

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭКСПЛАНТОВ *PINUS SYLVESTRIS* (PINACEAE)

© 2022 г. М. А. Ершова¹*, Р. В. Игнатенко¹, Е. В. Новичонок¹, О. В. Чирва¹, Н. А. Галибина¹

¹Отдел комплексных научных исследований КарНЦ РАН, г. Петрозаводск, Россия

*e-mail: maria_ershova_karnc@mail.ru

Поступила в редакцию 27.01.2022 г.

После доработки 06.04.2022 г.

Принята к публикации 04.10.2022 г.

Несмотря на существование достаточного количества протоколов для получения соматических зародышей *Pinus sylvestris* L., данные о влиянии предварительной стерилизации растительных эксплантов на инициацию соматического эмбриогенеза практически отсутствуют. В ходе исследования были подобраны оптимальные сроки сбора незрелых шишек и выбран безопасный и эффективный протокол предварительной стерилизации незрелых семян. Согласно полученным данным, “временное окно”, при котором стадия развития зиготического зародыша подходит для введения растительного материала в культуру *in vitro* на Петрозаводской лесосеменной плантации I порядка (Карелия) в 2020 г. приходилось на конец третьей декады июня—второй декады июля (при сумме эффективных температур 406.8–655.5 градусо-дней соответственно (при базовой температуре 5 °C)). Тогда как в 2021 г. период, подходящий для взятия образцов, был короче (третья декада июня—первая декада июля (400.7–664.7 градусо-дней)). Наряду с этим представлены результаты по изучению влияния различных типов стерилизующих агентов (70% этанол, перманганат калия, гипохлорит натрия (коммерческий отбеливатель “Белизна”), перекись водорода), их концентраций и времени воздействия на всхожесть зрелых семян *P. sylvestris*. Установлено отрицательное влияние раствора 70% этанола на данный показатель. Всхожесть зрелых семян после такой обработки не превышала 20%. У обработанных раствором этанола незрелых семян после двух месяцев в культуре *in vitro* не наблюдались признаки развития или гибели. В то время как растворы коммерческого отбеливателя “Белизна” и перекиси водорода в различных концентрациях (до 20%) не влияли на всхожесть семян (всхожесть семян 40 и 49% соответственно, контроль 49%). Также был апробирован метод стерилизации зеленых шишек, без дальнейшей обработки семян, и введение в культуру *in vitro* мегагаметофитов *P. sylvestris*. Такой вариант обработки оказался эффективным, контаминации за время культивирования мегагаметофитов зафиксировано не было.

Ключевые слова: соматический эмбриогенез, стерилизация растительного материала, *Pinus sylvestris*, культура *in vitro*, Карелия

DOI: 10.31857/S0033994622040057

Сосна обыкновенная *Pinus sylvestris* L. — один из самых распространенных и хозяйственно ценных видов хвойных растений в мире, ее древесина широко востребована, особенно в странах Северной Европы [1]. Попытки использовать методы классической селекции для получения сосны обыкновенной с заданной для нужд лесоперерабатывающей промышленности древесиной пока не дают желаемого результата. Данный вид с трудом поддается вегетативному размножению методом черенкования, в связи с чем методы биотехнологии являются наиболее перспективными для его массового размножения [2, 3].

Соматический эмбриогенез — перспективный биотехнологический метод массового тиражирования растений. Свое применение соматический эмбриогенез нашел как для размножения куль-

турных растений [4–7], так и для размножения редких и исчезающих видов [8–10]. Особенно актуально использование данного метода для медленнорастущих древесных растений, а также в программах лесной селекции [3, 11]. Преимуществом соматического эмбриогенеза является то, что большое число генетически идентичных соматических зародышей в культуре *in vitro* может быть получено в течение всего года.

К настоящему моменту разработаны достаточно подробные протоколы для получения соматических зародышей сосны обыкновенной [12–16]. Однако, по сравнению с другими представителями рода *Pinus*, сосна обыкновенная остается трудным видом для размножения путем соматического эмбриогенеза, в связи с чем оптимизация протоколов получения соматических зародышей для

нее до сих пор актуальна [3]. Ряд сложностей существует на стадии инициации: короткий промежуток времени, в течение которого экспланты вводятся в культуру *in vitro*, низкая частота инициации эмбрионного каллуса, подбор генотипов, обладающих компетентностью к соматическому эмбриогенезу [15, 17, 18]. Некоторые авторы отмечают, что поражение растений бактериальной и грибной инфекцией, которая часто встречается во всех тканях и органах хвойных, также сильно усложняет культивирование [19] и может выступать в роли факторов, лимитирующих рост и жизнедеятельность клеточных культур [20]. В связи с этим, важным этапом является подбор оптимального протокола предварительной стерилизации растительных эксплантов.

В литературе имеются сведения об использовании различных стерилизующих агентов для обработки растительного материала представителей семейства Pinaceae: этиловый спирт, гипохлорит натрия (кальция), диацид, перманганат калия, йод, а также растворы различных коммерческих моющих средств [14–16, 21–25]. Однако информация об их последующем влиянии на инициацию соматического эмбриогенеза встречается редко.

Целью нашего исследования стало определение оптимальных сроков сбора шишек *Pinus sylvestris* в условиях южной Карелии и подбор условий стерилизации растительного материала для введения в культуру *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Объектами исследования служили незрелые семена шестнадцати клонов плюсовых деревьев *P. sylvestris*, располагающихся в среднетаежной подзоне Карелии на Петрозаводской лесосеменной плантации I порядка (ЛСП I) (61.92° с.ш.; 34.41° в.д.). Шишки собирали на разных стадиях формирования зиготического зародыша с конца июня по начало августа 2020 и 2021 гг. Стадию развития зиготического зародыша определяли с помощью стереомикроскопа (Leica, Германия).

Поскольку период сбора незрелых семян для введения в культуру весьма ограничен, часть исследований (определение влияния стерилизующих агентов на всхожесть семян и контаминацию) проводили на зрелых семенах *P. sylvestris*, сбор которых производился в 2017 г. с деревьев, произрастающих в естественных фитоценозах (Олонецкий р-н Республики Карелия). Данные семена были предоставлены отделом “Карельская лесосеменная станция” филиала ФБУ Рослесозащита ЦЗЛ Ленинградской обл.

Стерилизация незрелых семян

В рамках исследования было апробировано три способа предварительной обработки растительного материала.

В 2020 г. для предварительной обработки незрелых семян был использован протокол, подобранный на основе исследований Третьяковой с соавт. [2, 22, 24, 26], и применяющийся при обработке семян *Pinus pumila*, *Pinus sibirica*, *Larix* sp. Зеленые шишки вскрывали с помощью скальпеля и доставали незрелые семена. Семена заворачивали в марлевые мешочки и помещали в 15% мыльный раствор на 10 мин, после чего промывали под проточной водой в течение 3 мин. Марлевые мешочки с семенами переносили в 0.3% раствор перманганата калия на 10 мин и далее промывали дистиллированной водой в трехкратной повторности. Затем в условиях стерильного бокса микробиологической безопасности семена обрабатывали 70% этанолом (10 мин), трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой и обрабатывали 15% раствором перекиси водорода (5 мин), с последующей трехкратной промывкой.

В 2021 г. незрелые семена извлекали из шишек, заворачивали в марлевые мешочки и обрабатывали в мыльном растворе в течение 10 мин, затем, после промывания под проточной водой, в стерильных условиях семена помещали в раствор “Белизны” на 10 мин. Далее семена промывали в трех порциях стерильной дистиллированной воды, после чего обрабатывали 20% раствором перекиси водорода в течение 10 мин с последующей трехкратной промывкой стерильным дистиллятом.

Также в 2021 г. была апробирована методика по стерилизации зеленых шишек *P. sylvestris*. Шишки, собранные в июне, 1.5 мес. хранили при низких положительных температурах (4 °С) в холодильнике. Для обработки шишек были опробованы два протокола по стерилизации, описанные Lelu с коллегами [27] и Abrahamsson с соавт. [16]. Согласно первому, шишки помещали в 95% раствор этанола с добавлением капли Твин 20 и выдерживали в течение 20 мин, после чего промывали в стерильной дистиллированной воде. По второму протоколу зеленые шишки 1–2 мин обрабатывали 70% этанолом, затем перемещали в разбавленный коммерческий отбеливатель (содержащий 0.5% гипохлорит натрия), дополненный парой капель Твин 20 на 20 мин. После поверхностной стерилизации согласно описанным протоколам, шишки вскрывали и извлекали незрелые семена в стерильных условиях. Семена ничем не обрабатывали.

Таблица 1. Варианты и продолжительность стерилизующей обработки зрелых семян
Table 1. Types and duration of sterilization treatments applied to mature seeds

№	Мыло Soap	KMnO ₄ 10%	“Белизна” commercial bleach “Belizna”	C ₂ H ₅ OH 70%	H ₂ O ₂ 15%	H ₂ O ₂ 20%	HCl 0.1N%	
1	10	—	10	5	5	—	—	
2		—	10	5	—	—	—	
3		—	—	5	5	—	—	
4		—	—	5	—	—	—	
5		—	—	—	5	—	—	
6		—	—	—	—	5	—	
7		10	—	—	10	5	—	
8		—	—	10	—	—	7	10
9		—	—	10	—	—	10	—
10		—	—	10	—	5	—	—
Контроль Control	—	—	—	—	—	—	—	

Примечание: продолжительность обработки стерилизующим компонентом указана в минутах.
 Note: The duration of the sterilization treatment is indicated in minutes.

Введение мегagamетофитов в культуру in vitro

Из незрелых семян извлекали мегagamетофиты, содержащие зиготические зародыши, которые помещали на поверхность питательной среды DCR с модификацией [28], содержащей 9 мМ 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2.4 D) и 4.4 мМ 6-бензиламинопурина (6-БАП) [16]. В качестве загустителя использовали Gelrite 3.5 г/литр питательной среды. Также среда содержала антибиотик широкого спектра Цефотоксим. Экспланты на питательных средах помещали в термостат и культивировали в темноте при температуре 22 ± 1 °С. Регистрацию заражения проводили каждые три дня.

Стерилизация зрелых семян

В исследовании использовали наиболее часто встречающиеся в литературе и более доступные стерилизующие растворы, которые применяются при соматическом эмбриогенезе хвойных [2, 22, 24, 29–33 и др.].

Зрелые семена *P. sylvestris* выдерживали в 15% мыльном растворе в течение 10 мин и промывали под проточной водой, затем в условиях бокса микробиологической безопасности семена обрабатывали в соответствии с методиками, представленными в таблице 1, с трехкратной промывкой в стерильной дистиллированной воде между использованием различных агентов.

Влияние различных концентраций и времени воздействия перекиси водорода изучали отдельно от других стерилизующих агентов, так как в литературе описан широкий диапазон концентраций,

используемых при обработке растительного материала [30, 31, 33]. Зрелые семена в стерильных условиях обрабатывали раствором перекиси водорода в концентрациях 5, 7, 10, 15, 20% и экспозиции для каждой концентрации — 5, 6, 7, 8, 10 мин, затем промывали три раза в стерильной дистиллированной воде.

Оценка всхожести и энергии прорастания обработанных семян

Обработанные семена в условиях ламинар-бокса помещали по 30 штук в чашки Петри на двухслойную фильтровальную бумагу, смоченную стерильной дистиллированной водой. Семена проращивали на свету при комнатной температуре. Энергию прорастания определяли на 7 сут, всхожесть на 15 сут в соответствии с ГОСТ 13056.6-97 [34]. Повторность опыта трехкратная. Контаминацию оценивали на 7 сут исследования.

Математическая обработка данных

Статистическая обработка полученных экспериментальных данных осуществлялась в программе PAST. Сравнение выборок проводилось с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0.05$.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП “Карельский научный центр” и при поддержке НОЦ “Российская Арктика: новые материалы, технологии и методы исследования”.

Таблица 2. Сумма эффективных температур (градусо-дней) в летний сезон 2020 и 2021 гг. на ЛСП I
Table 2. The effective temperatures sum (number of degree days) in summers of 2020 and 2021 at Petrozavodsk seed orchard

2020 год 2020			2021 год 2021		
дата date	сумма градусо-дней sum of degree-days	стадия развития зиготического зародыша stage of the zygotic embryo development	дата date	сумма градусо-дней sum of degree-days	стадия развития зиготического зародыша stage of the zygotic embryo development
01.06	109.4	1	01.06	162	1–2
11.06	225.3	2	11.06	276.1	2–3
21.06	340.8	3	20.06	400.7	3–4
27.06	406.8	3–4	21.06	422.6	3–4
01.07	444.1	4–5	01.07	593.0	5
11.07	555.8	5	06.07	664.7	5–6
20.07	655.5	5–6	11.07	761.3	7–8
21.07	669.4	6–7	21.07	926.7	9
01.08	787.6	8–9	01.08	1057.7	

Примечание: полужирным шрифтом выделены оптимальные суммы эффективных температур для сбора зеленых шишек. Стадия развития зиготического зародыша указана согласно данным Pullman и Webb (рис. 1) [37].

Note: In boldface – the optimum accumulation of effective temperatures for collecting green cones. The zygotic embryo development stages are denoted according to Pullman and Webb (Fig. 1) [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение оптимальной даты сбора шишек для введения мегегаметофитов в культуру in vitro в 2020–2021 г.

У видов рода *Pinus* в качестве эксплантов обычно используют мегегаметофиты с незрелыми зиготическими зародышами до стадии дифференцировки семядолей [16]. Согласно данным литературы, инициация каллусообразования в культуре *in vitro* у *P. sylvestris* отмечается при сборе шишек в период, соответствующий сумме эффективных температур 402–650 градусо-дней (при базовой температуре 5 °C) [15, 35, 36]. В результате проведенных исследований установлено, что на ЛСП I в 2020 г. оптимальный период для сбора незрелых шишек составлял 24 дня (с 27.06 по 20.07), тогда как в 2021 г. “временное окно” сократилось до 17 дней (с 20.06 по 06.07). В табл. 2 представлены значения сумм среднесуточных температур на начало каждой декады, начало и конец оптимального периода согласно данным литературы [15, 35, 36], а также стадия развития зиготического зародыша [37]. Подобное “временное окно” необходимо отслеживать ежегодно.

Введение мегегаметофитов в культуру in vitro в 2020 г.

В 2020 г. для определения стадий развития зиготических зародышей на ЛСП I с июня по начало августа были собраны зеленые шишки. Формирование зиготического зародыша – постепенный

многоэтапный процесс, в результате которого на одном конце гипокотила формируются семядоли, на другом зародышевый корешок [18].

Стадии развития зиготических зародышей подробно описаны в литературе для *Pinus taeda* [37, 38]. Авторы отмечают, что наиболее подходящими для введения в культуру *in vitro* являются 2–4 стадии развития зиготических зародышей (рис. 1). Согласно данным других исследователей, зиготические зародыши до дифференцировки семядолей являются оптимальными для инициации соматического эмбриогенеза [16]. Начиная со стадии 6 (рис. 1), у зародыша формируются семядоли, которые развиваются в семядольные листья. Stasolla и Yeung [39] отмечают, что у представителей рода *Pinus* крайне тяжело происходит перестройка программы развития, и более ранние стадии имеют больше шансов на дедифференцировку, а затем и на образование пролиферирующих проэмбриогенных масс [40, 41], и, следовательно, на получение соматических зародышей.

В рамках проведенного исследования мы наблюдали развитие мегегаметофитов (рис. 2): от прозрачного и мягкого, до белого плотного эндосперма. В развитии зиготического зародыша были отмечены следующие изменения: зародыш становился белым и непрозрачным, находился на халазальном конце коррозийной полости (стадия 3, рис. 1), затем его вершина принимала куполообразную форму (стадия 4, рис. 1). На следующей стадии отчетливо был виден примордиум апикальной меристемы (стадия 5, рис. 1) [37, 38].

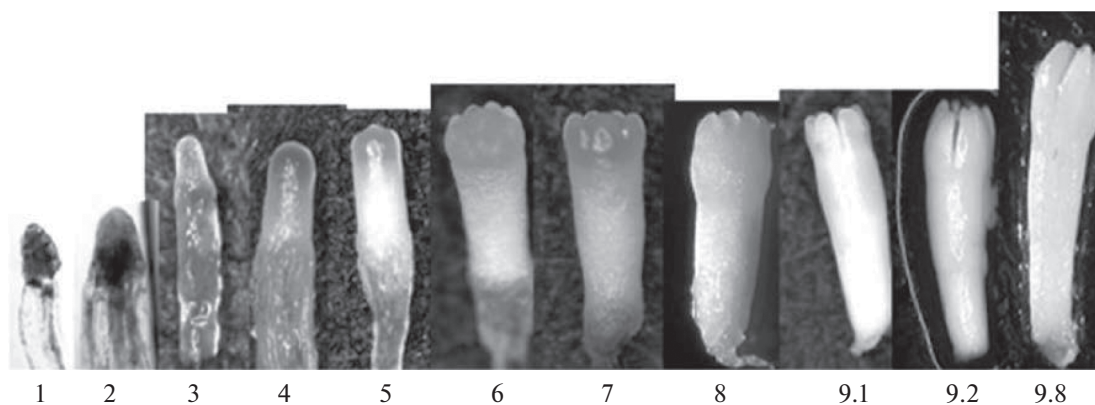


Рис. 1. Последовательность стадий развития зиготического зародыша у *Pinus taeda* [38]. Цифрами 1–9.8 обозначены стадии развития зародыша.

Fig. 1. Sequence of the zygotic embryo development in *Pinus taeda* [38]. The numbers 1–9.8 indicate the stages of zygotic embryo development.

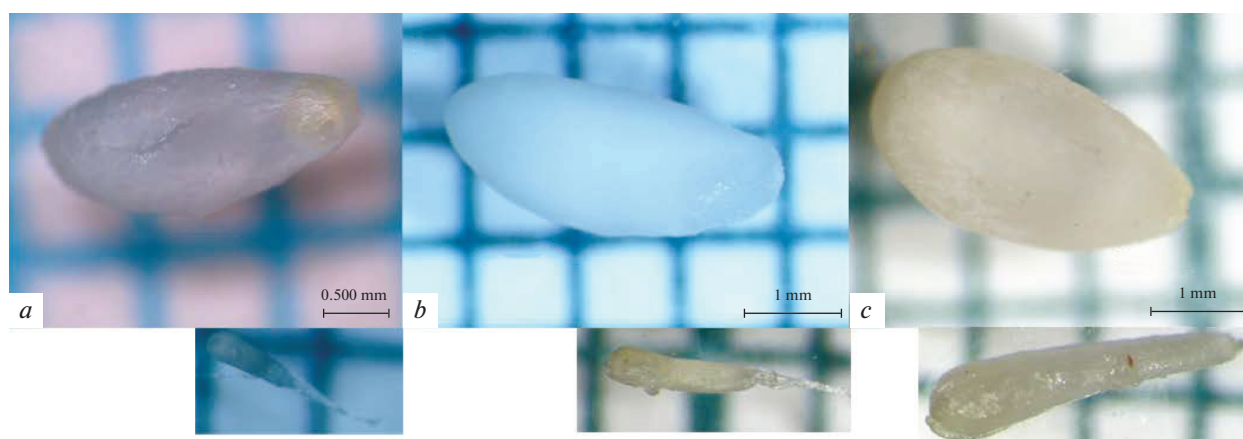


Рис. 2. Мегagamетафиты и находящиеся в них зародыши *Pinus sylvestris* введенные в культуру *in vitro*. *a* – мегagamетафит и зиготический зародыш на 4 стадии развития; *b* – на 5 стадии развития; *c* – на 9 стадии развития. Масштабная линейка: *a* – 0.5 мм; *b–c* – 1 мм.

Fig. 2. *Pinus sylvestris* megagametophytes and embryos introduced into *in vitro* culture. *a* – megagametaphyte and zygotic embryo at the 4th stage of development; *b* – at the 5th stage of development; *c* – at the 9th stage of development. Scale bar: *a* – 0.5 mm; *b–c* – 1 mm.

В более поздний период (конец июля–начало августа) регистрировали 6–8 стадии развития зиготического зародыша. На данных стадиях у зародыша были отчетливо видны развивающиеся семядоли (рис. 1).

В летний сезон 2020 г. после двух месяцев культивирования инициация соматического эмбриогенеза не регистрировалась. Заражение также отсутствовало, никаких признаков развития и/или гибели мегagamетофитов мы не наблюдали. Вероятно, причиной полученного результата стало негативное влияние стерилизующих растворов, используемых в исходном протоколе предварительной стерилизации. Для проверки этой гипотезы было изучено влияние разных способов стерилизации на всхожесть зрелых семян *P. sylvestris*.

Способы стерилизации зрелых семян

Подбор условий стерилизации является важнейшим этапом в процессе культивирования растительных тканей. Исследователям необходимо не допустить контаминации в культуре *in vitro* и при этом сохранить жизнеспособность эксплантов. В литературе [14, 16, 27, 30, 33, 42] встречается множество протоколов предварительной стерилизации растительного материала для рода *Pinus*. Все протоколы условно можно разделить на три типа: обработка только шишек, обработка шишек, а затем семян, обработка семян, а также мегagamетафитов.

В зарубежных источниках описаны протоколы поверхностной стерилизации зеленых шишек без

дальнейшей обработки незрелых семян. Шишки обеззараживают 70–96% этанолом [14, 16, 27, 42], 0.5–1% гипохлоритом натрия [16, 35]. Lelu-Walter с соавт. [14] сообщают о том, что при поверхностной стерилизации шишек, без какой-либо обработки семян, уровень контаминации составляет менее 0.1%.

Еще одним вариантом стерилизации растительного материала является обеззараживание как шишек, так и семян. В этом случае для обработки шишек также используют 70% этанол [30, 32, 33] и коммерческие моющие средства [32]. Семена стерилизуют раствором перекиси водорода, к которому иногда добавляют несколько капель Твин 20 [30, 32, 33]. Время обработки семян перекисью водорода также отличается и варьирует от 8 [30] до 15 мин [32, 33, 43].

Третий тип протоколов стерилизации чаще встречается в отечественной литературе. Так, например, Третьякова и Шуваев [24] обрабатывали семена *Pinus pumila* 0.3% перманганатом калия, затем извлекали мегагаметофиты из семян и стерилизовали 3% спиртовым раствором йода, с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде, после чего на питательную среду помещали зиготические зародыши.

В наших исследованиях предварительная оценка влияния на всхожесть семян различных концентраций перекиси водорода (5, 7, 10, 15, 20%), а также длительности обработки по времени (5, 6, 7, 8, 10 мин) показала, что ни один вариант статистически значимо не отличается от контроля (семена, не обработанные стерилизующими растворами). Хотя, в литературе представлены данные по использованию слабых растворов перекиси водорода в качестве предпосевной обработки семян с целью повышения всхожести и продуктивности растительного материала [44]. Орынбаев и Джалилов [45] установили, что обработка семян капусты 2–4% растворами перекиси водорода не влияет на всхожесть семян (опытные образцы достоверно не отличаются от контроля), но способствует уменьшению развития сосудистого бактериоза. Pitel и Wang [46] описывают положительное влияние предпосевной обработки семян *Pinus monticola* перекисью водорода. Авторы отмечают положительный эффект воздействия 35% раствора перекиси водорода, после обработки которой всхожесть семян возросла (35.4%) в отличие от контроля (10.7%).

В рамках исследования было установлено, что из 10 апробированных вариантов предварительной стерилизации (табл. 1) на всхожесть зрелых семян *P. sylvestris* в сравнении с контролем не оказала воздействие обработка согласно протоколам № 4, 6, 9 и 10 (рис. 3.1, 4), что свидетельствует о безопасности для эксплантов растворов перекиси водорода и “Белизны”, как по отдельности, так и

при сочетании данных агентов. Полученные нами данные соответствуют сведениям, представленным в литературе [46–49]. Для многолетнего травянистого растения рода *Agastache* описано отсутствие достоверных отличий между всхожестью семян обработанных 5% гипохлоритом натрия и нестерильным семенным материалом – контрольными растениями [48]. Плаксиенко с соавт. [49] отмечают улучшение показателей энергии прорастания и всхожести семян пшеницы после обработки растворами гипохлорита натрия различных концентраций. Wenny и Dumgoese [47] сообщают о позитивном влиянии обработки семян раствором, состоящим из двух частей коммерческого отбеливателя (гипохлорит натрия) и трех частей воды, на примере сосны обыкновенной. Авторы обращают внимание на то, что такая обработка снижает поражение грибной инфекцией и повышает всхожесть семян.

Стоит отметить, что на 15 сут после предварительной обработки контаминация наблюдалась во всех чашках Петри кроме тех, которые стерилизовали в соответствии с протоколами № 2 и 3 (рис. 3.2), что может свидетельствовать о высокой стерилизующей способности 70% этанола, в отличие от остальных исследуемых растворов. При этом всхожесть семян, обработанных раствором спирта, не превышала 2 и 20% соответственно (рис. 3.1). Это может свидетельствовать об отрицательном влиянии этанола на всхожесть зрелых семян сосны обыкновенной.

В некоторых опытных образцах контаминация была зарегистрирована на 7 сут после начала эксперимента (рис. 3). Часто встречалась грибная инфекция, которая развивалась, несмотря на обработку семян стерилизующими растворами (рис. 5). В литературе описывается проблема поражения семян и проростков различными представителями царства Грибы [19, 20, 47]. Авторы сообщают, что бактериальная и грибная инфекции часто встречаются во всех тканях и органах хвойных [19], что затрудняет культивирование в асептических условиях [20].

Введение мегагаметофитов в культуру in vitro в 2021 г.

В рамках данного исследования в культуру *in vitro* в 2021 г. было введено 674 экспланта с зародышами на 3–6 стадиях развития. Незрелые семена стерилизовали в соответствии с протоколом № 9 (табл. 1). Заражение бактериальной и грибной инфекцией было зарегистрировано в среднем в $21.7 \pm 4.8\%$ исследуемого растительного материала. Необходимо отметить, что экспланты собранные с 12 клонов плюсовых деревьев *P. sylvestris* на ЛСП I не подвергались контаминации в условиях *in vitro*. Тогда как все незрелые семена, собранные с 2 деревьев, были инфицированы, не-

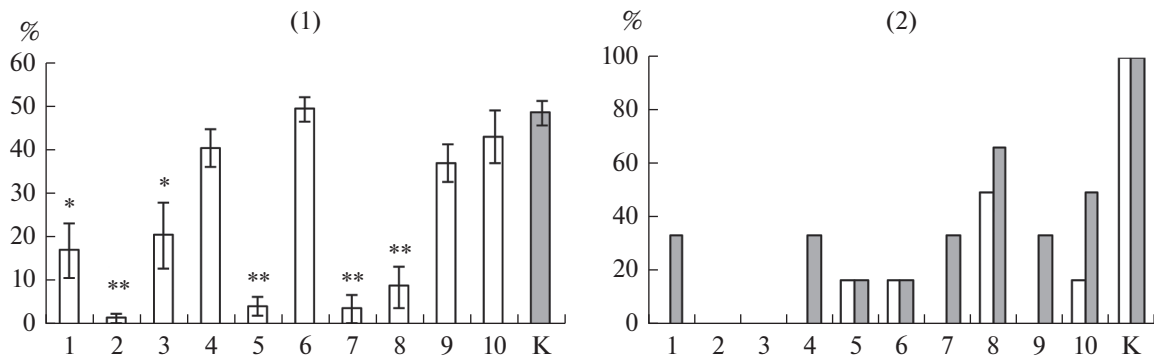


Рис. 3. Лабораторная всхожесть семян *Pinus sylvestris* (1) (белые столбики – опытные варианты; серый столбик – контроль) и доля образцов, подвергшихся контаминации (2) (белый столбик – 7 сут; серый столбик – 15 сут) при разной стерилизующей обработке.

Статистически значимые различия между контролем и анализируемыми вариантами предварительной обработки обозначены: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$. (Цифрами 1–10 обозначен номер протокола обработки табл. 1, буквой ‘К’ обозначен контроль).

По горизонтали: 1) ‘Белизна’, 70% этанол, 15% перекись водорода; 2) ‘Белизна’, 70% этанол; 3) 70% этанол, 15% перекись водорода; 4) ‘Белизна’; 5) 70% этанол; 6) 15% перекись водорода; 7) 10% KMnO_4 , 70% этанол, 15% перекись водорода; 8) ‘Белизна’, 20% перекись водорода, 0.1% HCl ; 9) ‘Белизна’, 20% перекись водорода; 10) ‘Белизна’, 15% перекись водорода.

Fig. 3. Laboratory seed germination (1) (white bars – experimental treatments; gray bar – control) and the proportion of contaminated samples (2) (white bar – 7 days; gray bar – 15 days) under different sterilization treatment.

Statistically significant differences between the control and the experimental treatments are indicated: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$. (Numbers 1–10 indicate the treatments according to Table 1, the letter ‘K’ denotes control).

X-axis: sterilizing agents – 1) commercial bleach ‘Belizna’, 70% ethanol, 15% hydrogen peroxide; 2) commercial bleach ‘Belizna’, 70% ethanol; 3) 70% ethanol, 15% hydrogen peroxide; 4) commercial bleach ‘Belizna’; 5) 70% ethanol; 6) 15% hydrogen peroxide; 7) 10% KMnO_4 , 70% ethanol, 15% hydrogen peroxide; 8) commercial bleach ‘Belizna’, 20% hydrogen peroxide, 0.1% HCl ; 9) commercial bleach ‘Belizna’, 20% hydrogen peroxide; 10) commercial bleach ‘Belizna’, 15% hydrogen peroxide.

смотря на предварительную стерилизацию эксплантов. При этом заражение проявлялось на 8–12 сут эксперимента, после того как мегагаметофит набухал и ткани, окружающие зародыш, начали разрушаться. В литературе встречается информация об эндофитных микроорганизмах, находящихся внутри различных тканей сосны [50–52]. Liliĵa с соавт. были выделены эндофиты из шишек и зрелых семян сосны обыкновенной [49]. Исследования проводились на растительном материале после поверхностной стерилизации гипохлоритом натрия в течение 5 мин. Среди выделенных микроорганизмов были представители как грибов, так и бактерий [50].

В результате культивирования мегагаметофитов *P. sylvestris* в течение 9 недель культуру клеток получить не удалось. Важно отметить, что из некоторых зародышей, введенных в культуру *in vitro*, развивались растения. Доля эксплантов, из которых формировались растения варьировала в зависимости от генотипа от 0 до 33% и в среднем составляла $9.4 \pm 10\%$.

Одной из причин отсутствия образования каллуса у части эксплантов может являться то, что некоторые зародыши находились на более поздней стадии развития (стадии 6–9, рис. 1). Так, Lelu с коллегами [27] описали развитие зиготического зародыша на питательной среде инициации с дальнейшим формированием растения. Авторы

сообщают, что образование растений происходило у зародышей на предсемядольной стадии развития – поздней, по мнению исследователей, для дедифференцировки и инициации каллусообразования. Другой причиной может являться то, что часть деревьев, с которых были собраны шишки, обладали низким репродуктивным потенциалом и не способны образовывать эмбриогенный каллус. Так, Niskanen с коллегами [53] показали, что на успех инициации влиял генотип как материнского, так и отцовского растения. Haggman с соавт. [36] описывают, что на успех индукции соматического эмбриогенеза влияние оказывали генотип интактного растения и среда инициации. Также авторы предполагают, что дата сбора эксплантов в рамках оптимального периода не влияет на инициацию соматического эмбриогенеза.

Мы предполагаем, что отсутствие формирования каллуса из незрелых зародышей может быть связано с неподходящим составом питательной среды. Исследование с использованием в качестве эксплантов зрелых семян *P. sylvestris*, собранных с Петрозаводской ЛСП и естественного сосняка на севере Карелии, показало, что на питательной среде (DCR), содержащей повышенные концентрации фитогормонов, образовывался каллус [54].

Часть собранных зеленых шишек после 1.5 мес. нахождения в холодильнике была обработана сте-

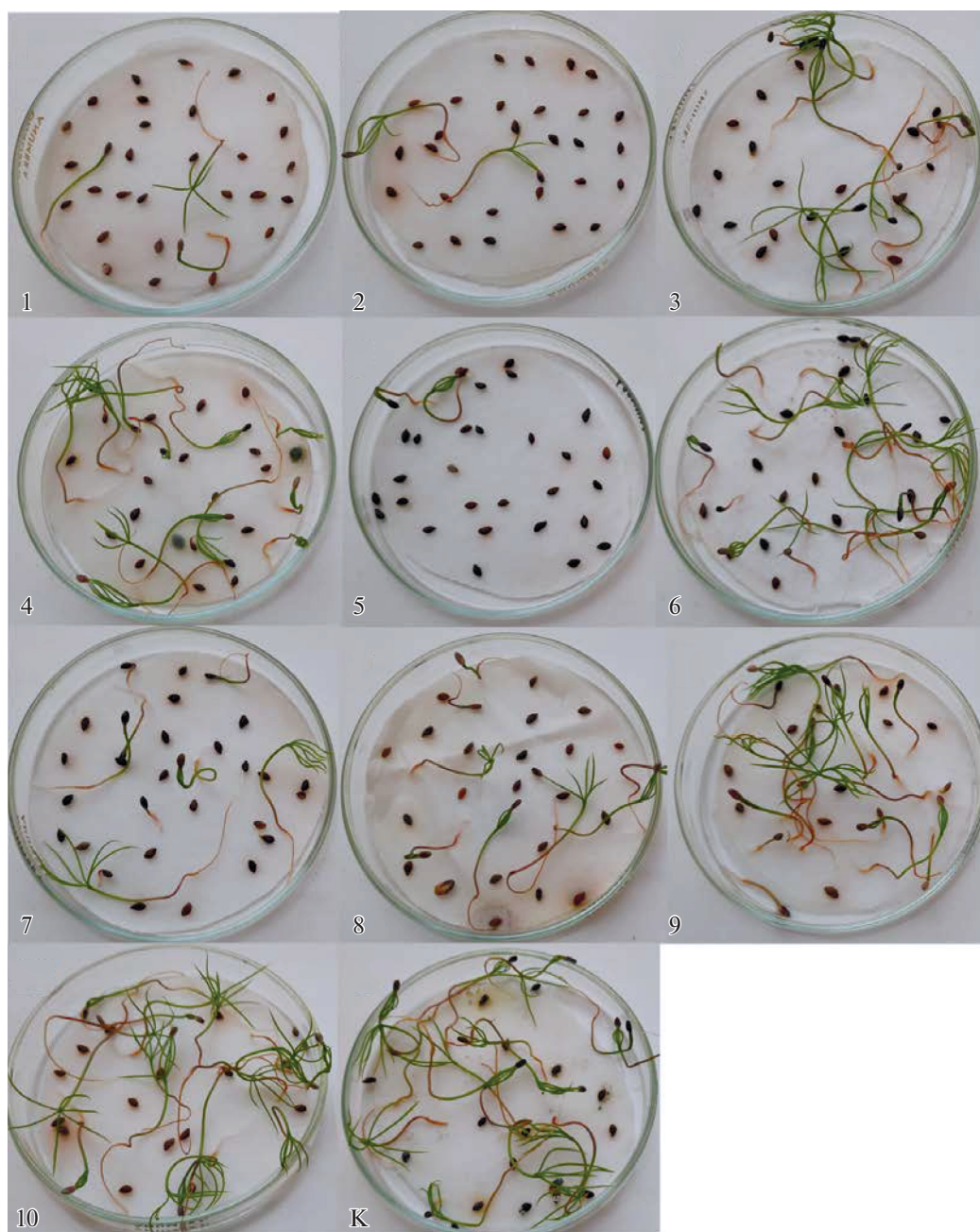


Рис. 4. Лабораторная всхожесть семян *Pinus sylvestris* при различных вариантах предварительной стерилизации (цифрами обозначены номера обработок в соответствии с табл. 1).

Fig. 4. Laboratory germination of *Pinus sylvestris* seeds under various sterilization treatments (numbers indicate the treatments according to Table 1, “K” denotes control).

рилизующими растворами (95% раствор этанола с добавлением капли Твин 20; 70% этанолом, разбавленный коммерческий отбеливатель, содержащий 0.5% гипохлорит натрия, дополненный парой капель Твин 20). Из шишек в стерильных условиях были извлечены мегагаметофиты, которые помещались на питательную среду без предварительной обработки семян. В результате после

30 сут культивирования контаминация не наблюдалась.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Период сбора незрелых шишек отличается в различных регионах и определяется по сумме среднесуточных температур. В Карелии на ЛСП I

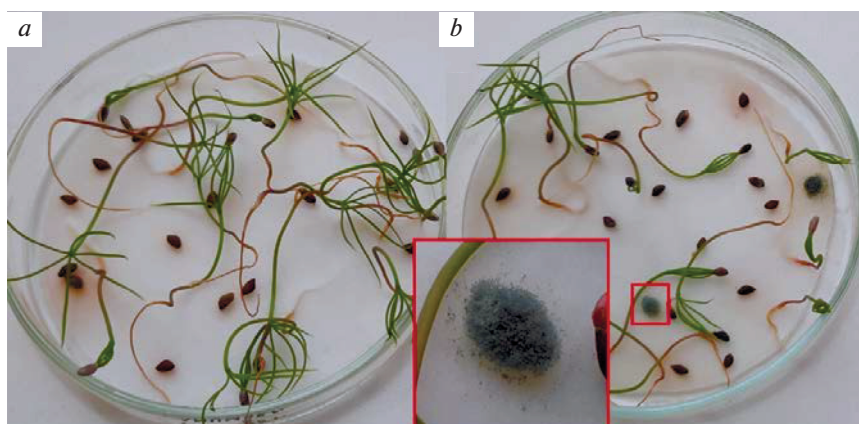


Рис. 5. Образцы проросших семян *Pinus sylvestris* без заражения (а) и с заражением (б).
Fig. 5. Uncontaminated (a) and contaminated (b) samples of germinated *Pinus sylvestris* seeds.

в 2020 г. оптимальным периодом для сбора растительного материала был конец третьей декады июня—вторая декада июля (сумма эффективных температур при базовой температуре +5 °С — 406.8—669 градусо-дней). В 2021 г. ввиду аномально жаркого лета “временное окно” для сбора зеленых шишек сократилось — третья декада июня—первая декада июля (400.7—664.7 градусо-дней). Зародыши, собранные в этот период, находились на оптимальных (с 3 по 6) стадиях развития для инициации соматического эмбриогенеза. Тем не менее, такой мониторинг сумм температур и многократный сбор растительного материала необходимо проводить ежегодно.

Стоит отметить, что короткий период сбора растительного материала значительно сокращает объемы проводимых работ. В связи с этим, для минимизирования подобных ограничений рекомендуем собирать зеленые шишки в более раннее время (до 3 стадии развития зиготического зародыша) и хранить их при низких положительных температурах (4 °С). При подобном хранении в холодильнике развитие зародышей продолжается, но медленнее, что предоставляет исследователям больше времени для работы с растительным материалом.

В результате проведенного исследования установлено влияние различных стерилизующих агентов на всхожесть зрелых семян *P. sylvestris*. Ингибирующее действие на прорастание семян оказал раствор 70% этанола. Наиболее удачным вариантом предварительной обработки, по нашему мнению, является использование коммерческого отбеливателя “Белизна” и 15–20% перекиси водорода. Наряду с выбранным протоколом предварительной стерилизации при введении в культуру *in vitro* мегагаметофитов из незрелых семян *P. sylvestris* был апробирован вариант стерилизации зеленых шишек и извлечением незрелых семян в стерильных условиях ламинар-бокса.

Данный способ стерилизации оказался эффективным, поскольку не оказывал влияния на жизнеспособность эксплантов и предотвращал инфицирование мегагаметофитов в культуре *in vitro*. Однако необходимо учитывать тот факт, что зеленые шишки и поверхность незрелых семян могут быть заражены бактериальной или грибной инфекцией и сочетание различных способов обработки (стерилизация как зеленых шишек, так и семян) может способствовать снижению контаминации в культуре *in vitro*. Но наличие эндофитных организмов в интактных растениях затрудняет использование их органов и тканей для инициации соматического эмбриогенеза, тем самым усложняя поиск деревьев-доноров.

Необходимым этапом при запуске работ с культурой *in vitro* является подбор оптимальных условий культивирования. Следует обратить внимание на то, что рекомендованные протоколы для получения соматических зародышей, могут быть не эффективными для объектов из разных географических районов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН.

Авторы благодарят отдел “Карельская лесосеменная станция” Центра защиты леса Ленинградской области (ФБУ Рослесозащита) за предоставленные для изучения семена *Pinus sylvestris*. Также выражают благодарность д. с.-х. н., заведующему лабораторией лесных биотехнологий Института леса КарНЦ РАН Раевскому Борису Владимировичу и к.б.н, старшему научному сотруднику, руководителю аналитической лаборатории Института леса КарНЦ РАН Никеровой Ксении Михайловне за помощь в сборе шишек с клонов плюсовых деревьев на Петрозаводской ЛСП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Houston D.T., de Rigo D., Caudullo G.* 2016. *Pinus sylvestris* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. – In: European atlas of forest tree species. Luxembourg. P. 132–133.
https://ies-ows.jrc.ec.europa.eu/efdac/download/Atlas/pdf/Pinus_sylvestris.pdf
2. *Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Шуваев Д.Н., Пак М.Э.* 2012. Перспективы микроклонального размножения хвойных в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез. – Хвойные бореальной зоны. 30(1–2): 180–186.
<https://elibrary.ru/item.asp?id=20285298>
3. *Новичонок Е.В., Галибина Н.А., Раевский Б.В., Ершова М.А., Гуляева Е.Н.* 2019. Соматический эмбриогенез сосны обыкновенной: современное состояние вопроса, перспективы применения в лесном хозяйстве. – Труды КарНЦ РАН. 12: 5–18.
<https://doi.org/10.17076/eb1118>
4. *Noerhadi T., Yasuda T., Siregar A., Budji R.G.* 1985. Induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica*. – Proc. Inst. Tehnol. Bandung. 2–3: 41–49.
<https://journals.itb.ac.id/index.php/jmfs/article/download/9518/3599/27343>
5. *Machado A.D., Puschmann M., Puhlinger H., Kremen R., Katinger H., Machado L.D.* 1995. Somatic embryogenesis of *Prunus subhirtella autumn rosa* and regeneration of transgenic plants after *Agrobacterium*-mediated transformation. – Plant Cell Reports. 14(6): 335–340.
<https://doi.org/10.1007/bf00238592>
6. *Garin E., Grenier E., Grenier-De March Gh.* 1997. Somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). – Plant Cell, Tissue, Organ Cult. 48(2): 83–91.
<https://doi.org/10.1023/a:1005729621557>
7. *Малаева Е.В.* 2018. Изучение особенностей соматического эмбриогенеза представителей рода *Begonia* L. в культуре *in vitro*. – Субтропическое и декоративное садоводство. 65: 109–117.
<https://doi.org/10.31360/2225-3068-2018-65-109-117>
8. *Litz R.E., Moon P.A., Chavez Avila V.M.* 2005. Somatic embryogenesis and regeneration of endangered cycad species. – II International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species. 692: 75–80.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.692.8>
9. *Kang H.D., Moon H.K., Lee S.K.* 2014. Micropropagation via somatic embryogenesis of rare and endangered species, *Acanthopanax seoulenses* Nakai. – Forest science and technology. 10 (4): 190–196.
<https://doi.org/10.1080/21580103.2014.913536>
10. *Мурасева Д.С.* 2016. Размножение и сохранение *in vitro* редких и эндемичных видов рода *Fritillaria* L.: Дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск. 149 с.
11. *Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Шуваев Д.Н.* 2014. Каллусогенез и индукция соматического эмбриогенеза у гибридных зародышей семян *Pinus sibirica*. – Физиология растений. 61(2): 297–303.
<https://doi.org/10.7868/s0015330314020171>
12. *Park Y.S., Lelu-Walter M.A., Harvengt L., Trontin J.F., MacEacheron I., Klimaszewska K., Bonga J.M.* 2006. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. – РСТОС. 86(1): 87–101.
<https://doi.org/10.1007/s11240-006-9101-7>
13. *Park Y.-S., Beaulieu J., Bousquet J.* 2016. Multi-varietal forestry integrating genomic selection and somatic embryogenesis. In: Vegetative propagation of forest trees. National Institute of Forest Science. Online edition. P. 302–322.
https://www.iufro.org/download/file/24668/4296/vegetative-propagation-of-forest-trees_pdf
14. *Lelu-Walter M.A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K.* 2008. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis. – РСТОС. 92(1): 31–45.
<https://doi.org/10.1007/s11240-007-9300-x>
15. *Aronen T., Pehkonen T., Rynänen L.* 2009. Enhancement of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Pinus sylvestris*. – Scan. J. For. Res. 24(5): 372–383.
<https://doi.org/10.1080/02827580903228862>
16. *Abrahamsson M., Clapham D., von Arnold S.* 2018 Somatic Embryogenesis in Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.). In: Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Forestry Sciences. V. 84. P. 123–133.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6_9
17. *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: Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications. P. 319–365.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_19
18. *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>
19. *Красноперова В.В., Бухарина И.Л., Исламова Н.А.* 2016. Особенности введения в культуру *in vitro* хвойных древесных пород. – АгроЭкоИнфо. 2: 7 с.

20. Дунаева С.Е., Оследкин Ю.С. 2015. Бактериальные микроорганизмы, ассоциированные с тканями растений в культуре *in vitro*: идентификация и возможная роль. — Сельскохозяйственная биология. 50(1): 3–15. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.1.3rus>
21. Плынская Ж.А., Аешина Е.Н., Величко Н.А. 2008. Культивирование хвойных в условиях *in vitro*. — Хвойные бореальной зоны. 25(1–2): 68–70.
22. Третьякова И.Н., Барсукова А.В. 2012. Соматический эмбриогенез лиственниц и кедра сибирского в Сибири. — Лесоведение. 6: 63–70. <http://lesovedenie.ru/index.php/forestry/article/view/275>
23. Зайцева Ю.Г., Новикова Т.И. 2014. Клональное микроразмножение *Rhododendron dauricum*. — Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. 12(1): 26–31. <https://elibrary.ru/item.asp?id=21271152>
24. Третьякова И.Н., Шуваев Д.Н. 2015. Соматический эмбриогенез *Pinus pumila* и продуктивность эмбриогенных линий при длительном культивировании *in vitro*. — Онтогенез. 46(5): 327–337. <https://doi.org/10.7868/s0475145015050092>
25. Кох Ж.А., Литовка Ю.А., Маколова П.В., Шабанова К.А., Павлов И.Н. 2020. Биохимический состав вегетативных эксплантов и каллусов *Pinus sibirica* DuRoi. — Химия растительного сырья. 4: 395–403. <https://doi.org/10.14258/jcrpm.2020048530>
26. Третьякова И.Н., Ижболдина М.В. 2009. Индукция соматического эмбриогенеза у кедра сибирского. — Лесоведение. 5: 43–49. <https://elibrary.ru/item.asp?id=13500459>
27. Lelu M.-A., Bastien C., Drugeault A., Gouez M.-L., Klimaszczyńska K. 1999. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulator. — Physiologia Plantarum. 105(4): 719–728. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.105417.x>
28. Burg K., Helmersson A., Bozhkov P., von Arnold S. 2007. Developmental and genetic variation in nuclear micro satellite stability during somatic embryogenesis in pine. — J. Exp. Bot. 58(3):687–698. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl241>
29. Широков А.И., Крюков Л.А. 2012. Основы биотехнологии растений: электронное учебно-методическое пособие. Нижний Новгород. 49 с. http://www.unn.ru/pages/e-library/methodmaterial/files/Method_Shirokov_Kryukov.pdf
30. Montalbán I.A., Moncaleán P. 2018. *Pinus radiata* (D. Don) Somatic Embryogenesis. In: Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants. Forestry Sciences. V. 84. P. 1–11. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6_1
31. Pullman G. 2018. Embryogenic Tissue Initiation in Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.). In: Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Forestry Sciences. V. 84. P. 13–32. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6_2
32. Celestino C., Carneros E., González-Cabrero N., Hernández I., Toribio M. 2018. Stone Pine *Pinus pinea* L. In: Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Forestry Sciences. V. 84. P. 63–81. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6_5
33. Pereira C., Montalbán I.A., Correia S.I., Canhoto J., Moncaleán P. 2018. Aleppo pine *Pinus halepensis* Mill. In: Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Forestry Sciences. V. 84. P. 159–166. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6_12
34. ГОСТ 13056.6-97. 1998. Межгосударственный стандарт. Метод определения всхожести. Семена деревьев и кустарников. Дата введения: 1998-07-01. М. 27 с. <https://docs.cntd.ru/document/1200025567>
35. Keinonen-Mettälä K., Jalonen P., Eurola P., von Arnold S., von Weissenberg K. 1996. Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris*. — Scand. J. For. Res. 11(1–4): 242–250. <https://doi.org/10.1080/02827589609382933>
36. Häggman H., Jokela A., Krajinakova J., Kauppi A., Niemi K., Aronen T. 1999. Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. — J. Exp. Bot. 50(341):1769–1778. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.341.1769>
37. Pullman G.S., Webb D.T. 1994. An embryo staging system for comparison of zygotic and somatic embryo development. — In: Proc TAPPI Biol Sci Symp. (Minneapolis, MN, USA October 3–6.1994). p. 31–34. <http://hdl.handle.net/1853/1824>
38. Cairney J., Pullman G.S. 2007. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. — New Phytol. 176(3): 511–536. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02239.x>
39. Stasolla C., Yeung E.C. 2003. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. — Plant Cell, Tissue Organ Cult. 74(1): 15–35. <https://doi.org/10.1023/A:1023345803336>

40. Mo L.H., von Arnold S. 1991. Origin and Development of Embryogenic Cultures from Seedlings of Norway Spruce (*Picea abies*). — J. Plant Physiol. 138(2): 223–230.
[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80275-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80275-0)
41. Arnold S., Clapham D., Abrahamsson M. 2019. Embryology in conifers. — Advances in Botanical Research. 89: 157–184.
<https://doi.org/10.1016/bs.abr.2018.11.005>
42. Cano M., Morcillo A., Humánez A., Mendoza-Poudereux I., Alborch A., Segura J. Arrillaga I. 2018. Maritime Pine *Pinus Pinaster* Aiton. In: Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Forestry Sciences. V. 84. P. 167–179.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6_13
43. Третьякова И.Н., Пак М.Э., Иваницкая А.С., Орешкова Н.В. 2016. Особенности соматического эмбриогенеза длительно пролиферирующих эмбриогенных клеточных линий *Larix sibirica in vitro*. — Физиология растений. 63(6): 812–822.
<https://doi.org/10.7868/s0015330316050134>
44. Баранова Т.В., Калаев В.Н., Воронин А.А. 2014. Экологически безопасные стимуляторы роста для предпосевной обработки семян. — Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. 7: 96–102.
45. Орынбаев А.Т., Джалилов Ф.С. 2018. Обеззараживание семян капусты от сосудистого бактериоза. — Картофель и овощи. 1: 23–25.
<https://doi.org/10.25630/pav.2018.1.17457>
46. Pitel J.A., Wang B.S.P. 1985. Physical and chemical treatments to improve laboratory germination of western white pine seeds. — Can. J. For. Res. 15(6): 1187–1190.
<https://doi.org/10.1139/x85-194>
47. Wenny D.L., Dumroese R.K. 1987. Germination of conifer seeds surface-sterilized with bleach. — Tree Plant. Notes. 38(3):18–21. <https://rngr.net/publications/tpn/38-3/germination-of-conifer-seeds-surface-sterilized-with-bleach>
48. Поливанова О.Б. 2015. Влияние режима стерилизации на всхожесть семян *Agastache* Clayton ex Gronov. и рост растений *in vitro*. — Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 150-летию РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Москва. С. 63–65.
<http://elib.timacad.ru/dl/full/sbornik-150-let-rgau-msha-2015.pdf/view>
49. Плаксиенко И.Л., Мищенко О.В., Колесникова Л.А., Сакало А.И., Хмара Е.А. 2020. Влияние гипохлорита натрия на всхожесть и энергию прорастания образцов пшеницы. — Селекция и генетика: инновации и перспективы: Сб. материалов Международной науч.-практ.конф. к 100-летию кафедры селекции и генетики. Горки, 189–193.
<https://baa.by/upload/science/conferencii/selekcija-i-genetika-innovacii-i-perspektivi-20.pdf>
50. Niskanen A.M., Lu J., Seitz S., Keinonen K., von Weissenberg K., Pappinen A. 2004. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*). — Tree Physiol. 24(11): 1259–1265.
<https://doi.org/10.1093/treephys/24.11.1259>
51. Lilja A., Hallaksela A.M., Heinonen R. 1995. Fungi colonizing Scots-pine cone scales and seeds and their pathogenicity. — Eur. J. For. Path. 25(1): 38–46.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1995.tb01070.x>
52. Pirttilä A.M., Pospiech H., Laukkanen H., Myllylä R., Hohtola A. Two Endophytic Fungi in Different Tissues of Scots Pine Buds (*Pinus sylvestris* L.). — Microb. Ecol. 45(1): 53–62.
<https://doi.org/10.1007/s00248-002-1038-8>
53. Ganley R.J., Newcombe G. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. — Mycological Research. 110(3): 318–327.
<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.10.005>
54. Игнатенко Р.В., Ершова М.А., Галибина Н.А., Чирва О.В. 2022. Стратегия развития зрелых мегагаметофитов *Pinus sylvestris* L. в культуре *in vitro* при разных условиях. — Материалы V (XIII) Международной ботанической конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге. СПб. 109.
https://www.binran.ru/files/publications/Proceedings/Proceedings_IBC/IBC_2022_Proceedings.pdf

Optimization of *Pinus sylvestris* (Pinaceae) Explants Sterilization Protocol and Cultivation Conditions

M. A. Ershova^{a, *}, R. V. Ignatenko^a, E. V. Novichonok^a, O. V. Chirva^a, N. A. Galibina^a

^aDepartment of Multidisciplinary Scientific Research of Karelian Research Centre, Petrozavodsk, Russia

*e-mail: maria_ershova_karnc@mail.ru

Abstract—Despite the existence of a sufficient number of protocols for obtaining somatic embryos of *Pinus sylvestris* L., there are almost no data on the effect of plant explants pre-treatment on the somatic embryogenesis initiation. During the study, the optimal timing for collecting green cones and the safe and effective protocol for immature seeds pre-treatment. According to the data obtained, in 2020, the end of the third decade of June-second decade of July turned out to be a suitable time interval in Karelia (by the accumulation

of effective temperatures of 406.8–669 degree-days, respectively (base +5 °C). Whereas in 2021 this period was shorter (the third decade of June—the first decade of July (400.7–664.7 degree-days)). Much attention was paid to the study of the various types of sterilizing agents' effect (70% ethanol, potassium permanganate, sodium hypochlorite (commercial bleach “Belizna”), hydrogen peroxide), their concentrations and exposure time on the *Pinus sylvestris* seeds germination. The negative effect of 70% ethanol solution on this indicator was established. The mature seeds germination rate did not exceed 20% after treatment. The megagametophytes treated with this sterilizing solution did not show signs of development or death after two months of cultivation. At the same time solutions of commercial bleach “Belizna” and hydrogen peroxide in various concentrations (up to 20%) did not affect seeds germination (seed germination rate was 37–49% respectively, control – 49%). The methods of green cones sterilization without further seed treatment, and the introduction of *Pinus sylvestris* megagametophytes into culture *in vitro* were also tested. This treatment option proved to be effective; no contamination was recorded during the megagametophytes cultivation.

Keywords: somatic embryogenesis, surface sterilization of plant material, *Pinus sylvestris*, Karelia

ACKNOWLEDGMENTS

The study was carried out under state order to the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences. The authors are grateful to the Department of the Karelian Forest Seed Station of the Center for Forest Protection of the Leningrad Region (FBU Roslesozashchita) for providing *Pinus sylvestris* seeds. They also express their gratitude to D. Sc., Head of the Laboratory for Forest Biotechnologies of the Forest Research Institute KarRC RAS Boris V. Rayevsky and Ph.D., Head of the Analytic Laboratory of the Forest Research Institute KarRC RAS Ksenia M. Nikerova for their help in collecting cones from plus tree clones at the Petrozavodsk Forest Seed Plantation.

REFERENCES

1. Houston D.T., de Rigo D., Caudullo G. 2016. *Pinus sylvestris* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. – In: European atlas of forest tree species. Luxembourg. P. 132–133.
https://ies-ows.jrc.ec.europa.eu/efdac/download/Atlas/pdf/Pinus_sylvestris.pdf
2. Tretyakova I.N., Voroshilova E.V., Shuvaev D.N., Pak M.Eh. 2012. [Prospects of microclonal reproduction of conifers in culture *in vitro* through somatic embryogenesis]. – *Khvoinye boreal'noi zony*. 30(1–2): 180–186.
<https://elibrary.ru/item.asp?id=20285298> (In Russian)
3. Novichonok E.V., Galibina N.A., Raevskii B.V., Ershova M.A., Gulyaeva E.N. 2019. Somatic embryogenesis in Scots pine: state of knowledge, and prospective applications in forestry]. – *Transactions of KarRC RAS*. 12: 5–18.
<https://doi.org/10.17076/eb1118> (In Russian)
4. Noerhadi T., Yasuda T., Siregar A., Budji R.G. 1985. Induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica*. – *Proc. Inst. Tehnol. Bandung*. 2–3: 41–49.
<https://journals.itb.ac.id/index.php/jmfs/article/download/9518/3599/27343>
5. Machado A.D., Puschmann M., Puhlinger H., Kremen R., Katinger H., Machado L.D. 1995. Somatic embryogenesis of *Prunus subhirtella autumn rosa* and regeneration of transgenic plants after *Agrobacterium*-mediated transformation. – *Plant Cell Reports*. 14(6): 335–340.
<https://doi.org/10.1007/bf00238592>
6. Garin E., Grenier E., Grenier-De March Gh. 1997. Somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). – *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.* 48(2): 83–91.
<https://doi.org/10.1023/a:1005729621557>
7. Malaeva E.V. 2018. Studying special features in somatic embryogenesis of *Begonia* L. representatives *in vitro*. – *Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo*. 65: 109–117.
<https://doi.org/10.31360/2225-3068-2018-65-109-117> (In Russian)
8. Litz R.E., Moon P.A., Chavez Avila V.M. 2005. Somatic embryogenesis and regeneration of endangered cycad species. – In: II International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species. 692: 75–80.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.692.8>
9. Kang H.D., Moon H.K., Lee S.K. 2014. Micropropagation via somatic embryogenesis of rare and endangered species, *Acanthopanax seoulenses* Nakai. – *Forest science and technology*. 10(4): 190–196.
<https://doi.org/10.1080/21580103.2014.913536>
10. Muraseva D.S. 2016. [Reproduction and preservation *in vitro* of rare and endemic species of the genus *Fritillaria* L. Abstr. ... Diss. Doct. (Biology) Sci.]. Novosibirsk. 149 p. (In Russian)
11. Tretyakova I.N., Voroshilova E.V., Shuvaev D.N. 2014. Callusogenesis and somatic embryogenesis induction in hybrid embryos from the seeds of *Pinus sibirica*. – *Russ. J. Plant Physiol.* 61(2): 274–280.
<https://doi.org/10.1134/s1021443714020162>

12. Park Y.S., Lelu-Walter M.A., Harvengt L., Trontin J.F., MacEacheron I., Klimaszewska K., Bonga J.M. 2006. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. — PCTOC. 86(1): 87–101.
<https://doi.org/10.1007/s11240-006-9101-7>
13. Park Y.-S., Beaulieu J., Bousquet J. 2016. Multi-varietal forestry integrating genomic selection and somatic embryogenesis. In: Vegetative propagation of forest trees. National Institute of Forest Science. Online edition. P. 302–322.
https://www.iufro.org/download/file/24668/4296/vegetative-propagation-of-forest-trees_pdf
14. Lelu-Walter M.A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. 2008. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis. — PCTOC. 92(1): 31–45.
<https://doi.org/10.1007/s11240-007-9300-x>
15. Aronen T., Pehkonen T., Ryyänen L. 2009. Enhancement of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Pinus sylvestris*. — Scan. J. For. Res. 24(5): 372–383.
<https://doi.org/10.1080/02827580903228862>
16. Abrahamsson M., Clapham D., von Arnold S. 2018 Somatic Embryogenesis in Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.). In: Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Forestry Sciences. V. 84. P. 123–133.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6_9
17. 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: Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications. P. 319–365.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_19
18. Shuklina A.S., Tret'yakova I.N. 2019. Somatic embryogenesis of species of the genus *Pinus* in culture *in vitro*. — Uspekhi sovr. biol. 139(2): 184–195. (In Russian)
<https://doi.org/10.1134/S004213241902008X>
19. Krasnoperova V.V., Bukharina I.L., Islamova N.A. 2016. [Features of introduction of coniferous tree species into the culture *in vitro*]. — AgroEcoInfo. 2: 7 p. (In Russian)
http://agroecoinfo.ru/STATYI/2016/2/st_211.doc
20. Dunaeva S.E., Osledkin Yu.S. 2015. Bacterial microorganisms associated with the plant tissue culture: identification and possible role (review). — Agricultural biology. 50(1): 3–15. (In Russian).
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.1.3rus>
21. Plynskaya Zh.A., Aeshina E.N., Velichko N.A. 2008. [*In vitro* cultivation of conifers]. — Conifers of the Boreal Area. 25(1–2): 68–70. <https://elibrary.ru/item.asp?id=11806181> (In Russian)
22. Tret'yakova I.N., Barsukova A.V. 2012. Somatic embryogenesis of larch and Siberian pine in Siberia. — Russian Journal of Forest Science. 6: 63–70.
<http://lesovedenie.ru/index.php/forestry/article/view/275>
23. Zaytseva Yu.G., Novikova T.I. 2014. Clonal micropropagation of *Rhododendron dauricum*. — Vestnik NGU. Seriya: Biologiya, klinicheskaya meditsina. 12(1): 26–31.
<https://elibrary.ru/item.asp?id=21271152> (In Russian)
24. Tret'yakova I.N., Shuvaev D.N. 2015. Somatic embryogenesis in *Pinus pumila* and productivity of embryogenic lines during long-term cultivation *in vitro*. — Russ. J. Dev. Biol. 46(5): 276–285.
<https://doi.org/10.1134/s1062360415050070>
25. Koh Zh.A., Litovka Yu.A., Makolova P.V., Shabanova K.A., Pavlov I.N. 2020. Biochemical composition of vegetative explants and callus of *Pinus sibirica* Du Tour. — Khimija rastitel'nogo syr'ya. 4: 395–403.
<https://doi.org/10.14258/jcprm.2020048530> (In Russian)
26. Tret'yakova I.N., Izholdina M.V. 2009. Induction of Siberian pine somatic embryogenesis. — Russian Journal of Forest Science. 5: 43–49.
<https://elibrary.ru/item.asp?id=13500459> (In Russian)
27. Lelu M.-A., Bastien C., Drugeault A., Gouez M.-L., Klimaszewska K. 1999. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulator. — Physiol. Plant. 105(4): 719–728.
<https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.105417.x>
28. Burg K., Helmersson A., Bozhkov P., von Arnold S. 2007. Developmental and genetic variation in nuclear micro satellite stability during somatic embryogenesis in pine. — J. Exp. Bot. 58(3): 687–698.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erl241>
29. Shirokov A.I., Kryukov L.A. 2012. [Fundamentals of plant biotechnology: an electronic educational and methodological manual]. Nizhny Novgorod. 49 p. (In Russian)
http://www.unn.ru/pages/e-library/methodmaterial/files/Method_Shirokov_Kryukov.pdf

30. *Montalbán I.A., Moncaleán P.* 2018. *Pinus radiata* (D. Don) Somatic Embryogenesis. In: Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants. Forestry Sciences. V. 84. P. 1–11.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6_1
31. *Pullman G.* 2018. Embryogenic Tissue Initiation in Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.). In: Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Forestry Sciences. V. 84. P. 13–32.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6_2
32. *Celestino C., Carneros E., González-Cabrero N., Hernández I., Toribio M.* 2018. Stone Pine *Pinus pinea* L. In: Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Forestry Sciences. V. 84. P. 63–81.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6_5
33. *Pereira C., Montalbán I.A., Correia S.I., Canhoto J., Moncaleán P.* 2018. Aleppo pine *Pinus halepensis* Mill. In: Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Forestry Sciences. V. 84. P. 159–166.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6_12
34. Interstate Standard. GOST 13056.6-97. 1998. Seeds of trees and shrubs. Method for determination of germination. Moscow. 27 p.
<https://docs.cntd.ru/document/1200025567> (In Russian)
35. *Keinonen-Mettälä K., Jalonen P., Eurola P., von Arnold S., von Weissenberg K.* 1996. Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris*. – Scand. J. For. Res. 11(1–4): 242–250.
<https://doi.org/10.1080/02827589609382933>
36. *Häggman H., Jokela A., Krajnakova J., Kauppi A., Niemi K., Aronen T.* 1999. Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. – J. Exp. Bot. 50(341): 1769–1778.
<https://doi.org/10.1093/jxb/50.341.1769>
37. *Pullman G.S., Webb D.T.* 1994. An embryo staging system for comparison of zygotic and somatic embryo development. – In: Proc TAPPI Biol Sci Symp. (Minneapolis, MN, USA October 3–6.1994). P. 31–34.
<http://hdl.handle.net/1853/1824>
38. *Cairney J., Pullman G.S.* 2007. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. – New Phytol. 176(3): 511–536.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02239.x>
39. *Stasolla C., Yeung E.C.* 2003. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. – Plant Cell, Tissue Organ Cult. 74(1): 15–35.
<https://doi.org/10.1023/A:1023345803336>
40. *Mo L.H., von Arnold S.* 1991. Origin and Development of Embryogenic Cultures from Seedlings of Norway Spruce (*Picea abies*). – J. Plant Physiol. 138(2): 223–230.
[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80275-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80275-0)
41. *Arnold S., Clapham D., Abrahamsson M.* 2019. Embryology in conifers. – Advances in Botanical Research. 89: 157–184.
<https://doi.org/10.1016/bs.abr.2018.11.005>
42. *Cano M., Morcillo A., Humánez A., Mendoza-Poudereux I., Alborch A., Segura J. Arrillaga I.* 2018. Maritime Pine *Pinus Pinaster* Aiton. In: Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Forestry Sciences. V. 84. P. 167–179.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6_13
43. *Tretyakova I.N., Park M.Eh., Ivanitskaya A.S., Oreshkova N.V.* 2016. Peculiarities of somatic embryogenesis of long-term proliferating embryogenic cell lines of *Larix sibirica in vitro*. – Russ. J. Plant Physiol. 63(6): 800–810.
<https://doi.org/10.1134/S1021443716050137>
44. *Baranova T.V., Kalaev V.N., Voronin A.A.* 2014. [Environmentally friendly growth stimulators for pre-sowing seed treatment]. – Vestnik Baltiiskogo federal'nogo universiteta im. I. Kanta. 7: 96–102.
45. *Orynbaev A.T., Dzhaliilov F.S.* 2018. Disinfection of cabbage seeds from black rot. – Kartoffel' i ovoshchi. 1: 23–25.
<https://doi.org/10.25630/pav.2018.1.17457>
46. *Pitel J.A., Wang B.S.P.* 1985. Physical and chemical treatments to improve laboratory germination of western white pine seeds. – Can. J. For. Res. 15(6): 1187–1190.
<https://doi.org/10.1139/x85-194>
47. *Wenny D.L., Dumroese R.K.* 1987. Germination of conifer seeds surface-sterilized with bleach. – Tree Plant. Notes. 38(3): 18–21.
<https://rngr.net/publications/tpn/38-3/germination-of-conifer-seeds-surface-sterilized-with-bleach>
48. *Polivanova O.B.* 2015. [The effect of the sterilization treatments on the germination of *Agastache* Clayton ex Gronov. seeds and plant growth *in vitro*]. In: [International scientific conference of the young scientists dedicated to the 150-th anniversary of the RSAU – MTAA (Moscow, June 2–3, 2015)]. Moscow. P. 63–65.
<http://elib.timacad.ru/dl/full/sbornik-150-let-rgau-msha-2015.pdf/view>

49. *Plaksienko I.L., Mishchenko O.V., Kolesnikova L.A., Sakalo A.I., Khmara E.A.* 2020. [Effect of sodium hypochlorite on germination and germination energy of wheat samples]. In: [Selection and genetics: innovations and prospects. Proceedings of the International scientific-practical conference. (Gorki, November 20, 2020)]. Gorki. P. 189–193. <https://baa.by/upload/science/conferencii/selekcija-i-genetika-innovacii-i-perspektivi-20.pdf>
50. *Niskanen A.M., Lu J., Seitz S., Keinonen K., von Weissenberg K., Pappinen A.* 2004. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*). – *Tree Physiol.* 24(11): 1259–1265. <https://doi.org/10.1093/treephys/24.11.1259>
51. *Lilja A., Hallaksela A.M., Heinonen R.* 1995. Fungi colonizing Scots-pine cone scales, seeds and their pathogenicity. – *Eur. J. For. Path.* 25(1): 38–46. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1995.tb01070.x>
52. *Pirttilä A.M., Pospiech H., Laukkanen H., Myllylä R., Hohtola A.* Two Endophytic Fungi in Different Tissues of Scots Pine Buds (*Pinus sylvestris* L.). – *Microb. Ecol.* 45(1): 53–62. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-1038-8>
53. *Ganley R.J., Newcombe G.* Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. – *Mycological Research.* 110(3): 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.10.005>
54. *Ingnatenko R.V., Ershova M.A., Galibina N.A., Chirva O.V.* 2022. Developmental strategy of *Pinus sylvestris* L. mature megagametophytes cultured *in vitro* under different conditions. – Proceedings of V (XIII) International Botanical Conference of Young Scientists in Saint-Petersburg. Saint Petersburg. P. 109. https://www.binran.ru/files/publications/Proceedings/Proceedings_IBC/IBC_2022_Proceedings.pdf