

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 57.085.23:582.475.2

doi: 10.17223/19988591/54/1

**И.Н. Третьякова^{1,2}, М.Э. Пак¹, А.П. Пахомова¹,
И.С. Шевелева², Е.Н. Муратова¹**

¹ Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, г. Красноярск, Россия

² Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия

Индукция соматического эмбриогенеза у ели сибирской (*Picea obovata*) в культуре *in vitro*

Работа выполнена в рамках базового проекта ИЛ СО РАН-2021-2025
«Функционально-динамическая индикация биоразнообразия лесов Сибири»

№ 0356-2021-0009 и при частичной финансовой поддержке

Российского фонда фундаментальных исследований, правительства
Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной
и научно-технической деятельности в рамках научного проекта № 19-44-240009.

Исследован процесс культивирования in vitro соматических зародышей ели сибирской в культуре изолированных зародышей в зависимости от стадии развития эксплантов, генотипов деревьев-доноров, состава питательной среды. Выявлено, что наиболее активная индукция каллуса шла из эксплантов ели сибирской на стадии развитых семядолей (87–95% эксплантов) на трех базовых средах DCR, ½LV, A1 с добавлением гормонов (2,4-D и BAP). Среда MS оказала негативное влияние на рост каллусных культур ели сибирской. Цитологический анализ показал, что каллусные культуры состояли из изодиаметрических клеток. Пролиферирующие эмбриогенные культуры содержали массовые глобулярные зародыши и длинные суспензоры. Успешность соматического эмбриогенеза ели сибирской, а также качество полученных соматических зародышей зависели от генотипа растения-донора. Формирование эмбриогенных культур отмечено у трех клеточных линий, полученных от эксплантов двух деревьев-доноров (из тридцати опытных).

Ключевые слова: *Picea obovata*; *in vitro*; каллус; эмбриогенные культуры; стадия развития экспланта; дерево-донор.

Сокращения [Abbreviations]: ECs – эмбриогенные культуры [Embryogenic cultures]; ESM – эмбрионально-суспензорная масса [Embryonic suspension mass]; CL – клеточная линия [Cell line]; 2,4-D – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота [2,4-dichlorophenoxyacetic acid]; BAP – 6-бензоаминопурин [N⁶-benzaminopurine].

Для цитирования: Третьякова И.Н., Пак М.Э., Пахомова А.П., Шевелева И.С., Муратова Е.Н. Индукция соматического эмбриогенеза у ели сибирской (*Picea obovata*) в культуре *in vitro* // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 54. С. 6–20. doi: 10.17223/19988591/54/1

Введение

Ель сибирская (*Picea obovata*) – один из основных лесообразующих видов Сибири, произрастающий от районов северной Европы до Магаданской области. Ель сибирская имеет большое значение в лесоперерабатывающей промышленности, её применяют в защитном лесоразведении, создании снегозадерживающих полос, живых изгородей. Высокие стройные вечнозеленые деревья ели с густой мутовчатой конусовидной кроной перспективны для городского озеленения и ландшафтного дизайна, в особенности разновидности с голубоватой окраской хвои. Ель сибирская растет в жестких условиях резко континентального климата, в том числе на почвах с вечной мерзлотой, является теневыносливой [1]. Однако длительный репродуктивный цикл ели, как и других видов хвойных, нерегулярные урожаи – серьезное препятствие для размножения данного вида. Кроме того, традиционные методы размножения ели не решают проблемы воспроизводства элитных деревьев с необходимыми наследственными свойствами. Так, при семенном размножении только 4–6% деревьев приобретают необходимую окраску хвои, растения, полученные путем прививки, нередко наследуют болезни от взрослых деревьев [2].

Наиболее перспективное направление в размножении хвойных – технология соматического эмбриогенеза, которая позволяет не только массово тиражировать элитные генотипы деревьев, но и служит моделью для исследования структурных, физиологических и молекулярно-генетических механизмов как соматического, так и зиготического эмбриогенеза хвойных. Между тем именно у ели (*Picea abies*) впервые открыли соматический эмбриогенез в 1985 г. [3, 4]. Схема прохождения соматического эмбриогенеза также показана для *Picea abies* [5, 6]. К настоящему времени успешная регенерация через соматический эмбриогенез выявлена у разных видов ели: черной (*P. mariana*) [7], белой (*P. glauca*) [8], обыкновенной (*P. abies*) [9, 10], голубой (*P. pugsens*) [11, 12], гибридной (*P. glauca* × *P. engelmannii*) [13]. До сих пор ученые разных стран проводят активные исследования по оптимизации протоколов соматического эмбриогенеза, изучению мультипликации зародышей [14], физиолого-биохимических [15, 16] и молекулярно-генетических процессов [17–23] соматического эмбриогенеза хвойных, в том числе видов ели. При этом каждый вид ели требует разработки своего протокола получения эмбриогенной культуры. Однако публикации о регенерации ели сибирской (*P. obovata*) в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез до сих пор отсутствуют, что является серьезным препятствием для развития технологий размножения *in vitro* данного вида. В данной статье мы приводим разработку биотехнологии инициации соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* ели сибирской.

Цель данного исследования – получить эмбриогенные культуры, продуцирующие соматические зародыши и эмбрионально-суспензорную массу *Picea obovata*.

Материалы и методики исследования

Исследования проведены в 2014–2019 гг. на 30 деревьях ели сибирской, произрастающих в пригородах г. Красноярска (микрорайоны Академгород, Ветлужанка) и стационаре «Погорельский бор» ИЛ СО РАН (38 км от г. Красноярска). Для обнаружения компетентных к соматическому эмбриогенезу генотипов каждый год для эксперимента выбирали новые деревья-доноры. С каждого дерева собирали 3–10 шишек, которые до анализа хранили при 4 ± 1 °С. Поверхность собранных шишек стерилизовали: промывали с мылом, обрабатывали 5%-ным раствором гипохлорита натрия, затем извлекали семена, собранные на разных стадиях эмбриогенеза – глобулярного зародыша, инициации семядолей, развития семядолей и зрелого зародыша. Поверхностная стерилизация семян проведена 10% раствором H_2O_2 (ЗАО «Химреактивснаб», Россия) в течение 10 мин, затем семена однократно промывали стерильной дистиллированной водой в течение 10 мин. В асептических условиях зародыши извлекали из мегагаметофитов и инокулировали на питательные среды по 10 эксплантов на колбу в 25 повторностях.

Для инициации соматического эмбриогенеза из зиготических зародышей использовали базовые среды DCR [24], $\frac{1}{2}$ LV [25], Мурасиге-Скуга (MS) [26] и AI [27]. Все среды дополняли мезоинозитом – 100 мг/л (Sigma-Aldrich, США), гидролизатом казеина – 500–1000 мг/л (Sigma-Aldrich, США), L-глутамином – 500 мг/л (Sigma-Aldrich, США), сахарозой 30 г/л (ЗАО «Омскреактив», Россия) и агаром – 7 г/л (Sigma-Aldrich, США). В качестве антиоксидантов применяли аскорбиновую кислоту (АК) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 400 мг/л. Уровень регуляторов роста составлял: 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D) – 2 мг/л (Sigma-Aldrich, США) и 6-бензоаминопурина (BAP) – 1 мг/л (Sigma-Aldrich, США). Для пролиферации полученной эмбриональной массы применяли базовые среды DCR и AI, содержащие 2,4-D (2 мг/л), BAP (0,5 мг/л) и сахарозу (20 г/л). Водородный показатель доводили до значения pH = 5,8. Все питательные среды и компоненты стерилизовали в зависимости от их термолабильных свойств. Культуры инкубировали в темноте при температуре 24 ± 1 °С. Субкультивирование на свежие питательные среды проводили каждые 14 суток.

Для контроля качества клеточных линий (CL) при субкультивировании проведены цитологические анализы с использованием временных препаратов. Для приготовления препаратов кусочки каллуса помещали на предметное стекло и 2–3 мин выдерживали в красителе (2%-ный водный раствор сафранина). Далее добавляли глицерин и накрывали препарат покровным стеклом. Просмотр микроскопических образцов с помощью микроскопа МИКМЕД-6 ЛОМО (Санкт-Петербург, Россия) с видеонасадкой DSM510. Объем выборки составил 3–5 препаратов на каждую CL. Качественным показателем эмбриогенности культур служило наличие в них даже единичных структур с выраженной полярностью: глобулярного зародыша с суспензором.

Результаты исследования

Индукция соматического эмбриогенеза. Исследование ели сибирской в окрестностях г. Красноярска в 2014–2020 гг. показало нерегулярность урожая этого вида. В 2018 и 2020 гг. урожай шишек у ели сибирской был очень слабым – на деревьях формировались единичные мегастробилы.

Проведенные эксперименты показали, что на индукцию каллусогенеза и формирование эмбриогенных культур влияет стадия развития экспланта. Введенные в культуру экспланты (зиготические зародыши) в течение июля–августа лучше всего индуцировали каллус на стадии развития семядолей (87–95 %) (табл. 1). На стадии инициации семядолей индукция эмбриогенного каллуса была низкой (10–15%). У эксплантов, введенных на стадии глобулярного зародыша (сбор материала с 8–15 июля), как извлеченных из мегагаметофитов, так и вместе с ними, у всех исследуемых генотипов ели никаких морфогенетических реакций на протяжении двух месяцев культивирования не наблюдали. У введенных в культуру зрелых зародышей (август) образование каллуса составило 40% (см. табл. 1).

Таблица 1 [Table 1]

Влияние стадии развития эксплантов ели сибирской на формирование эмбриогенного каллуса

[Effect of the development stage of Siberian spruce explants on the formation of embryogenic callus]

Стадия развития экспланта [Development stage of the explant]	Сроки взятия образца [Terms of collecting explants]	Частота формирования каллуса [Callus formation frequency], %
Глобулярный зародыш [Globular embryo]	01–14.07	0
Стадия инициации семядолей [Cotyledon initiation stage]	15–17.07	10–15
Стадия развития семядолей [Cotyledon development stage]	21–27.07	87–95
Зрелый зародыш [Mature embryo]	17–30.08	40

Индукция каллусных культур на стадии развития семядолей проведена на четырех средах: DCR, $\frac{1}{2}$ LV, MS и AI. Частота формирования каллуса у ели сибирской на среде DCR составила 90%, на среде $\frac{1}{2}$ LV – 87%, AI – 82%, на среде MS частота формирования каллуса не превышала 41% (табл. 2). У значительного числа эксплантов формировался плотный каллус (рис. 1, А). У 5% эксплантов образовывался рыхлый каллус белого или желтого цвета (рис. 1, В). Плотный каллус состоял из изодиаметрических клеток (рис. 2, А, В, С), рыхлый – из удлинённых клеток (рис. 2, D), а впоследствии – из эмбрионально-сuspензорной массы (ESM).

Цитологический анализ показал, что каллус состоит из клеток разных типов. Первый тип клеток составили удлинённые клетки, достигающие в

длину $100,0 \pm 3$ мкм (рис. 2, D), другие – состояли из изодиаметрических клеток диаметром $60 \pm 3,5$ мкм (рис. 2, A–C).

Таблица 2 [Table 2]

Индукция каллусов и эмбрионных культур *Picea obovata* in vitro
[Induction of *Picea obovata* calli and embryonic cultures in vitro]

Питательная среда [Nutrient medium]	Дата введения в культуру [Date of introduction into in vitro culture]	Число эксплантов введенных в культуру, шт. [The number of explants introduced into the culture, pcs]	Первичный отклик [Primary response], %	Сохранность каллусов через 6 мес. культивирования [Preservation of calli after 6 months of cultivation], %	Частота формирования эмбрионных культур [The frequency of formation of embryonic cultures], %
DCR	25.07	250	90	32	3
½LV	26.07	250	87	32	0
MS	24–27.07	250	41	15	0
AI	17.07– 02.08	250	82	30	0,8

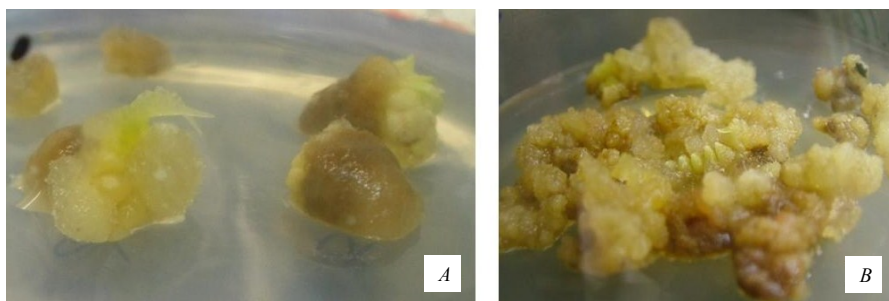


Рис. 1. Каллусная масса *Picea obovata*: A – плотный каллус;

B – рыхлый каллус. Автор фото А.П. Пахомова

[Fig. 1. Callus *Picea obovata*: A - Dense callus, B - Friable callus. Photo by Angelica Pakhomova]

Активной способностью к пролиферации обладали только 3 клеточные линии (из 300), две из которых получены в 2017 г. и одна в 2019 г. В этих клеточных линиях удлиненные клетки – эмбриональные трубки делились и формировали дополнительные эмбриональные трубки и эмбриональные инициалы. Шло активное формирование глобулярных соматических зародышей (рис. 3, A). Соматические зародыши увеличивались в размерах и достигали 200 ± 1 мкм. К глобуле соматического зародыша примыкал хорошо развитый, массивный суспензор, характерный для зиготических зародышей ели сибирской (рис. 3, A, B). Образовывались активно пролиферирующая ESM и эмбриональные комплексы (рис. 3, B). Число соматических зародышей на глобулярной стадии развития в 1 г свежей массы ESM составляло $50,0 \pm 5$ шт.

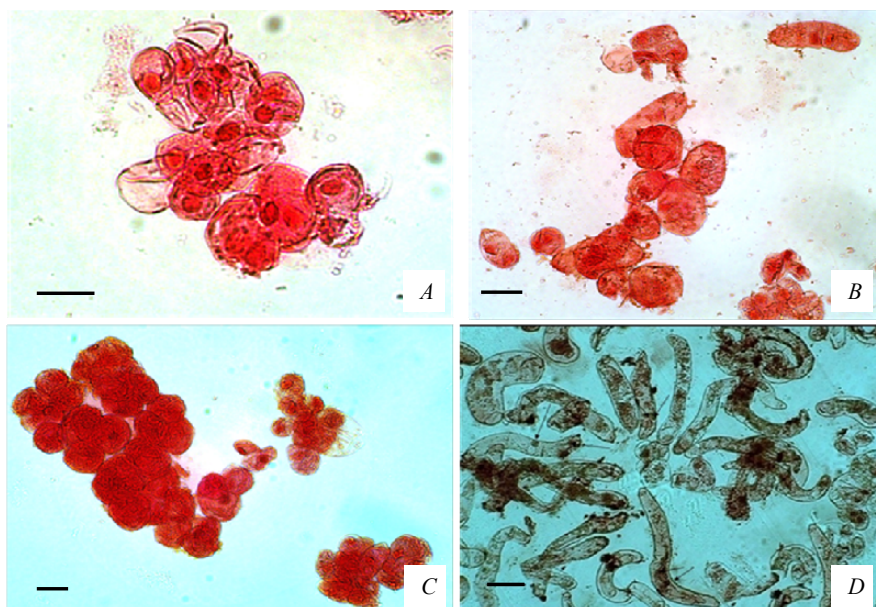


Рис. 2. Гистология культур *in vitro* *Picea obovata*: *A, B, C* – изодиаметрические клетки ($\times 200$) (автор фото М.Э. Пак), *D* – удлинённые клетки (автор фото А.П. Пахомова). Масштабная линейка 50 мкм

[Fig. 2. Histology of *Picea obovata* cultures *in vitro* ($\times 200$): *A, B, C* - Isodiametric cells (Photo by Maria Park), *D* - Elongated cells (Photo by Angelica Pakhomova). Scale 50 μm]

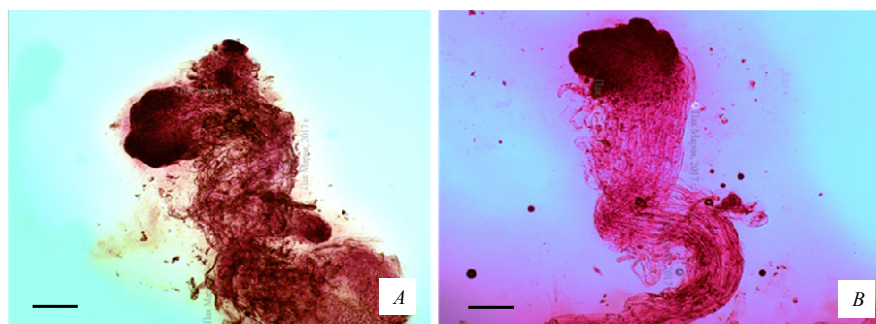


Рис. 3. Глобулярные соматические зародыши клеточных линий ели сибирской, полученных в 2017 г. ($\times 50$): *A* – CL2, *B* – CL3.

Масштабная линейка 200 мкм. Автор фото М.Э. Пак

[Fig. 3. Globular somatic embryos ($\times 50$) of Siberian spruce cell lines obtained in 2017: *A* - CL2, *B* - CL3. Scale 200 μm . Photo by Maria Park]

Обсуждение результатов исследования

Проведенное нами исследование показало, что на индукцию и развитие соматических зародышей ели сибирской влияют такие факторы, как стадия

развития экспланта, состав питательной среды (минеральная основа), генотип дерева-донора. По нашим данным введение в культуру незрелых зиготических зародышей *P. obovata* в качестве первичных эксплантов на стадии раннего эмбриогенеза (глобулярный зародыш) как с мегагаметофитами, так и извлеченными из них, оказалось неэффективным. В то же время у других видов елей, например *P. abies* [29] и *P. mariana* [30], индукция соматического эмбриогенеза более активно происходила именно из зиготических зародышей на этапе раннего эмбриогенеза на посткливажной стадии развития (мегагаметофиты). Введение в культуру *in vitro* незрелых зиготических зародышей *P. obovata* на стадии инициации семядолей привело к незначительному образованию каллусных культур (10–13%). Индукция каллусной массы происходила только из незрелых зиготических зародышей, инокулированных на питательные среды на стадии сформированных семядолей. Подобная морфогенная реакция отмечена у *P. glauca*, *P. engelmannii* [31] и *P. abies* [4]. Значительно снижалась индукция каллусных культур у ели сибирской при введении в культуру зрелых зиготических зародышей. В то же время у других видов елей, например *P. abies* [9, 28, 10], *P. mariana* [30], *P. morrisonicola* [32], индукция соматического эмбриогенеза шла активно из зрелых зиготических зародышей, хранившихся в течение трех лет.

На качество культур ели определенное влияние оказывает и состав питательных сред. Большинство сред, используемых для *P. glauca*, основано на среде MS и LV с различными модификациями [9, 33–35]. Среда, как правило, отличаются по составу макроэлементов. Использование других сред, например GD [36] и LP [10], при культивировании видов ели также не оказало значительного влияния на индукцию каллусных культур. В наших опытах с *P. obovata* мы использовали четыре базовые среды – MS, DCR, $\frac{1}{2}$ LV и AI. Оказалось, что только богатая нитратами среда MS значительно снижала выход каллусных культур у ели сибирской. При образовании каллусных культур, в том числе и эмбриогенных, мы использовали в работе классическую схему содержания ауксинов и цитокининов, используемую разными экспериментаторами – 2,4-D (2 мг/л) и BAP (1 мг/л).

Успешность соматического эмбриогенеза ели сибирской, а также качество полученных соматических зародышей во многом зависели от генотипа растения-донора. В литературе отмечено, что индукция и пролиферация ESM у хвойных в культуре *in vitro* происходят с ограниченного числа деревьев [37–39, 14]. Известно, что соматический эмбриогенез идет под строгим генетическим контролем, так как только отдельные деревья-доноры способны формировать ESM и соматические зародыши в культуре *in vitro* [40, 41]. По данным Stasolla, Yeung [6], способностью к образованию ESM могут обладать 22% деревьев. В наших исследованиях с елью сибирской экспланты только двух деревьев-доноров (из 30 опытных) образовывали эмбриогенные культуры.

Заключение

Таким образом, проведена комплексная оценка факторов, влияющих на индукцию соматического эмбриогенеза у ели сибирской. Полученные результаты свидетельствуют, что для успешного формирования соматических зародышей определяющим фактором является не только выбор донорных растений, но и стадия развития экспланта. Установлено, что лучшей стадией развития зиготических зародышей при введении в культуру *in vitro* у ели сибирской является этап незрелых зародышей со сформированными семядолями, при этом оптимальными питательными средами являются DCR, ½LV и AI.

Литература

1. Фирсов Г.А., Орлова Л.В. Хвойные в Санкт-Петербурге. СПб. : Дом садовой литературы, 2019. 492 с.
2. Железниченко Т.В., Новикова Т.И. Влияние аскорбиновой кислоты и глутатиона на индукцию соматического эмбриогенеза *Picea pungens* Engelmann // Turczaninowia. 2017. Т. 20, № 3. С. 27–35.
3. Chalupa W. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) // Karst. Com. Inst. For. Cech. 1985. Vol. 14. P. 57.
4. Hakman I., Fowke L.C., von Arnold S. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce) // Plant Sci. 1985. Vol. 38. PP. 53–59. doi: [10.1016/0168-9452\(85\)90079-2](https://doi.org/10.1016/0168-9452(85)90079-2)
5. Arnold S. von, Clapham D., Egertsdotter U., Mo L.H. Somatic embryogenesis in conifers—a case study of induction and development of somatic embryos in *Picea abies* // Plant Growth Regulation. 1996. Vol. 20, № 1. PP. 3–9. doi: [10.1007/BF00024050](https://doi.org/10.1007/BF00024050)
6. Stasolla C., Yeung E.-C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2003. Vol. 74, PP. 15–35. doi: [10.1023/A:1023345803336](https://doi.org/10.1023/A:1023345803336)
7. Hakman I., Rennie P., Fowke L.C. A light and electron microscopy study of *Picea glauca* (white spruce) somatic embryos // Protoplasma. 1987. Vol. 140. PP. 100–109. doi: [10.1007/BF01273718](https://doi.org/10.1007/BF01273718)
8. Dunstan D.I., Bekkaoui F., Pilon M., Fowke L.C., Abram S.R. Effects of abscisic acid and analogues on the maturation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos // Plant Sci. 1988. Vol. 58, PP. 77–84. doi: [10.1016/0168-9452\(88\)90156-2](https://doi.org/10.1016/0168-9452(88)90156-2)
9. Gupta P.K., Durzan D.J. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis from subcultured callus of mature embryos of *Picea abies* (Norway spruce) // In Vitro Cell. Dev. Biol. 1986. Vol. 22. PP. 685–688.
10. Mauleová M., Vítámvás J. Differential success of somatic embryogenesis in random gene pool of Norway spruce // J. For. Sci. 2007. Vol. 53, № 2. PP. 74–87.
11. Afele J.C., Senaratna T., McKersie B.D., Saxena P.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo culture in blue spruce (*Picea pungens* Engelman.) // Plant cell reports. 1992. Vol. 11, № 5–6. PP. 299–303. doi: [10.1007/BF00235086](https://doi.org/10.1007/BF00235086)
12. Afele J.C., Saxena P.K. Somatic embryogenesis in blue spruce (*Picea pungens* Engelman) // Somatic embryogenesis in woody plants. Springer, Dordrecht. 1995. PP. 99–109. doi: [10.1007/978-94-011-0960-4_7](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0960-4_7)
13. Roberts D.R., Sutton B.C.S., Flinn B.S. Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity // Canadian Journal of Botany. 1990. Vol. 68, № 5. PP. 1086–1090. doi: [10.1139/b90-136](https://doi.org/10.1139/b90-136)

14. Tret'yakova I.N., Park M.E. Somatic polyembryogenesis of *Larix sibirica* in embryogenic *in vitro* culture // Russian Journal of Developmental Biology. 2018. Vol. 49, № 4. PP. 222–233. doi: [10.1134/S1062360418040069](https://doi.org/10.1134/S1062360418040069)
15. Vondrakova Z., Dobrev P. I., Pesek B., Fischerova L., Vagner M., Motyka, V. Profiles of endogenous phytohormones over the course of Norway spruce somatic embryogenesis // Frontiers in Plant Science. 2018. Vol. 9. P. 1283. doi: [10.3389/fpls.2018.01283](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01283)
16. Tret'yakova I.N., Kudoyarova G.R., Park M.E., Kazachenko A.S., Shuklina A.S., Akhiyarova G.R., Korobova A.V. Veselov S.U. Content and immunohistochemical localization of hormones during *in vitro* somatic embryogenesis in long-term proliferating *Larix sibirica* cultures // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2019. Vol. 136, № 3. PP. 511–522. doi: [10.1007/s11240-018-01533-y](https://doi.org/10.1007/s11240-018-01533-y)
17. Dong J.-Z., Dunstan D.I. Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers // In: Molecular Biology of Woody Plants Vol. 1. Jain SM & Minocha SC (eds). The Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. PP. 51–87. doi: [10.1007/978-94-017-2311-4_3](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2311-4_3)
18. MacKay J., Becwar M., Park V.-S., Corderro J.P., Pullman G.S. Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implication for breeding // Tree Genetics & Genomes. 2006. Vol. 2, № 1. PP. 1–9. doi: [10.1007/s11295-005-0020-2](https://doi.org/10.1007/s11295-005-0020-2)
19. Cairney J., Pullman G. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis // New Phytologist. 2007. Vol. 176. PP. 511–536. doi: [10.1111/j.1469-8137.2007.02239.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02239.x)
20. Zhang L., Li W.F., Xu H.Y., Qi L.W., Han S.Y. Cloning and characterization of four differentially expressed c DNAs encoding NEYA homologs involved in response to ABA during somatic embryogenesis in Japanese larch (*Larix leptolepis*) // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2014. Vol. 117. PP. 293–304. doi: [10.1007/s11240-014-0440-5](https://doi.org/10.1007/s11240-014-0440-5)
21. Li S., Li W., Han S., Yang W., Qi L. The post-transcriptional regulation of LaSCL6 by miR 171 during maintenance of embryogenic potential in *Larix kampferi* (Lamb) // Carr Tree Genetics and Genomics. 2014. Vol. 100, № 1. PP. 223–229. doi: [10.1007/s11295-013-0668-y](https://doi.org/10.1007/s11295-013-0668-y)
22. Li S., Li W., Han S., Li W., Xu H., Yang W., Lin Y., Fan Y., Qi L. Over-expression of mi R166a inhibits cotyledons formation in somatic embryos and promotes lateral root development in seedlings of *Larix leptolepis* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2016. Vol. 127, № 2. PP. 461–473. doi: [10.1007/s11240-016-1071-9](https://doi.org/10.1007/s11240-016-1071-9)
23. Rupps A., Rasche J., Rummeler V., Linke B., Zoglauer K. Identification of putative homologs of *Larix decidua* to Baby Boom (BBM) LeafyCotyledon1 (LEG1), Wuschel-related Homeobox2 (WOX2) and Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase (SERK) during somatic embryogenesis // Planta. 2016. Vol. 243, № 2. PP. 473–478. doi: [10.1007/s00425-015-2409-y](https://doi.org/10.1007/s00425-015-2409-y)
24. Gupta P.K., Durzan D.J. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*) // Plant Cell Reports. 1985. Vol. 4, № 4. PP. 177–179. doi: [10.1007/BF00269282](https://doi.org/10.1007/BF00269282)
25. Litvay J.D., Verma D.C., Johnson M.A. Influence of loblolly pine (*Pinus taeda*) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota*) // Plant Cell Reports. 1985. Vol. 4. PP. 325–328. doi: [10.1007/BF00269890](https://doi.org/10.1007/BF00269890)
26. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, № 4. PP. 473–497.
27. Третьякова И.Н. Способ микрোকлонального размножения лиственницы сибирской в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез на среде АИ для плантационного лесовыращивания // Патент RU 2 456 344 C2. Российская Федерация. МПК: C12N 5/04 A01H 4/00; Заявка № 2010114891/10; заявлено 13.04.2010; опубликовано 20.07.2012. Бюл. 2012. № 20. 7 с. URL: https://new.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2456344&TypeFile=html

28. Ramarosandratana A.V., Van Staden J. Effects of auxins and 2, 3, 5-triiodobenzoic acid on somatic embryo initiation from Norway spruce zygotic embryos (*Picea abies*) // Plant cell, tissue and organ culture. 2004. Vol. 79, № 1. PP. 105–107. doi: [10.1023/B:TICU.0000049446.77837.d7](https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000049446.77837.d7)
29. Krogstrup P. Embryolike structures from cotyledons and ripe embryos of Norway spruce (*Picea abies*) // Canadian Journal of Forest Research. 1986. Vol. 16, № 3. PP. 664–668. doi: [10.1139/x86-116](https://doi.org/10.1139/x86-116)
30. Lelu M.-A., Bornman C.H. Induction of somatic embryogenesis in excised cotyledons of *Picea abies* and *Picea mariana* // Plant Physiol. Biochem. 1990. Vol. 28. PP. 785–791.
31. Webb D.T., Webster F., Flinn B.S., Roberts D.R., Ellis D.D. Factors influencing the induction of embryogenic and caulogenic callus from embryos of *Picea glauca* and *P. engelmannii* // Canadian Journal of Forest Research. 1989. Vol. 19, № 10. PP. 1303–1308. doi: [10.1139/x89-200](https://doi.org/10.1139/x89-200)
32. Liao Y.K., Liao C.K., Ho Y.L. Maturation of somatic embryos in two embryogenic cultures of *Picea morrissonicola* Hayata as affected by alternation of endogenous IAA content // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2008. Vol. 93. PP. 257–268. doi: [10.1007/s11240-008-9371-3](https://doi.org/10.1007/s11240-008-9371-3)
33. Arnold S.V., Eriksson T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta* // Canadian Journal of Botany. 1981. Vol. 59, № 5. PP. 870–874. doi: [10.1139/b81-121](https://doi.org/10.1139/b81-121)
34. Jain S.M., Newton R.J., Soltes E.J. Enhancement of somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies* L.) // Theoretical and Applied Genetics. 1988. Vol. 76, № 4. PP. 501–506. doi: [10.1007/BF00260899](https://doi.org/10.1007/BF00260899)
35. Klimaszewska K., Lachance D., Pelletier G., Lelu M.A., Séguin A. Regeneration of transgenic *Picea glauca*, *P. mariana*, and *P. abies* after cocultivation of embryogenic tissue with *Agrobacterium tumefaciens* // In Vitro Cellular and Developmental Biology. 2001. Vol. 37, № 6. PP. 748–755. doi: [10.1007/s11627-001-0124-9](https://doi.org/10.1007/s11627-001-0124-9)
36. Vágner M., Vondráková Z., Strnadová Z., Eder J., Macháček I. Endogenous levels of plant growth hormones during early stages of somatic embryogenesis of *Picea abies* // Advances in horticultural science. 1998. PP. 11–18. URL: <https://www.jstor.org/stable/42881908>
37. Arnold S. von, Egertsdotter U., Ekberg I., Gupta P.K., Mo H. Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*) // In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. The Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1995. Vol. 3. PP. 17–36. doi: [10.1007/978-94-011-0960-4_2](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0960-4_2)
38. Filonova L.H., Bozhkov P.V., Arnold S. von. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking // Journal of Experimental Botany. 2000. Vol. 51. PP. 249–264. doi: [10.1093/jexbot/51.343.249](https://doi.org/10.1093/jexbot/51.343.249)
39. Tret'yakova I.N., Barsukova A.V. Somatic embryogenesis in *in vitro* culture of three larch species // Russ J Developmental Biology. 2012. Vol. 43, №. 6. PP. 353–361. doi: [10.1134/S1062360412060082](https://doi.org/10.1134/S1062360412060082)
40. MacKay J., Becwar M., Park Y., Perfetti C., Cordero J., Pullman G., Lockhart L. Genetics of somatic embryogenesis in loblolly pine // In: Proceedings (publ no 48) 26th southern forest tree improvement Conference. Deab JF(ed). University of Georgia Athens. 2001. PP. 40–47.
41. MacKay J., Becwar M., Park V.-S., Cordero J.P., Pullman G.S. Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implication for breeding // Tree Genetics & Genomes. 2006. Vol. 2, № 1. PP. 1–9. doi: [10.1007/s11295-005-0020-2](https://doi.org/10.1007/s11295-005-0020-2)

Поступила в редакцию 10.02.2021 г.; повторно 15.05.2021 г.;
принята 27.05.2021 г.; опубликована 29.06.2021 г.

Авторский коллектив:

Третьякова Ираида Николаевна, профессор, д-р биол. наук, в.н.с. лаборатории лесной генетики и селекции, Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок, 50/28).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-2029-5163>

E-mail: culture@ksc.krasn.ru

Пак Мария Эдуардовна, н.с. лаборатории лесной генетики и селекции, Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок, 50/28).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6048-0769>

E-mail: mtavi@bk.ru

Пахомова Анжелика Павловна, аспирант лаборатории лесной генетики и селекции, Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок, 50/28).

E-mail: culture@ksc.krasn.ru

Шевелева Ирина Сергеевна, аспирант кафедры водных и наземных экосистем, Сибирский федеральный университет (Россия, 660041, г. Красноярск, пр-т Свободный, 79).

E-mail: culture@ksc.krasn.ru

Муратова Елена Николаевна, профессор, д-р биол. наук, зав. лабораторией лесной генетики и селекции, Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок, 50/28).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-5951-4968>

E-mail: culture@ksc.krasn.ru

For citation: Tretyakova IN, Park ME, Pakhomova AP, Sheveleva IS, Muratova EN. Induction of somatic embryogenesis in Siberian spruce (*Picea obovata*) in *in vitro* culture. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = *Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;54:6-20. doi: 10.17223/19988591/54/1 In Russian, English Summary

**Iraida N. Tretyakova^{1,2}, Maria E. Park¹, Angelica P. Pakhomova¹,
Irina S. Sheveleva², Elena N. Muratova¹**

¹ VN Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

² Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Induction of somatic embryogenesis in Siberian spruce (*Picea obovata*) in *in vitro* culture

The biotechnology of somatic embryogenesis in *in vitro* culture is the most promising direction in the reproduction of conifers. The use of this technology makes it possible not only to massively propagate the best genotypes of trees, but also serves a model for studying the structural, physiological and molecular and genetic mechanisms of both somatic and zygotic embryogenesis in conifers. The main aim of this research was to obtain embryogenic cultures (ECs) producing somatic embryos and embryonic suspension mass (ESM) of *Picea obovata*.

The studies were carried out in 2014-2019 on 30 Siberian spruce trees growing in the vicinity of the city of Krasnoyarsk. To detect genotypes competent for somatic embryogenesis, new donor trees were selected every year for the experiment. 3-10 cones were collected from each tree at different stages of embryo development: globular embryo (the first decade of July), the initiation stage cotyledons (second decade of July), the stage of developed cotyledons (third decade of July) and mature embryos (August). Sterilized explants (zygotic embryos at different stages of development) were introduced into *in vitro* culture on basic media DCR (Gupta PK and Durzan DJ, 1985), ½LV (Litvay JD et al., 1985), MS (Murashige T and Skoog F, 1962) and AI (Tretyakova IN, 2012). All media were supplemented with myo-inositol - 100 mg/L, casein hydrolyzate - 500-1000 mg/L, L-glutamine - 500 mg/L, sucrose - 30 g/L and

agar - 7 g/L. Ascorbic acid at a concentration of 400 mg/L was used as an antioxidant. The level of growth regulators was: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) - 2 mg/L and N⁶-benzoaminopurine (BAP) - 1 mg/L. For the proliferation of the ESM, DCR and AI basic media containing 2,4-D (2 mg/L), BAP (0.5 mg/L) and sucrose (20 g/L) were used. The pH was adjusted to pH = 5.8. All culture medium and components were sterilized depending on their thermolabile properties. Under aseptic conditions, embryos were removed from megagametophytes and inoculated into nutrient media, 10 explants per flask in 25 replicates. The cultures were incubated in the dark at 24 ± 1 °C. Subcultivation to fresh nutrient medium was carried out every 14 days. To control the quality of cell lines (CL) during subculturing, we performed cytological analyzes using temporary preparations (3-5 preparations for each CL). We evaluated the quality of the embryogenicity of the cultures by the presence of even single structures with pronounced polarity - a globular embryo with a suspensor.

The results of the study showed that the induction of callus cultures of Siberian spruce is influenced by such factors as the development stage of the explant, the nutrient medium and the genotype of the donor tree. The introduction of *P. obovata* immature zygotic embryos into *in vitro* culture at the stage of the globular embryo, both with megagametophytes and extracted from them, turned out to be ineffective. The induction of callus cultures in Siberian spruce was significantly reduced when mature zygotic embryos were introduced into the culture *in vitro*. The highest response of explants of Siberian spruce was at the stage of developed cotyledons (See Table 1). In the DCR medium, 90% of explants formed callus (See Table 2). The mineral composition of the media did not significantly affect the induction of callus formation in Siberian spruce. The exception was the MS medium, in which callus cultures were formed only in 41% of explants (See Table 2). The growth of callus cultures was most active in the DCR medium. After 6 months of cultivation, 15-32% of calli remained viable (See Table 2). Cytological analysis of callus cultures showed that they include cells of different types (See Fig. 1 and 2). The first type of cells consisted of elongated cells reaching a length of 10 ± 3 μm, others consisted of isodiametric cells with a diameter of 60 ± 3.5 μm. The somatic embryo globule and embryonic tubes were formed from elongated cells. Isodiametric cells were actively dividing and forming callus. Only 3 cell lines (out of 300 cell lines) belonging to two donor trees had an active ability to proliferate. Globular somatic embryos were actively forming in these cell lines (See Fig. 3). An actively proliferating ESM was formed.

Thus, we carried out a comprehensive assessment of the factors influencing the induction of somatic embryogenesis in Siberian spruce. The results obtained indicate that for the successful formation of somatic embryos, the determining factor is not only the choice of donor plants, but also the development stage of the explant. We found that the best stage in the development of zygotic embryos when introduced into *in vitro* culture of Siberian spruce is the stage of immature embryos with formed cotyledons, while the DCR, ½LV and AI nutrient medium supplemented with growth regulators (2,4-D and BAP) is optimal.

The paper contains 3 Figures, 2 Tables and 41 References.

Key words: *Picea obovata*; *in vitro*; callus; embryogenic cultures; stage of explant development; nutrient medium; donor tree; somatic embryogenesis.

Funding: The reported study was carried out within the framework of the basic project IL SB RAS-2021-2025 No. 0356-2021-0009 and partially financed by the Russian Foundation for Basic Research, Government of Krasnoyarsk Krai, Krasnoyarsk Region Science and Technology Support Fund (Project No. 19-44-240009).

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Firsov GA, Orlova LV. Khvoynye v Sankt-Peterburge [Conifers in St. Petersburg]. St. Petersburg: Dom sadovoy literatury Publ.; 2019. 492 p. In Russian
2. Zheleznychenko TV, Novikova TI. Effect of ascorbic acid and glutathione on somatic embryogenesis induction in *Picea pungens* Engelm. *Turczaninowia*. 2017;20(3):27-35. doi: [10.14258/turczaninowia.20.3.4](https://doi.org/10.14258/turczaninowia.20.3.4) In Russian, English Summary
3. Chalupa W. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.). Karst. *Commun Inst Forest Cech*. 1985;14:57.
4. Hakman I, Fowke LC, von Arnold S. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Science*. 1985;38:53-59. doi: [10.1016/0168-9452\(85\)90079-2](https://doi.org/10.1016/0168-9452(85)90079-2)
5. Von Arnold S, Clapham D, Egertsdotter U, Mo LH. Somatic embryogenesis in conifers—a case study of induction and development of somatic embryos in *Picea abies*. *Plant Growth Regulation*. 1996;20(1):3-9. doi: [10.1007/BF00024050](https://doi.org/10.1007/BF00024050)
6. Stasolla C, Yeung E-C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003;74:15-35. doi: [10.1023/A:1023345803336](https://doi.org/10.1023/A:1023345803336)
7. Hakman I, Rennie P, Fowke LC. A light and electron microscopy study of *Picea glauca* (white spruce) somatic embryos. *Protoplasma*. 1987;140:100-109. doi: [10.1007/BF01273718](https://doi.org/10.1007/BF01273718)
8. Dunstan DI, Bekkaoui F, Pilon M, Fowke LC, Abram SR. Effects of abscisic acid and analogues on the maturation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Plant Science*. 1988;58:77-84. doi: [10.1016/0168-9452\(88\)90156-2](https://doi.org/10.1016/0168-9452(88)90156-2)
9. Gupta PK, Durzan DJ. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis from subcultured callus of mature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 1986;22:685-688.
10. Mauleová M, Vitámvás J. Differential success of somatic embryogenesis in random gene pool of Norway spruce. *Journal of Forest Science*. 2007;53(2):74-87.
11. Afele JC, Senaratna T, McKersie BD, Saxena PK. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo culture in blue spruce (*Picea pungens* Engelm.). *Plant Cell Reports*. 1992;11(5-6):299-303. doi: [10.1007/BF00235086](https://doi.org/10.1007/BF00235086)
12. Afele JC, Saxena PK. Somatic embryogenesis in blue spruce (*Picea pungens* Engelm.). In: *Somatic embryogenesis in woody plants*. Vol. 44-46. Jain SM, Gupta PK and Newton RJ, editors. Dordrecht: Springer Publ.; 1995. pp. 99-109. doi: [10.1007/978-94-011-0960-4_7](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0960-4_7)
13. Roberts DR, Sutton BCS, Flinn BS. Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. *Canadian Journal of Botany*. 1990;68(5):1086-1090. doi: [10.1139/b90-136](https://doi.org/10.1139/b90-136)
14. Tretyakova IN, Park ME. Somatic polyembryogenesis of *Larix sibirica* in embryogenic *in vitro* culture. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2018;49(4):222-233. doi: [10.1134/S1062360418040069](https://doi.org/10.1134/S1062360418040069)
15. Vondrakova Z, Dobrev PI, Pesek B, Fischerova L, Vagner M, Motyka V. Profiles of endogenous phytohormones over the course of Norway spruce somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:1283. doi: [10.3389/fpls.2018.01283](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01283)
16. Tretyakova IN, Kudoyarova GR, Park ME, Kazachenko AS, Shuklina AS, Akhiyarova GR, Korobova AV, Veselov SU. Content and immunohistochemical localization of hormones during *in vitro* somatic embryogenesis in long-term proliferating *Larix sibirica* cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2019;136(3):511-522. doi: [10.1007/s11240-018-01533-y](https://doi.org/10.1007/s11240-018-01533-y)
17. Dong J-Z, Dunstan DI. Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers. In: *Molecular Biology of Woody Plants Vol. 1* Jain SM and Minocha SC, editors. The Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2000. pp. 51-87. doi: [10.1007/978-94-017-2311-4_3](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2311-4_3)

18. MacKay J, Becwar M, Park V-S, Corderro JP, Pullman GS. Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implication for breeding. *Tree Genetics & Genomes*. 2006;2(1):1-9. doi: [10.1007/s11295-005-0020-2](https://doi.org/10.1007/s11295-005-0020-2)
19. Cairney J, Pullman G. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. *New Phytologist*. 2007;176:511-536. doi: [10.1111/j.1469-8137.2007.02239.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02239.x)
20. Zhang L, Li WF, Xu HY, Qi LW, Han SY. Cloning and characterization of four differentially expressed cDNAs encoding NEYA homologs involved in response to ABA during somatic embryogenesis in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2014;117:293-304. doi: [10.1007/s11240-014-0440-5](https://doi.org/10.1007/s11240-014-0440-5)
21. Li S, Li W, Han S, Yang W, Qi L. The post-transcriptional regulation of LaSCL6 by miR 171 during maintenance of embryogenic potential in *Larix kaempferi* (Lamb). *Tree Genetics & Genomes*. 2014;100(1):223-229. doi: [10.1007/s11295-013-0668-y](https://doi.org/10.1007/s11295-013-0668-y)
22. Li S, Li W, Han S, Li W, Xu H, Yang W, Lin Y, Fan Y, Qi I. Over-expression of mi R166a inhibits cotyledons formation in somatic embryos and promotes lateral root development in seedlings of *Larix leptolepis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2016;127(2):461-473. doi: [10.1007/s11240-016-1071-9](https://doi.org/10.1007/s11240-016-1071-9)
23. Rupps A, Rasche J, Rummeler V, Linke B, Zoglauer K. Identification of putative homologs of *Larix decidua* to Baby Boom (BBM) LeafyCotyledon1 (LEG1), Wuschel-related Homeobox2 (WOX2) and Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase (SERK) during somatic embryogenesis. *Planta*. 2016;243(2):473-478. doi: [10.1007/s00425-015-2409-y](https://doi.org/10.1007/s00425-015-2409-y)
24. Gupta PK, Durzan DJ. Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports*. 1985;4(4):177-179. doi: [10.1007/BF00269282](https://doi.org/10.1007/BF00269282)
25. Litvay JD, Verma DC, Johnson MA. Influence of loblolly pine (*Pinus taeda*) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota*). *Plant Cell Reports*. 1985;4:325-328. doi: [10.1007/BF00269890](https://doi.org/10.1007/BF00269890)
26. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 1962;15(4):473-497.
27. Tretyakova IN. Sposob mikroklonal'nogo razmnnozheniya listvennitsy sibirskoy v kul'ture *in vitro* cherez somaticheskiiy embriogenez na srede AI dlya plantatsionnogo lesovyrashchivaniya [Method of microclonal propagation of Siberian larch in *in vitro* culture via somatic embryogenesis for plantation growing]. *Patent RU 2 456 344 C2*. Published 20.07.2012. *Bulletin*. 2012. No. 20. 7 p. In Russian. Available at: https://new.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2456344&TypeFile=html (accessed: 23.06.2021)
28. Ramarosandratana AV, Van Staden J. Effects of auxins and 2, 3, 5-triiodobenzoic acid on somatic embryo initiation from Norway spruce zygotic embryos (*Picea abies*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2004;79(1):105-107. doi: [10.1023/B:TICU.0000049446.77837.d7](https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000049446.77837.d7)
29. Krogstrup P. Embryolike structures from cotyledons and ripe embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Canadian Journal of Forest Research*. 1986;16(3):664-668. doi: [10.1139/x86-116](https://doi.org/10.1139/x86-116)
30. Lelu M-A, Bornman CH. Induction of somatic embryogenesis in excised cotyledons of *Picea abies* and *Picea mariana*. *Plant Physiol. Biochem*. 1990;28:785-791.
31. Webb DT, Webster F, Flinn BS, Roberts DR, Ellis DD. Factors influencing the induction of embryogenic and caulogenic callus from embryos of *Picea glauca* and *P. engelmannii*. *Canadian Journal of Forest Research*. 1989;19(10):1303-1308. doi: [10.1139/x89-200](https://doi.org/10.1139/x89-200)
32. Liao YK, Liao CK, Ho YL. Maturation of somatic embryos in two embryogenic cultures of *Picea morrissonicola* Hayata as affected by alternation of endogenous IAA content. *Plant cell, tissue and organ culture*. 2008;93:257-268. doi: [10.1007/s11240-008-9371-3](https://doi.org/10.1007/s11240-008-9371-3)
33. Arnold SV, Eriksson T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Canadian Journal of Botany*. 1981;59(5):870-874. doi: [10.1139/b81-121](https://doi.org/10.1139/b81-121)

34. Jain SM, Newton RJ, Soltes EJ. Enhancement of somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 1988;76(4):501-506. doi: [10.1007/BF00260899](https://doi.org/10.1007/BF00260899)
35. Klimaszewska K, Lachance D, Pelletier G, Lelu MA, Séguin A. Regeneration of transgenic *Picea glauca*, *P. mariana*, and *P. abies* after cocultivation of embryogenic tissue with *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 2001;37(6):748-755. doi: [10.1007%252Fs11627-001-0124-9](https://doi.org/10.1007%252Fs11627-001-0124-9)
36. Vágner M, Vondráková Z, Strnadová Z, Eder J, Macháčková I. Endogenous levels of plant growth hormones during early stages of somatic embryogenesis of *Picea abies*. *Advances in Horticultural Science*. 1998;11-18. doi: <https://www.jstor.org/stable/42881908>
37. Von Arnold S, Egertsdotter U, Ekberg I, Gupta PK, Mo H. Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*). In: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Vol. 44-46. Jain SM, Gupta PK and Newton RJ, editors. Dordrecht: Springer Publ.; 1995. pp. 17-36. doi: [10.1007/978-94-011-0960-4_2](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0960-4_2)
38. Filonova LH, Bozhkov PV, von Arnold S. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany*. 2000;51:249-264. doi: [10.1093/jexbot/51.343.249](https://doi.org/10.1093/jexbot/51.343.249)
39. Tret'yakova IN, Barsukova AV. Somatic embryogenesis in *in vitro* culture of three larch species. *Russ J Developmental Biology*. 2012;43(6):353-361. doi: [10.1134/S1062360412060082](https://doi.org/10.1134/S1062360412060082)
40. MacKay J, Becwar M, Park Y, Perfetti C, Cordero J, Pullman G, Lockhart L. Genetics of somatic embryogenesis in loblolly pine. In: *Proceedings (publ no 48) 26th Southern Forest Tree Improvement Conference*. Deab JF, eitor. USA, Athens: University of Georgia Althehs Puibl.; 2001. pp. 40-47.
41. MacKay J, Becwar M, Park V-S, Corderro JP, Pullman GS. Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implication for breeding. *Tree Genetics & Genomes*. 2006;2(1):1-9. doi: [10.1007/s11295-005-0020-2](https://doi.org/10.1007/s11295-005-0020-2)

Received 10 February 2021; Revised 15 May 2021;

Accepted 27 May 2021; Published 29 June 2021.

Author info:

Tret'yakova Iraida N, Professor, Dr. Sci. (Biol.), Laboratory of Forest Genetics and Breeding, VN Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 50/28 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-2029-5163>

E-mail: culture@ksc.krasn.ru

Park Maria E, Researcher, Laboratory of Forest Genetics and Breeding, VN Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 50/28 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6048-0769>

E-mail: mtavi@bk.ru

Pakhomova Angelica P, Post-Graduate Student, Laboratory of Forest Genetics and Breeding, VN Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 50/28 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation.

E-mail: culture@ksc.krasn.ru

Sheveleva Irina S, Post-Graduate Student, Department of Aquatic and Terrestrial Ecosystems, Siberian Federal University, 79 Svobodny Ave., Krasnoyarsk 660041, Russian Federation.

E-mail: culture@ksc.krasn.ru

Muratova Elena N, Professor, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Forest Genetics and Breeding, VN Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 50/28 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-5951-4968>

E-mail: culture@ksc.krasn.ru