

EDN: LVBAPM

УДК 574.2

## Induction of Somatic Embryogenesis in Siberian Dwarf Pine (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) *in vitro*

Irina S. Sheveleva<sup>\*a</sup>,  
Tamara I. Golovanova<sup>a</sup> and Iraida N. Tretyakova<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Siberian Federal University

<sup>b</sup>V.N. Sukachev Institute of Forest SB RAS  
Krasnoyarsk, Russian Federation

Received 16.06.2022, received in revised form 18.06.2024, accepted 23.06.2024

**Abstract.** Induction and proliferation of embryogenic calluses are the key stages in large-scale reproduction of coniferous species by somatic embryogenesis and long-term storage of their embryos. However, there are some issues, such as low reproduction efficiency, loss of embryogenic ability, poor viability. To solve the problems of somatic embryogenesis in the Siberian dwarf pine (*Pinus pumila* (Pall.) Regel), we aimed to determine the best cultivation conditions by varying the concentrations and combinations of plant growth regulators in the culture medium for inducing embryogenic calluses at different stages of embryo development. Explant response dependence on the stage of its development and the hormonal composition of the nutrient medium was established and optimal conditions for induction of somatic embryogenesis in Siberian dwarf pine were determined. Zygotic embryos with a length of 1 mm (mature embryo) were shown to be the most promising material for induction of *Pinus pumila* callogenesis (85 %). Embryogenic calluses were formed more actively on the DCR medium with reduced concentrations of plant growth regulators, NAA (1 mg/l) and 6-BAP (0.5 and 1 mg/l). Calluses transplanted to fresh media of the same composition every 14 days maintained their viability and sustained their ability to intensively proliferate throughout the year.

**Keywords:** *Pinus pumila*, *in vitro*, Siberian dwarf pine, callus, embryogenic cultures, somatic embryogenesis.

Citation: Sheveleva I. S., Golovanova T. I., Tretyakova I. N. Induction of somatic embryogenesis in Siberian dwarf pine (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) *in vitro*. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(2), 148–159. EDN: LVBAPM



© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: irik1996sheveleva15@mail.ru  
ORCID: 0000-0002-2029-5163 (Tretyakova I.)

## Индукция соматического эмбриогенеза у кедрового стланика (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) в культуре *in vitro*

И. С. Шевелева<sup>а</sup>, Т. И. Голованова<sup>а</sup>, И. Н. Третьякова<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Сибирский федеральный университет

<sup>б</sup>Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН  
Российская Федерация, Красноярск

**Аннотация.** Индукция и пролиферация эмбрионного каллуса являются ключевыми этапами для крупномасштабного размножения путем соматического эмбриогенеза и долгосрочного хранения зародышей хвойных видов. Однако существуют проблемы, такие как низкий отклик эксплантов на индукционных средах, низкая эффективность размножения, слабая жизнеспособность и потеря эмбрионности каллусных культур в процессе культивирования. Для решения проблем соматического эмбриогенеза кедрового стланика (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) мы варьировали концентрацию и комбинации регуляторов роста растений в средах для индукции эмбрионного каллуса у зародышей на разных стадиях развития. Нами была установлена зависимость отклика экспланта от стадии его развития, от гормонального состава питательной среды, определены наилучшие условия культивирования эмбрионного каллуса. Было установлено, что зиготические семядольные зародыши длиной 1 мм являются наиболее перспективным материалом для индукции каллусогенеза у *P. pumila* (85 %). Эмбрионный каллус активнее образовывался на среде DCR с пониженной концентрацией регуляторов роста растений NAA (1 мг/л) и 6-BAР (0,5 и 1 мг/л). Пересадки на свежие среды того же состава каждые 14 дней позволяли не только поддерживать жизнеспособность каллусов, но также сохранять их способность к интенсивной пролиферации в течение года.

**Ключевые слова:** *Pinus pumila*, *in vitro*, кедровый стланик, каллус, эмбрионные культуры, соматический эмбриогенез.

Цитирование: Шевелева И. С. Индукция соматического эмбриогенеза у кедрового стланика (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) в культуре *in vitro* / И. С. Шевелева, Т. И. Голованова, И. Н. Третьякова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(2). С. 148–159. EDN: LVBAPM

### Введение

Кедровый стланик (*Pinus pumila* (Pall.) Regel), относящийся к пятихвойным соснам, произрастает на северо-востоке Сибири и занимает обширный ареал от северного Прибайкалья до полуострова Камчатка. Данный вид имеет большое экологическое и хозяйственное значение. Его заросли играют важную фитоценотическую и ландшафтную

роль. Семена кедрового стланика являются одним из главных пищевых ресурсов для птиц и животных.

Семеношение, генетическая изменчивость и рост потомства *P. pumila* в сравнении его с *Pinus sibirica* в Северном Прибайкалье, дельте Верхней Ангары и Баргузинском заповеднике изучались С. Н. Горошкевичем и его сотрудниками (Васильева, Горошкевич,

2012; Петрова и др., 2007). В процессе развития семян кедрового стланика наблюдаются некоторые потери и снижение семенной продуктивности. Доля полноценных семян с дифференцированным зародышем варьируется в широких пределах (Васильева, Горошкевич, 2012).

Известно, что развитие семян кедрового стланика, так же как и других видов рода *Pinus*, осуществляется в течение двух вегетационных периодов, а зрелые семена имеют недоразвитый зародыш и требуют длительной стратификации (около 4 месяцев), поэтому традиционные методы размножения могут не соответствовать требованиям искусственного лесонасаждения (Song et al., 2020; Li et al., 2020).

Для осуществления крупномасштабной селекции кедрового стланика необходима разработка и применение современных технологий. Одной из таких технологий является метод микроклонального размножения через соматический эмбриогенез (Tret'yakova et al., 2016; Третьякова и др., 2021). Соматический эмбриогенез стал главным способом для вегетативного размножения хвойных, поскольку соматические эмбрионы развиваются как апикальную, так и корневую меристему (Lelu-Walter et al., 2018). Эмбриогенный каллус является основой для регенерации растений в больших масштабах и служит важным материалом для генетической трансформации (Zeng et al., 2007; Yang, Zhang, 2010; Santa-Catarina et al., 2012; Steiner et al., 2016). По этой причине основным шагом для соматического эмбриогенеза является получение достаточного количества каллусных культур высокого качества (Gao et al., 2021). Главными факторами, влияющими на индукцию и пролиферацию эмбриогенного каллуса, являются состав питательной среды, температура, субкультурный цикл и генетический потенциал

экспланта (Song et al., 2020). Для получения индукции, для поддержания (maintaining) и пролиферации эмбриогенного каллуса хвойных растений используются различные комбинации фитогормонов ауксинов и цитокининов (Vondráková et al., 2011; Klimaszewska et al., 2016; Nunes et al., 2018).

Соматический эмбриогенез у кедрового стланика (*P. pumila*) в культуре *in vitro* исследован недостаточно. В эксперименте по инициации соматического эмбриогенеза у кедрового стланика из незрелых эмбрионов (Tret'yakova, Shuvaev, 2015) полученный каллус обладал низкой эмбриогенностью и не мог быть культивирован для дальнейших шагов соматического эмбриогенеза. В настоящей статье представлены данные эксперимента по получению эмбриогенного каллуса у кедрового стланика на средах для индукции соматического эмбриогенеза в культуре зиготических зародышей. В ходе эксперимента решались задачи по выявлению наиболее отзывчивой стадии развития зиготического зародыша и подбор оптимального состава среды, концентрации и комбинации регуляторов роста для получения и пролиферации эмбриогенных культур.

## Материалы и методы

В 2020–2021 гг. с 25 деревьев *P. pumila*, произрастающих на севере Иркутской области (Бодайбинский район) (58°12'28" с.ш. 114°38'45" в.д.) и Чукотского автономного округа (66°33'48" с.ш. 164°27'44" в.д.), были собраны образцы – женские шишки (по 10 шт. с каждого дерева), которые до введения в культуру хранились при температуре 4±1 °С в условиях холодильной камеры. Сбор образцов шишек проводили в разные сроки по мере их созревания, с июля (первая и вторая-третья декады) по август (первая декада). Степень зрелости зародыша фиксировали при извле-

чении его из мегагаметофита, определяя стадии развития: стадия инициации семядолей (размер зародыша 0,3 мм), развития семядолей (размер зародыша 0,7 мм) и зрелого зародыша (размер зародыша 1 мм).

До извлечения эксплантов образцы подвергали предобработке. Шишки обрабатывали 5 %-ным раствором гипохлорита натрия около 20 минут, затем промывали дистиллированной водой в течение 10 минут. У семян удаляли семенную чешую, далее извлеченные мегагаметофиты обрабатывали 75 % спиртом в течение 5 минут и три раза дистиллированной водой по 15 минут. Затем в стерильных условиях бокса извлекали зародыши из мегагаметофитов и переносили на питательную среду в колбы по 5 штук в каждую.

Для индукции эмбрионного каллуса из зародышей *P. pumila* использовали базовую среду DCR (Gupta, Durzan, 1985) с различными концентрациями и комбинациями регуляторов роста растений: дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D) / 1-нафталинуксусная кислота (NAA) и 6-бензиладенин (BAP) (табл. 1). Все варианты среды были дополнены мезоинозитом – 100 мг/л, гидролизатом казеина – 500–1000 мг/л, L-глутамином – 500 мг/л, сахарозой – 30 г/л и агаром – 7 г/л. В качестве антиоксиданта применяли аскорбиновую кислоту в концентрации 400 мг/л. Перед автоклавированием pH доводили до 5,8

с помощью NaOH или HCl. Спустя месяц культивирования полученные каллусы переносились на питательные среды для этапа пролиферации. Для пролиферации каллусов использовали те же варианты питательной среды, что и для индукции. Культуры помещали в темноту при температуре  $24 \pm 1$  °C. Субкультивирование на свежие питательные среды, описание культур и регистрацию частоты каллусообразования проводили каждые 14 дней. Первичный отклик (образование первичного каллуса, возникшего на эксплантах) регистрировали через 4 недели после введения в культуру. Частоту каллусообразования рассчитывали по формуле:  $A = (n / N) * 100$  %, где A – частота каллусообразования, n – количество эксплантов, давших каллус, N – общее число эксплантов. Для проведения цитологического анализа полученных клеточных линий готовили давленные микропрепараты. Образцы каллусов фиксировали каждые две недели. Кусочки ткани размещали на предметном стекле и окрашивали в капле 2 %-ного водного раствора сафранина в течение 1–2 минут. Далее добавляли глицерин и фиксировали препарат покровным стеклом, излишки красителя удаляли фильтровальной бумагой. Приготовленные микропрепараты просматривали под микроскопом МИК-МЕД-6 ЛОМО (Санкт-Петербург, Россия) с видеонасадкой DSM510. Отмечали мор-

Таблица 1. Варианты содержания регуляторов роста растений в питательной среде

Table 1. Plant growth regulator contents in nutrient media

Питательная среда	Регуляторы роста растений, мг/л		
	2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D)	1-нафталинуксусная кислота (NAA)	6-бензиладенин (BAP)
DCR 1	2	-	1
DCR 2	-	2	1
DCR 3	-	1	1
DCR 4	-	1	0,5

фологические типы клеток. Размеры клеток определяли при помощи окуляр-микрометра с последующим переводом полученных единиц в мкм. Эмбриогенность каллусов устанавливали по наличию в них эмбриогенных структур. Известно, что эмбриогенные каллусы имеют рыхлую структуру, молочный прозрачный цвет, способны к активному образованию эмбриогенной массы, быстрому росту. Ранее проведенные исследования показали, что в процессе формирования эмбриогенных каллусов у хвойных клетки эксплантов, подвергшихся влиянию регуляторов роста, удлинялись и в дальнейшем претерпевали асимметричное деление и формировали эмбриональные инициалы и эмбриональные трубки. Из инициальных клеток образовывались глобулы соматических зародышей, а из эмбриональных трубок формировались сложные вытянутые структуры с множественными перегородками. Каждая глобула окружалась множественными эмбриональными трубками. Формировалась эмбриональная масса, состоящая из глобул соматических зародышей и эмбриогенных трубок – суспензоров. Эмбриональные глобулы подвергались кливажу. В единичных каллусах возникали торпедообразные соматические зародыши (Belorussova, Tret'yakova, 2008; Третьякова, Ижболдина 2009).

## Результаты

Как показали исследования, на индукцию образования каллуса значительное влияние оказывала стадия развития экспланта – зиготического зародыша, которая зависела от срока сбора семян (рис. 1). Так, у зародышей на стадии инициации семядолей (размер 0,3 мм), имеющих очень длинный суспензор (сбор с 1 по 10 июля, рис. 1А), образование каллуса не происходило. Образование каллуса наблюдалось у зародышей

из семян, собранных с 15 по 23 июля (в 40 % случаев). В этот период зародыши достигали размера 0,7 мм, находились на стадии развития семядолей и были дифференцированы по продольной оси на две апикальные меристемы (рис. 1В). Наибольшая частота каллусообразования (85 %) отмечена при введении в культуру *in vitro* семядольных зародышей размером около 1 мм (дата сбора 30.07–7.08) (рис. 1С).

Образование и пролиферация каллусной массы зависела от концентрации регуляторов роста растений в питательных средах. На среде DCR 1 образование каллуса наблюдалось только у 15 % эксплантов, на среде DCR 2 частота образования каллуса была около 40 %, на средах DCR 3 и DCR 4 – 80 % и 87 % соответственно (табл. 2).

Эмбриогенный каллус образовывался только на средах DCR 3 и DCR 4. Полученный каллус отличался активным ростом, был прозрачного цвета, имел рыхлую структуру и сохранял эмбриогенные характеристики (табл. 2, рис. 2А) в течение 6 месяцев. На средах DCR 1 и DCR 2 эмбриогенность каллуса отсутствовала (табл. 2). Каллус, образованный на среде DCR 2 (табл. 2), быстро пролиферировал, однако через 60 дней приобретал бурый цвет и деградировал (рис. 2В). После удаления некротирующих участков каллус приобретал плотную структуру, характеризовался медленным ростом и постепенно деградировал (табл. 2). На среде DCR 1 каллус имел низкий уровень пролиферации, приобретал окраску бурого цвета и быстро деградировал (табл. 2, рис. 2С).

Цитологический анализ показал, что каллусные культуры, полученные на питательных средах с различным составом регуляторов роста растений, состояли из клеток разных морфологических типов. В плотных каллусах просматривались изодиаметриче-

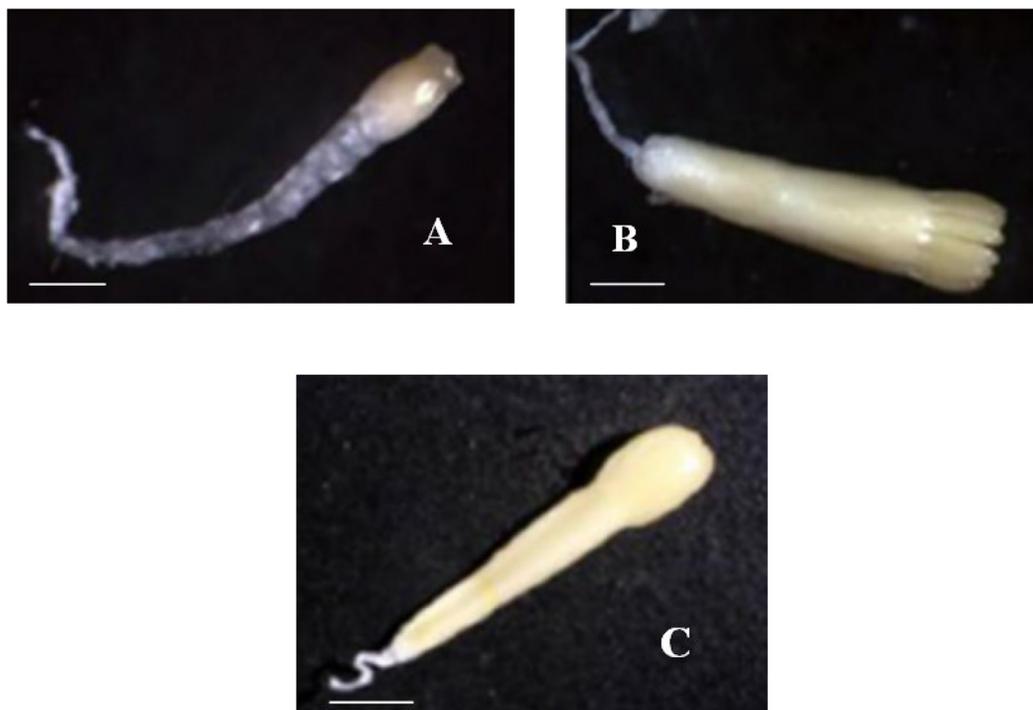


Рис. 1. Зиготические зародыши *Pinus pumila*, собранные в разные даты: А – зародыш на стадии инициации семядолей, длина 0,3 мм, дата сбора 1.07–10.07; В – зародыш на стадии развития семядолей, длина 0,7 мм, дата сбора 15.07–23.07; С – семядольный зародыш, длина 1 мм, дата сбора 30.07–7.08. Масштаб 200 мкм

Fig. 1. Zygotic embryos of *Pinus pumila* collected between different days: А – 0.3 mm long embryo (collected 1.07–10.07); В – 0.7 mm long embryo (collected 15.07–23.07); С – 1 mm long embryo (collected 30.07–7.08). Bar lengths correspond to 200  $\mu$ m

Таблица 2. Индукция, пролиферация и эмбриогенность каллусных культур *Pinus pumila*

Table 2. Induction, proliferation and embryogenic yield of *Pinus pumila* callus cultures

Питательная среда	Дата введения в культуру <i>in vitro</i>	Число эксплантов, введенных в культуру (шт.)	Первичный отклик (%)	Сохранность каллусов через 6 мес. культивирования (%)	Частота формирования эмбриогенных культур (%)
DCR 1	17.08–30.08	200	15	0	0
DCR 2	17.08–30.08	200	40	15	0
DCR 3	17.08–30.08	200	80	35	1
DCR 4	17.08–30.08	200	87	50	2

ские клетки диаметром  $100 \pm 3$  мкм (рис. 3А). Рыхлые каллусы состояли в основном из прозенхимных клеток, достигающих в длину  $300 \pm 3$  мкм (рис. 3В), однородных, без каких-либо признаков дифференциации. Далее начиналось активное удлинение этих клеток,

они становились похожи на эмбриональные трубки первичного суспензора зиготического зародыша (рис. 3В). Эти клетки подвергались асимметричному делению и образовывали две клетки: одну маленькую – эмбриональную, другую длинную – эмбриональную

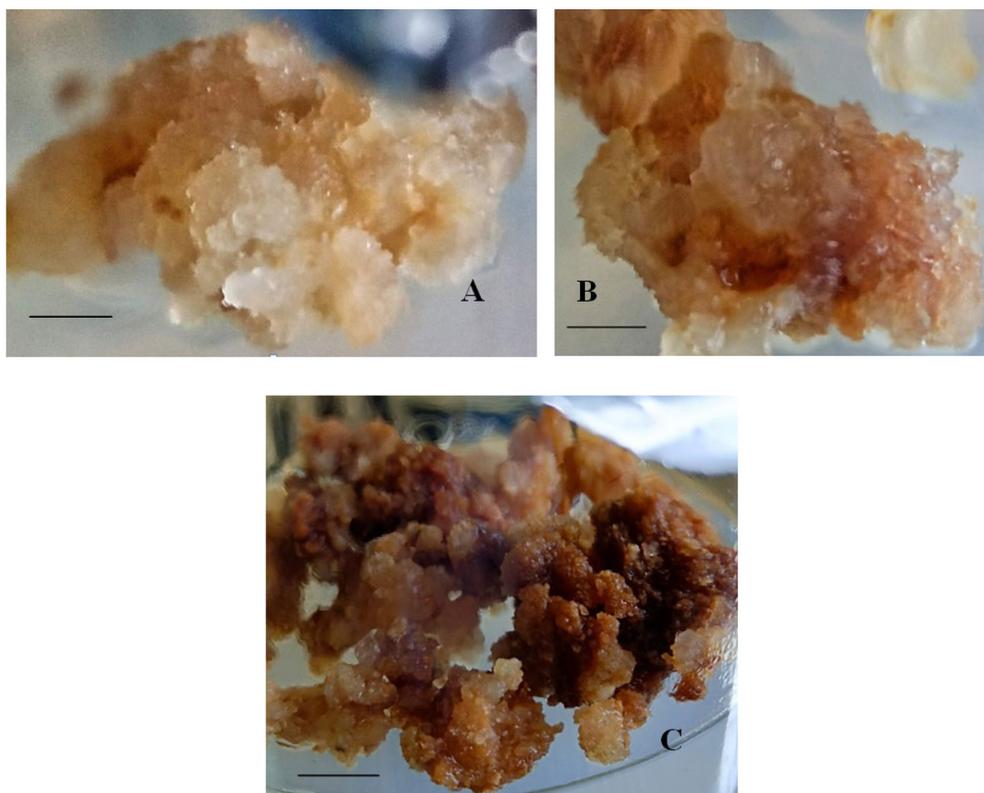


Рис. 2. Каллусы *Pinus pumila* на средах с различными концентрациями и комбинациями регуляторов роста растений: А – на среде DCR 4; В – на среде DCR 2; С – на среде DCR 1. Масштаб 1 см

Fig. 2. *Pinus pumila* calluses on media with various combinations of plant growth regulators: А – DCR 4 medium; В – DCR 2 medium; С – DCR 1 medium. Bar lengths correspond to 1 cm

трубку. Оба типа клеток активно делились, формируя эмбриональные глобулы (рис. 3С), которые окружены длинными клетками. К концу инициации эмбриогенный каллус представлял собой эмбрионально– суспензорную массу, состоящую из эмбриональных глобул и трубок.

### Обсуждение

Индукция соматического эмбриогенеза была описана у некоторых пятихвойных сосен: *Pinus koraiensis* (Bozhkov et al., 1997), *P. pinea* (Carneros et al., 2009), *P. sibirica* (Tret'yakova et al., 2014), *P. pumila* (Tret'yakova, Shuvaev, 2015). Во всех литературных источниках отмечается очень низкая частота инициации эмбриогенного каллуса у пятихвой-

ных сосен, как и у других видов рода *Pinus*. Так, у *P. pumila* из района Удоканского хребта и юга Якутии частота инициации эмбриогенного каллуса составила только 0,3 % (Tret'yakova, Shuvaev, 2015). Исследования, проведенные на *P. strobus*, показали, что для достижения максимальной инициации большое значение имеет стадия развития зиготического зародыша (Klimaszewska et al., 2001). В ходе наших экспериментов мы определили стадии развития зиготических зародышей с наибольшим откликом на состав индукционной среды.

Введение в культуру незрелых зиготических зародышей *P. pumila* на стадии инициации семян (размером 0,3 мм) оказалось неэффективным, частота каллусообразова-

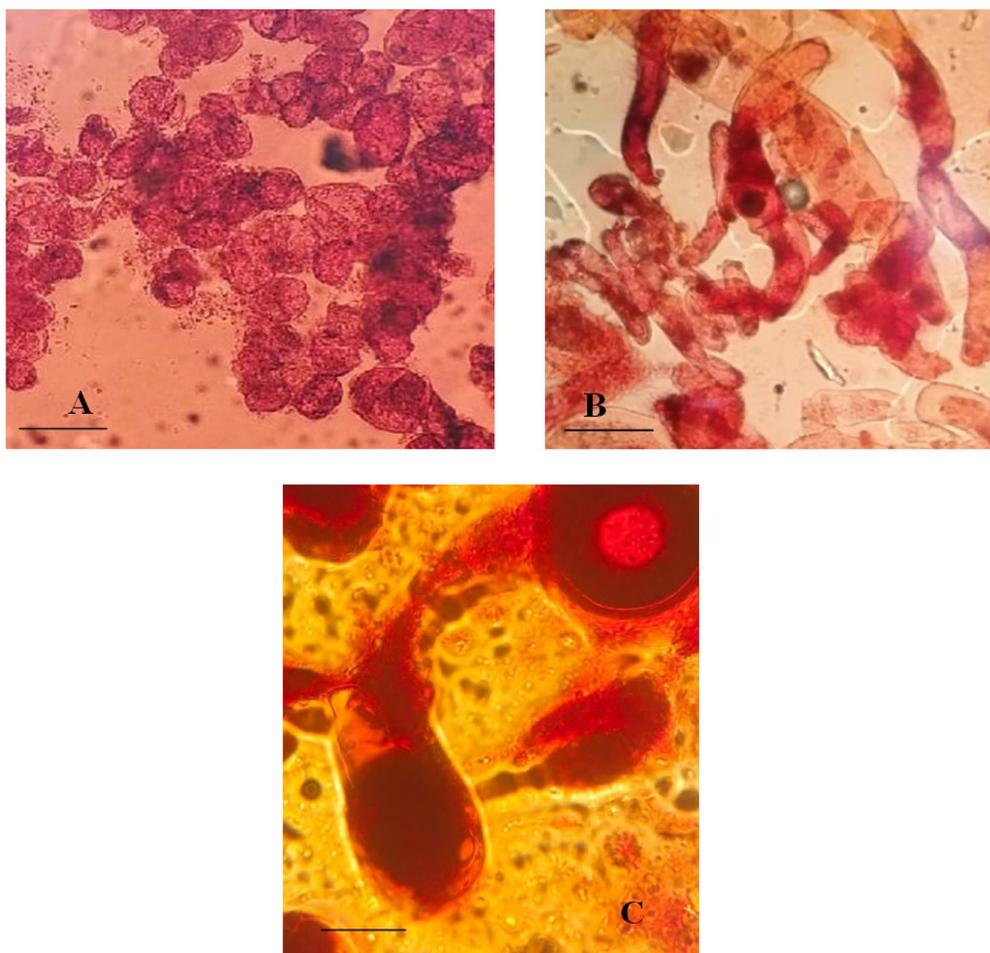


Рис. 3. Морфологические типы клеток в каллусных культурах: А – изодиаметрические клетки, масштаб 50 мкм; В – удлиненные клетки, масштаб 70 мкм; С – эмбриональные глобулы, масштаб 100 мкм

Fig. 3. Morphological types of cells in callus cultures of *Pinus pumila*: A – isodiametric cells, the bar length corresponds to 50  $\mu\text{m}$ ; B – elongated cells, the bar length corresponds to 70  $\mu\text{m}$ ; C – embryonic globules, the bar length corresponds to 100  $\mu\text{m}$

ния была равна нулю. Инициация каллусных культур у зародышей на стадии развития семядолей размером 0,7 мм составила 40 %. Из литературных источников известно, что у некоторых видов сосны, например у *P. koraiensis*, индукция каллусной массы происходила только на данной стадии развития зародышей (Gao et al., 2022). Индукция каллусной массы в нашем исследовании имела место только у семядольных зародышей и с наибольшей частотой (85 %) у наиболее зрелых зародышей, размером около 1 мм

(сбор шишек 30.07–7.08). В научной литературе описаны исследования, в которых индукция соматического эмбриогенеза активно шла также из зрелых зиготических зародышей, например у *P. sylvestris* (Ignatenko et al., 2022) и у *P. pungens* (Cao et al., 2022).

Известно, что на индукцию соматического эмбриогенеза хвойных значительное влияние оказывает состав питательных сред. Наиболее распространенными базовыми средами для рода *Pinus* являются среды DCR (Gupta, Durzan, 1985), Litvay (Litvay et al., 1985;

Nagmani, Bonga, 1985) и MSG (Becwar et al., 1990). В нашем исследовании была использована среда DCR (Gupta, Durzan, 1985), так как считается, что именно она наилучшим образом подходит для индукции соматического эмбриогенеза у *Pinus* (Song et al., 2020). Существует мнение, что среды Litvay (Litvay et al., 1985; Nagmani, Bonga, 1985) и MSG (Becwar et al., 1990) могут негативно сказываться на каллусообразовании, так как содержат менее удачные концентрации некоторых компонентов – более низкие  $\text{Ca}^{2+}$  и более высокие  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{NO}_3^-$  (Cao et al., 2022).

Для индукции соматического эмбриогенеза у разных видов хвойных используют питательные среды с добавлением регуляторов роста растений. Наиболее часто используемыми регуляторами роста являются ауксины 2,4-D и NAA и цитокинин BAP (Montalbán et al., 2013; Klimaszewska et al., 2000; Pullman, Johnson, 2002). Для успешной пролиферации эмбриогенного каллуса у хвойных обычно используют те же питательные среды, что и для индукции, либо среды с пониженной концентрацией регуляторов роста (Pullman, Bucalo, 2014; Klimaszewska et al., 2016). В нашем исследовании было использовано четыре варианта базовой среды DCR (Gupta, Durzan, 1985) с различными концентрациями и комбинациями упомянутых регуляторов роста (табл. 1). В ходе эксперимента индукция и пролиферация эмбриогенного каллуса у *P. pumila* имели место в вариантах с более низкими концентрациями NAA и BAP (DCR 3 и DCR 4). Использование 2,4-D (DCR 1) отрицательно сказалось на индукции и поддержании жизнеспособности каллусов: низкий отклик (15 %) и быстрая, в течение двух-трех субкультивирований, деградация каллусов, несмотря на то, что этот регулятор роста наиболее часто используется для получения соматического эмбриогенеза у *Pinus*

(Ignatenko et al., 2022). На среде DCR 2 формировался неэмбриогенный каллус, который быстро пролиферировал в течение первых двух месяцев культивирования, затем началась его постепенная деградация и перерождение. Каллус становился плотным, медленно пролиферировал в последующие 6 месяцев, постепенно некротировал. Одной из причин деградации каллусных культур *P. pumila* на среде DCR 2 могло быть высокое содержание NAA в питательной среде.

Эмбриогенный каллус формировался и пролиферировал на средах DCR 3 и DCR 4 с пониженными концентрациями регуляторов роста. К концу инициации эмбриогенный каллус представлял собой эмбрионально–супензорную массу, состоял из эмбриональных глобул и эмбриональных трубок и в течение полугода, с момента введения зародышей в культуру до окончания эксперимента, сохранял высокую скорость пролиферации. Благодаря оптимальному составу питательной среды, неэмбриогенный каллус, полученный на средах DCR 3 и DCR 4, пролиферировал в течение 6 месяцев культивирования. Однако спустя полгода каллус постепенно терял пролиферационную активность, становился темно-коричневого цвета, деградировал и погибал.

## Заключение

Индукция соматического эмбриогенеза у *P. pumila* до сих пор изучена недостаточно. В данном исследовании была проведена оценка некоторых факторов, оказывающих влияние на инициацию соматического эмбриогенеза в отношении кедрового стланика. Была выявлена наиболее отзывчивая на индукционные среды стадия развития зиготического зародыша; подобраны наиболее оптимальные условия для эмбриогенного каллусогенеза (состав питательной среды,

концентрация и комбинация регуляторов роста растений). Полученные результаты представляют новые экспериментальные данные для дальнейшей оптимизации индукции соматического эмбриогенеза у *P. pumila* в культуре *in vitro*.

### Список литературы / References

Васильева Г. В., Горошкевич С. Н. (2012) Семеношение и рост потомства гибридов между кедром сибирским и кедровым стлаником в сравнении с родительскими видами. *Хвойные бореальной зоны*, 30(1–2): 28–32 [Vasilyeva G. V., Goroshkevich S. N. (2012) Seed production and offspring growth in hybrids of Siberian stone pine and Siberian dwarf pine in comparison with parental species. *Conifers of the Boreal Area* [Khvoynye boreal'noi zony], 30(1–2): 28–32 (in Russian)]

Петрова Е. А., Горошкевич С. Н., Политов Д. В., Белоконь М. М., Попов А. Г., Васильева Г. В. (2007) Семенная продуктивность и генетическая структура популяций в зоне естественной гибридизации кедра сибирского и кедрового стланика в Северном Прибайкалье. *Хвойные бореальной зоны*, 24(2–3): 331–335 [Petrova E. A., Goroshkevich S. N., Politov D. V., Belokon M. M., Popov A. G., Vasilyeva G. V. (2007) Seed productivity and genetic structure of populations in the area of natural hybridization of Siberian stone pine and Siberian dwarf pine in the Northern Baikal region. *Conifers of the Boreal Area* [Khvoynye boreal'noi zony], 24(2–3): 331–335 (in Russian)]

Третьякова И. Н., Ижболдина М. В. (2009) Индукция соматического эмбриогенеза у кедра сибирского. *Лесоведение*, 5: 43–49 [Tret'yakova I. N., Izhboldina M. V. (2009) Induction of Siberian pine somatic embryogenesis. *Russian Journal of Forest Science* [Lesovedenie], 5: 43–49 (in Russian)]

Третьякова И. Н., Пак М. Э., Пахомова А. П., Шевелева И. С., Муратова Е. Н. (2021) Индукция соматического эмбриогенеза у ели сибирской (*Picea obovata*) в культуре *in vitro*. *Вестник Томского государственного университета. Биология*, 54: 6–20 [Tret'yakova I. N., Park M. E., Pakhomova A. P., Sheveleva I. S., Muratova E. N. (2021) Induction of somatic embryogenesis in Siberian spruce (*Picea obovata*) in *in vitro* culture. *Tomsk State University Journal of Biology* [Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya], 54: 6–20 (in Russian)]

Бесвар М. Р., Nagmani R., Wann S. R. (1990) Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Canadian Journal of Forest Research*, 20(6): 810–817

Belorussova A. S., Tret'yakova I. N. (2008) Patterns of somatic embryo formation in Siberian larch: Embryological aspects. *Russian Journal of Developmental Biology*, 39(2): 83–91

Bozhkov P. V., Ahn I. S., Park Y. G. (1997) Two alternative pathways of somatic embryo origin from polyembryonic mature stored seeds of *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc. *Canadian Journal of Botany*, 75(3): 509–512

Cao X., Gao F., Qin C., Chen S., Cai J., Sun C., Weng Y., Tao J. (2022) Optimizing somatic embryogenesis initiation, maturation and preculturing for cryopreservation in *Picea pungens*. *Forests*, 13(12): 2097

Carneros E., Celestino C., Klimaszewska K., Park Y.-S., Toribio M., Bonga J. M. (2009) Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98(2): 165–178

Gao F., Peng C., Wang H., Shen H., Yang L. (2021) Selection of culture conditions for callus induction and proliferation by somatic embryogenesis of *Pinus koraiensis*. *Journal of Forestry Research*, 32(2): 483–491

Gao F., Peng C., Zhang Y., Wang H., Shen H., Yang L. (2022) Glutathione plays a positive role in the proliferation of *Pinus koraiensis* embryogenic cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23): 14679

Gupta P. K., Durzan D. J. (1985) Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports*, 4(4): 177–179

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. *Environmental Sciences Proceedings*, 22(1): 48

Klimaszewska K., Bernier-Cardou M., Cyr D. R., Sutton B. C. S. (2000) Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 36(4): 279–286

Klimaszewska K., Lachance D., Pelletier G., Lelu M. A., Séguin A. (2001) Regeneration of transgenic *Picea glauca*, *P. mariana*, and *P. abies* after cocultivation of embryogenic tissue with *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 37(6): 748–755

Klimaszewska K., Hargreaves C., Lelu-Walter M. A., Trontin J. F. (2016) Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. *In vitro embryogenesis in higher plants. Methods in molecular biology (Book series). Vol. 1359*. Germana M. A., Lambardi M. (Eds.) New York, Springer Science+Business Media, p. 131–166

Lelu-Walter M. A., Gautier F., Eliášová K., Sanchez L., Teyssier C., Lomenech A. M., Le Metté C., Hargreaves C., Trontin J. F., Reeves C. (2018) High gellan gum concentration and secondary somatic embryogenesis: two key factors to improve somatic embryo development in *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 132(1): 137–155

Litvay J. D., Verma D. C., Johnson M. A. (1985) Influence of a 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*, 4(6): 325–328

Li X., Liu X. T., Wei J. T., Li Y., Tigabu M., Zhao X. Y. (2020) Genetic improvement of *Pinus koraiensis* in China: current situation and future prospects. *Forests*, 11(2): 148

Montalbán I. A., Setién-Olarrá A., Hargreaves C. L., Moncaleán P. (2013) Somatic embryogenesis in *Pinus halepensis* Mill.: an important ecological species from the Mediterranean forest. *Trees*, 27(5): 1339–1351

Nagmani R., Bonga J. M. (1985) Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. *Canadian Journal of Forest Research*, 15(6): 1088–1091

Nunes S., Marum L., Farinha N., Pereira V. T., Almeida T., Sousa D., Mano N., Figueiredo J., Dias M. C., Santos C. (2018) Somatic embryogenesis of hybrid *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *P. caribaea* var. *hondurensis* and ploidy assessment of somatic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 132(1): 71–84

Pullman G. S., Johnson S. (2002) Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation rates. *Annals of Forest Science*, 59(5–6): 663–668

Pullman G. S., Bucalo K. (2014) Pine somatic embryogenesis: analyses of seed tissue and medium to improve protocol development. *New Forests*, 45(3): 353–377

Santa-Catarina C., Silveira V., Guerra M. P., Steiner N., Macedo A. F., Floh E. I. S. (2012) The use of somatic embryogenesis for mass clonal propagation and biochemical and physiological studies in woody plants. *Current Topics in Plant Biology*, 13: 103–119

Song Y., Zhu J.J., Yan Q.L. (2020) The temperature and length for the release of primary and induction of secondary physiological dormancy in Korean pine (*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.) seeds. *New Forests*, 51(4): 657–669

Steiner N., Farias-Soares F. L., Schmidt É. C., Pereira M. L. T., Scheid B., Rogge-Renner G. D., Bouzon Z. L., Schmitz D., Maldonado S., Guerra M. P. (2016) Toward establishing a morphological and ultrastructural characterization of proembryogenic masses and early somatic embryos of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. *Protoplasma*, 253(2): 487–501

Tret'yakova I. N., Voroshilova E. V., Shuvaev D. N. (2014) Callusogenesis and somatic embryogenesis induction in hybrid embryos from the seeds of *Pinus sibirica*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 61(2): 274–280

Tret'yakova I. N., Shuvaev D. N. (2015) Somatic embryogenesis in *Pinus pumila* and productivity of embryogenic lines during long-term cultivation in vitro. *Russian Journal of Developmental Biology*, 46(5): 276–285

Tret'yakova I. N., Park M. E., Ivanitskaya A. S., Oreshkova N. V. (2016) Peculiarities of somatic embryogenesis of long-term proliferating embryogenic cell lines of *Larix sibirica* in vitro. *Russian Journal of Plant Physiology*, 63(6): 800–810

Vondráková Z., Eliášová K., Fischerová L., Vágner M. (2011) The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Central European Journal of Biology*, 6(4): 587–596

Yang X., Zhang X. (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(1): 36–57

Zeng F., Zhang X., Cheng L., Hu L., Zhu L., Cao J., Guo X. (2007) A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. *Genomics*, 90(5): 620–628