**1992**) Ovule and embryo development, seed production and germination in orchard grown control pollinated loblolly pine (*Pinus taeda* L.) from coastal South Carolina. University of Victoria. Victoria, BC, Canada: 89. [Master of Science Thesis]

Velisevich S., Popov A. (**2024**) Climate warming disturbances periodicity of Siberian stone pine seed production (*Pinus sibirica* Du Tour) // *BIO Web of Conferences*. **130**: 01018. https://doi.org/10.1051/bioconf/202413001018

Von Arnold S., Clapham D., Abrahamsson M. (**2019**) Chapter Five - Embryology in conifers // *In: Cánovas F.M. (ed.) Advances in Botanical Research*. Academic Press. Málaga, Spain: 157–184. https://doi.org/10.1016/bs.abr.2018.11.005

Vuosku J., Sutela S., Tillman-Sutela E., Kauppi A., Jokela A., Sarjala T., Häggman H. (**2009**) Pine embryogenesis: many licences to kill for a new life // *Plant signaling & behavior*. **4**(10): 928–932.

Williams C.G. (**2008**) Selfed embryo death in *Pinus taeda*: a phenotypic profile // *New Phytologist*. **178**(1): 210–222.

Williams C.G. (**2009**) Conifer reproductive biology. Springer. Dordrecht: 170. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9602-0

Zhao H., Zhang J., Zhao J., Niu S. (**2024**) Genetic transformation in conifers: current status and future prospects // *Forestry Research*. **4**(1): e010. https://doi.org/10.48130/forres-0024-0007

Zhu T., Wang J., Hu J., Ling J. (**2022**) Mini review: Application of the somatic embryogenesis technique in conifer species // *Forestry Research*. **2**: 18. https://doi.org/10.48130/FR-2022-0018

Цитировать как
Лукина А.В., Третьякова И.Н. (**2025**) Влияние стадии развития зиготического зародыша на инициацию соматического эмбриогенеза *Pinus sibirica* // *Экобиотех*. **8**(2): 151-164. DOI: 10.31163/2618-964X/2025-12 EDN: HWTYHQ

Cited as
Lukina A.V., Tret'yakova I.N. (**2025**) The effect of the zygotic embryo developmental stage on the initiation of *Pinus sibirica* somatic embryogenesis // *Ecobiotech*. **8**(2): 151-164. DOI: 10.31163/2618-964X/2025-12 EDN: HWTYHQ (In Rus.)

Сведения об авторе

Анастасия Викторовна Лукина, Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия. E-mail: yunnatu@ksc.krasn.ru

Ираида Николаевна Третьякова, д.б.н., Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия. E-mail: culture@ksc.krasn.ru, AuthorID: 84668, ORCID: 0000-0002-2029-5163

Information About the Author

Anastasiya V. Lukina, Sukachev Forest Institute, Siberian Branch, RAS – a separate division of FRC KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russia. E-mail: yunnatu@ksc.krasn.ru

Iraida N. Tret'yakova, Doctor of Biological Sciences, Sukachev Forest Institute, Siberian Branch, RAS – a separate division of FRC KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russia. E-mail: culture@ksc.krasn.ru, AuthorID: 84668, ORCID: 0000-0002-2029-5163