

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр
Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН)

На правах рукописи



Лукина Анастасия Викторовна

ОСОБЕННОСТИ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ *PINUS SIBIRICA* ПРИ
АКСЕЛЕРАЦИИ, ГИБРИДИЗАЦИИ И КУЛЬТИВИРОВАНИИ

4.1.6 – Лесоведение, лесоводство, лесные культуры, агролесомелиорация,
озеленение, лесная пирология и таксация

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор,
И. Н. Третьякова

Красноярск - 2026

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ ЭМБРИОГЕНЕЗА У <i>P. sibirica</i> В НОРМЕ И ПРИ ТРАНСФОРМАЦИЯХ РЕПРОДУКТИВНОГО ПРОЦЕССА.....	9
1.1 Развитие эмбриологических структур у <i>Pinus sibirica in situ</i>	9
1.2 Нарушения половой репродукции у представителей сем. <i>Pinaceae</i> ..	17
1.3 Несовместимость как причина нарушения половой репродукции...	19
1.4 Апомиксис – альтернативный способ репродукции и его роль в современной биотехнологии.....	23
1.5 Соматический эмбриогенез как технология искусственной репродукции хвойных	30
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	36
2.1 Объекты исследования.....	37
2.2 Структура урожая женской шишки.....	39
2.3 Проведение контролируемого опыления.....	40
2.4 Цитоэмбриологические исследования контролируемого межвидового опыления <i>P. sibirica</i>	42
2.5 Инициация соматического эмбриогенеза в культуре <i>in vitro</i>	44
2.6 Статистическая обработка.....	50
ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РЕПРОДУКТИВНЫХ СТРУКТУР У ОСОБЕЙ <i>P. sibirica</i> С ОДНОЛЕТНИМ РАЗВИТИЕМ ЖЕНСКИХ ШИШЕК.....	51
3.1 Семенная продуктивность мегастробилов особей с однолетним развитием репродуктивных структур.....	52
3.2 Особенности формирования эмбриологических структур у особей <i>P. sibirica</i> с однолетним репродуктивным циклом.....	58

3.3 Влияние контролируемого опыления пыльцой особей с однолетним репродуктивным циклом на развитие эмбриологических структур <i>P. sibirica</i>	67
3.4 Причины акселерации развития репродуктивных структур у аномальных особей <i>P. sibirica</i>	68
ГЛАВА 4. ФОРМИРОВАНИЕ РЕПРОДУКТИВНЫХ СТРУКТУР У <i>P.</i> <i>sibirica</i> ПРИ МЕЖВИДОВЫХ СКРЕЩИВАНИЯХ.....	
4.1 Развитие репродуктивных структур <i>P. sibirica</i> при контролируемом межвидовом опылении <i>P. sibirica</i> x <i>P. koraiensis</i>	71
4.2 Развитие эмбриологических структур в варианте опыления <i>P. sibirica</i> x <i>P. cembra</i>	72
4.3 Развитие репродуктивных структур <i>P. sibirica</i> при контролируемом межвидовом опылении пыльцой видов секции <i>Strobi</i>	85
4.4 Структура урожая мегастробилов при контролируемом межвидовом опылении.....	86
4.5 Проявления несовместимости при межвидовых скрещиваниях <i>P. sibirica</i> и возможности их преодоления.....	89
ГЛАВА 5. ИСКУССТВЕННАЯ РЕПРОДУКЦИЯ <i>P. sibirica</i> МЕТОДОМ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА.....	
5.1. Влияние стадии развития зиготических зародышей <i>P. sibirica</i> на формирование клеточных культур <i>in vitro</i>	91
5.2. Особенности формирования репродуктивных структур при инициации соматического эмбриогенеза у <i>P. sibirica</i>	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	111
ВЫВОДЫ.....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	122
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	123
	155

ВВЕДЕНИЕ

Создание специализированных высокопродуктивных насаждений лесных древесных видов - глобальный тренд современного лесоводства, сближающий лесное и сельское хозяйство (Chenglin et al., 2025). Одним из ключевых факторов для эффективного формирования древостоев оптимальной структуры является использование улучшенных генетико-селекционных форм лесных древесных видов. В то время, как для большинства сельскохозяйственных растений в методологии искусственного отбора и контролируемых скрещиваний достигнуты большие успехи, у лесных, в особенности хвойных деревьев, традиционные методы селекции и семеноводства не позволяют решить задачу получения новых сортов с хозяйственно ценными признаками. Соответственно, изучение особенностей репродуктивных процессов основных лесообразующих хвойных пород, как необходимой научной основы для повышения эффективности лесовосстановления и лесоразведения является актуальной задачей современного лесоведения.

Pinus sibirica Du Tour 1802, сосна кедровая сибирская, (кедр сибирский) - является важнейшим в экологическом и экономическом отношении видом Сибири. Естественное возобновление вида осложняют такие особенности половой репродукции как: продолжительность генеративного цикла, незавершенность эмбриогенеза, постоянное изъятие части семенного материала человеком. Кроме того, в последние годы естественное возобновление *P. sibirica* испытывает значительные затруднения в связи с изменениями климата (Goroshkevich et al., 2021; Velisevich et al., 2024; Жук, 2025), что определяет необходимость разработки и осуществления программ искусственной репродукции. Особое значение для проведения селекционно-генетических работ имеют аномальные формы *P. sibirica* с ускоренным (однолетним) циклом развития женских шишек редко, но систематически встречающиеся в древостоях (Ирошников, 1974; Минина, Ларионова, 1979; Третьякова, 1990), а также данные по искусственной межвидовой гибридизации этого вида.

Актуальным направлением в решении проблемы получения посадочного материала *P. sibirica* с заданными селекционными признаками является применение современных технологий, в том числе микроклонального размножения через соматический эмбриогенез. В последние 20 лет биотехнология соматического эмбриогенеза находит все более широкое применение в лесовосстановлении (Patel, Chaudhari 2021). Исключительно важное значение соматического эмбриогенеза определяется возможностью быстрого размножения уникальных генотипов, например тиражирования зародышей, полученных при искусственной гибридизации или улучшенных методами генетической инженерии (Anders et al., 2023; Hou et al., 2024; Li et al., 2024).

Цель работы заключалась в изучении особенностей репродуктивных процессов у *P. sibirica* в том числе уникальных особей с однолетним развитием мегастробилов, при контролируемом межвидовом опылении и искусственной репродукции.

Задачи исследования:

1. Изучить особенности формирования репродуктивных структур у особей *P. sibirica* с ускоренным (однолетним) циклом развития женских шишек;
2. Выявить особенности развития репродуктивных структур при контролируемом межвидовом опылении *P. sibirica* пыльцой некоторых видов пятихвойных сосен (*P. armandii*, *P. parviflora*, *P. strobus*, *P. hokkaidensis*, *P. wallichiana*, *P. koraensis*, *P. cembra*);
3. Получить искусственные зародыши у *P. sibirica* в культуре *in vitro*.

Научная новизна

Впервые описаны особенности структуры урожая у особей *P. sibirica* с однолетним развитием женских шишек, показаны перспективы их применения для селекционной работы. Впервые показано сходство развития репродуктивных структур у особей *P. sibirica* с однолетним развитием женских шишек и при искусственных межвидовых скрещиваниях *P. sibirica* и других видов

пятихвойных сосен. Впервые у *P. sibirica* получены искусственные зародыши путем экстррузии эмбрионально-суспензорной массы из микропилле мегагаметофита. Обосновано значение посткливажной стадии развития зиготического зародыша для инициации соматического эмбриогенеза у *P. sibirica*

Теоретическая и практическая ценность полученных результатов.

Практическое значение работы определяется возможностями использования ее основных положений в качестве базы для проведения генетико-селекционных и биотехнологических работ, разработки эффективных путей воздействия на процессы размножения и семеношения, искусственной репродукции, в том числе оптимизации методов соматического эмбриогенеза. Проведенные исследования расширяют представления о системах размножения и апомиксисе, и их значении в эволюции голосеменных. Полученные результаты могут служить базой для проведения биотехнологических работ по соматическому эмбриогенезу *P. sibirica*, направленных на получение посадочного материала для высокопродуктивных насаждений кедровых сосен и перехода к сортовому плантационному лесовыращиванию. Внедрение современных методов искусственной репродукции будет способствовать модернизации лесного семеноводства и лесовосстановления.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Особенности развития репродуктивных структур у особей с однолетним циклом развития *P. sibirica* обусловлены акселерацией мегагаметогенеза;
2. Проявление несовместимости при межвидовом контролируемом опылении *P. sibirica* пыльцой видов *P. armandii*, *P. parviflora*, *P. strobus*, *P. hokkaidensis*, *P. wallichiana* *P. koraensis* у осуществляется на гаметном уровне;
3. Стадия развития зиготического зародыша в экспланте является определяющим фактором эффективности инициации соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* у *P. sibirica*.

Личный вклад соискателя Представленные в диссертации экспериментальные данные получены непосредственно соискателем.

Апробация работы. Материалы диссертации **доклаживались и обсуждались** на I международной Школе для молодых ученых «Эмбриология и биотехнология» (Санкт-Петербург, 2005); III Международном совещании по сохранению лесных генетических ресурсов Сибири (Красноярск, 2011); Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 70-летию создания Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН. (Красноярск, 2014); 8-ом Международном совещании «Сохранение и рациональное использование лесных генетических ресурсов» (Петрозаводск 2024), научно-практической конференции «Актуальные вопросы лесной генетики, селекции и биотехнологии» (Воронеж, 2025). Материалы диссертации **были представлены** на: I Международной конференции молодых ботаников в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2006), IV съезде общества биотехнологов России им. Ю. А. Овчинникова (Пушино, 2006); межд. конф. «Современная физиология растений от молекул до экосистем (Сыктывкар, 2007); Международной конференции и школе молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология» (Уфа, 2007); Международной научной конференции по биологии и биотехнологии растений (Алмааты, 2014); III Всероссийской молодежной конференции с участием иностранных ученых «Перспективы развития и проблемы современной ботаники (Новосибирск, 2014); VI Международной научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира: физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты» (Ялта, 2014); Всероссийской научной конференции с международным участием «Продуктивность лесов в условиях меняющегося климата», (Петрозаводск, 2024); Всероссийской научной конференции с международным участием «Растения в изменяющемся климате: адаптация, устойчивость и продукционный процесс» (Якутск, 2025); Международном лесном форуме «Лесное хозяйство в условиях глобальных вызовов: новые парадигмы

устойчивого развития» (Воронеж, 2025); научно-практической конференции «Актуальные вопросы лесной генетики, селекции и биотехнологии» приуроченной к 55-летию юбилею ФБГУ «ВНИИЛГИС Биотех» (Воронеж, 2025).

Благодарности автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н., проф. И. Н. Третьяковой за руководство, вдохновение и пример преданного служения науке, д.б.н., зав. Е. Н. Муратовой за помощь в процессе оформления работы и подготовки необходимых документов, главному инженеру лесного питомника краевого государственного бюджетного учреждения «Ермаковское лесничество» Ю. А. Череповскому и мастеру леса Ермаковского лесничества А. А. Дьяченко за помощь в поиске и отборе образцов аномальных кедров, зав. лабораторией дендрэкологии Института мониторинга климатических и экологических систем СО РАН д.б.н. Горошкевичу С. Н. за предоставленные образцы результатов межвидового опыления кедра сибирского, с.н.с. лаборатории лесной генетики и селекции, к.б.н Кузнецовой Г. В. за пыльцу кедра корейского использованную в эксперименте по искусственному опылению. Всем сотрудникам лабораторией лесной генетики и селекции за понимание и поддержку.

Публикации. Основное содержание диссертации опубликовано в 20 печатных работах, в том числе 8 в реферируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ (2 из которых по шифру специальности 4.1.6 – лесоведение, лесоводство, лесные культуры, агролесомелиорация, озеленение, лесная пирология и таксация).

Структура и объем. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 160 страницах, содержит 17 таблиц и 32 рисунка. Библиографический список включает 303 наименования, из которых 183 – иностранные источники.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ОСОБЕННОСТИ ЭМБРИОГЕНЕЗА У *P. sibirica* В НОРМЕ И ПРИ ТРАНСФОРМАЦИЯХ РЕПРОДУКТИВНОГО ПРОЦЕССА

1.1 Развитие репродуктивных структур у *P. sibirica in situ*

Строение и развитие репродуктивных структур у *P. sibirica* имеет много общего с другими представителями рода *Pinus*. *P. sibirica* относится к половому типу однодомных, несущих локально-разобщенные генеративные органы разного пола на одном индивидууме (Минина, 1973). Прямые цитогенетические признаки пола в виде половых хромосом у *P. sibirica* отсутствуют (Муратова, 1983), при этом другие показатели, например закономерности морфогенеза или местоположения полов в системе ветвления дерева свидетельствуют о строгости генетического контроля (Велисевич, 1998). Подробно изучены структура кроны и различия между половыми типами побегов (Титов, 1982; Велисевич, 1998; Горошкевич, 2014).

Сроки заложения генеративных почек у *P. sibirica* варьируют в зависимости от экологических и погодных условий (Воробьев, 1974; Некрасова, 1972; Третьякова, 1990; Васильева и др., 2012).

После зимнего покоя женские генеративные структуры *P. sibirica* представлены собранием мегастробилов, покрытых почечными чешуями. У основания кроющих чешуй весной формируются семенные чешуи. Нуцеллус и интегумент формируются в конце мая. В третьей декаде мая в пазухах семенных чешуй закладываются ткани двух семязпочек (Некрасова, 1972; Третьякова, 1990). Семязпочки развиваются в течение 2-3 недель до опыления. На период опыления семязпочка сосновых состоит из нуцеллуса, окруженного интегументом. На верхушке семязпочки интегумент не срастается, образуя микропилле (Owens et al., 1982; Третьякова, 1990).

Мегаспорогенез у *P. sibirica* происходит в конце первой - начале второй декады июня. Мейоз в мегаспороцитах может продолжаться до 5 дней (Некрасова, 1972). В процессе формирования мегагаметофита *P. sibirica* выделяют три стадии: свободоядерную (ценоцитную), клеточную (клеточную) и стадию

развития архегониев (Третьякова, 1990), что характерно и для других хвойных (Singh, 1978; Owens et al., 1982). В микропиллярной части мегагаметофита несколько поверхностных клеток дают начало архегониям. Клетки мегагаметофита непосредственно примыкающие к инициалам архегония трансформируются в обкладку (Козубов, 1973; Козубов, 1982; Баранцева, 1992), остальные превращаются в запасную ткань семени (Тренин, 1988).

Общая схема развития семени сосновых во второй год после оплодотворения представлена на рисунке 1.

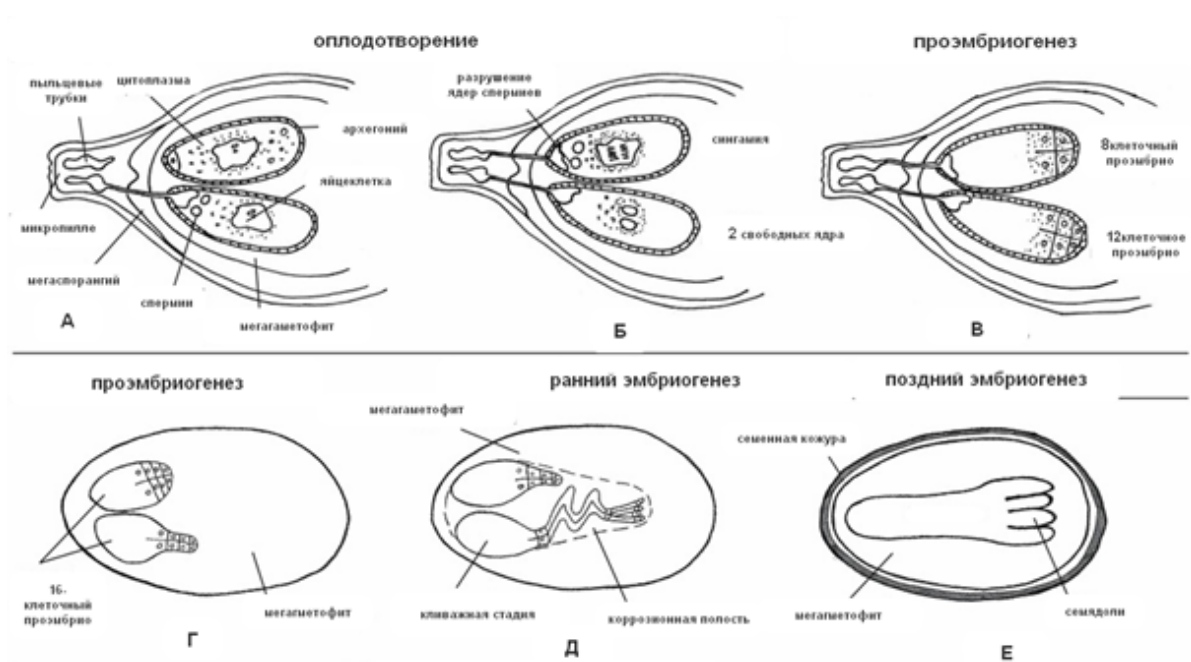


Рисунок 1. - Развитие семяпочки и семени во второй год репродуктивного цикла у *Pinaceae* (по Abrahamsson, 2016): а- начало вегетации второго года возобновление прорастания пыльцевых трубок через такни мегаспорангия. Когда пыльцевая трубка достигает архегония сперматогенная клетка делится, образуя два спермия; б- сингамия. Пыльцевые трубки и ядра спермиев дегенерируют; в – ранняя фаза проэмбриогенеза (8-12 клеточный проэмбрио); г- поздний проэмбриогенез (16 клеточный проэмбрио); д- ранний эмбриогенез (выход зародыша за пределы архегония); е – поздний эмбриогенез (зародыш сформирован, имеет выраженные семядоли, апикальную и корневую меристемы).

В развитии зиготического зародыша *P. sibirica*, принято выделять на три основных периода: проэмбриогенез, ранний эмбриогенез и поздний эмбриогенез. Проэмбриогенезом называют период от образования зиготы до удлинения суспензора (рисунок 1. б-д), ранний эмбриогенез включает интервал после удлинения суспензора и до заложения меристемы корня (рисунок 1.д-з), поздний эмбриогенез начинается от заложения меристем корня и включает все последующие события до формирования зрелого зародыша с хорошо развитыми семядолями (Singh, 1978).

Детализация событий проэмбриогенеза представлена на рисунке 2.

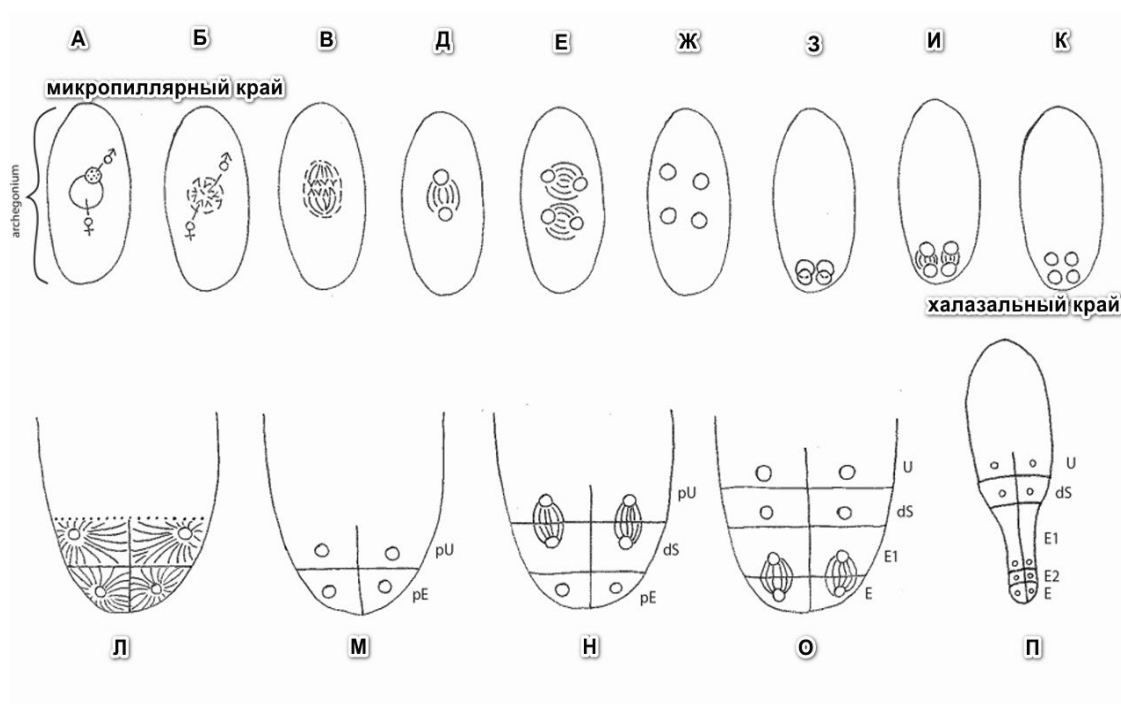


Рисунок 2. - Проэмбриогенез у *Pinaceae* (по Singh, 1978): а- слияние ядер спермия и яйцеклетки; б- объединение наследственной информации, восстановление диплоидного набора хромосом; в- кроссинговер; г- первое митотическое деление; е- второе митотическое деление; ж- свободнаяядерная стадия; з- миграция ядер к халазальному краю архегония; и-к- четырехядерный проэмбрио; л- частично формируются клеточные стенки, ядра остаются открытыми со стороны микропиллярного края; м- Обозначения: рU - первичный верхний ярус, рЕ – первичный нижний (эмбриональный) ярус, U - вторичный верхний ярус, S - суспензорный слой, E1 - первый эмбриональный сегмент, E - эмбриональные клетки.

В образовавшейся после оплодотворения зиготе происходит несколько делений ядра, не сопровождающихся цитокинезом (рисунок 2 а - к). После второго деления свободные ядра опускаются в халазальную часть архегония, располагаются в одной плоскости и синхронно делятся (рисунок 2.л). После формирования между ядрами клеточных стенок образуется восьмиклеточный проэмбрио, состоящий из двух слоев клеток. Клетки первичного верхнего яруса, (pU от primary upper tier) или первичного верхнего слоя со стороны цитоплазмы архегония клеточной стенки не имеют. Нижний ярус (pE от primary embryonal tier) носит название первичных эмбриональных клеток (рисунок 2. м). (Dogra, 1967; Singh, 1978; Owens et al., 1982).

В дальнейшем в результате интерклинальных делений получается 4 слоя клеток, по 4 клетки в каждом. Самый нижний ряд дает начало зародышу, второй – суспензору, третий – так называемый розеточный слой в дальнейшем не делится. Четыре верхних ядра остаются в яйцеклетке, которая на первых порах служит источником питания для развивающегося зародыша. Вскоре ядра верхнего слоя дегенерируют. Термин «проэмбрио» применяют для обозначения спорофита на первых этапах развития (до выхода за пределы архегония) (Singh, 1978).

Фаза раннего эмбриогенеза начинается с вытягивания клеток суспензорного слоя, приводящего к выходу проэмбрио через основание яйцеклетки в зародышевый канал гаметофита, и заканчивается заложением у зародыша меристемы корня (Singh, 1978; Nagmani et al., 1995). Зародыш в фазе раннего эмбриогенеза имеет шаровидную или удлинненно-цилиндрическую форму. Клетки, расположенные на проксимальном конце зародыша рядом с суспензором, делятся преимущественно в поперечном плане, производные от этих делений клетки удлиняются и добавляются к суспензору (Singh, 1978; Третьякова, 1990). Дистальный конец зародыша имеет полукруглую форму, и клетки здесь делятся в разных плоскостях. Между дистальным и проксимальным полюсами в этой фазе эмбриогенеза нет резкой границы (Nagmani et al., 1995; Pullman, 1999; Tereso et al., 2007). Рисунок 3 иллюстрирует события эмбриогенеза у сосновых.

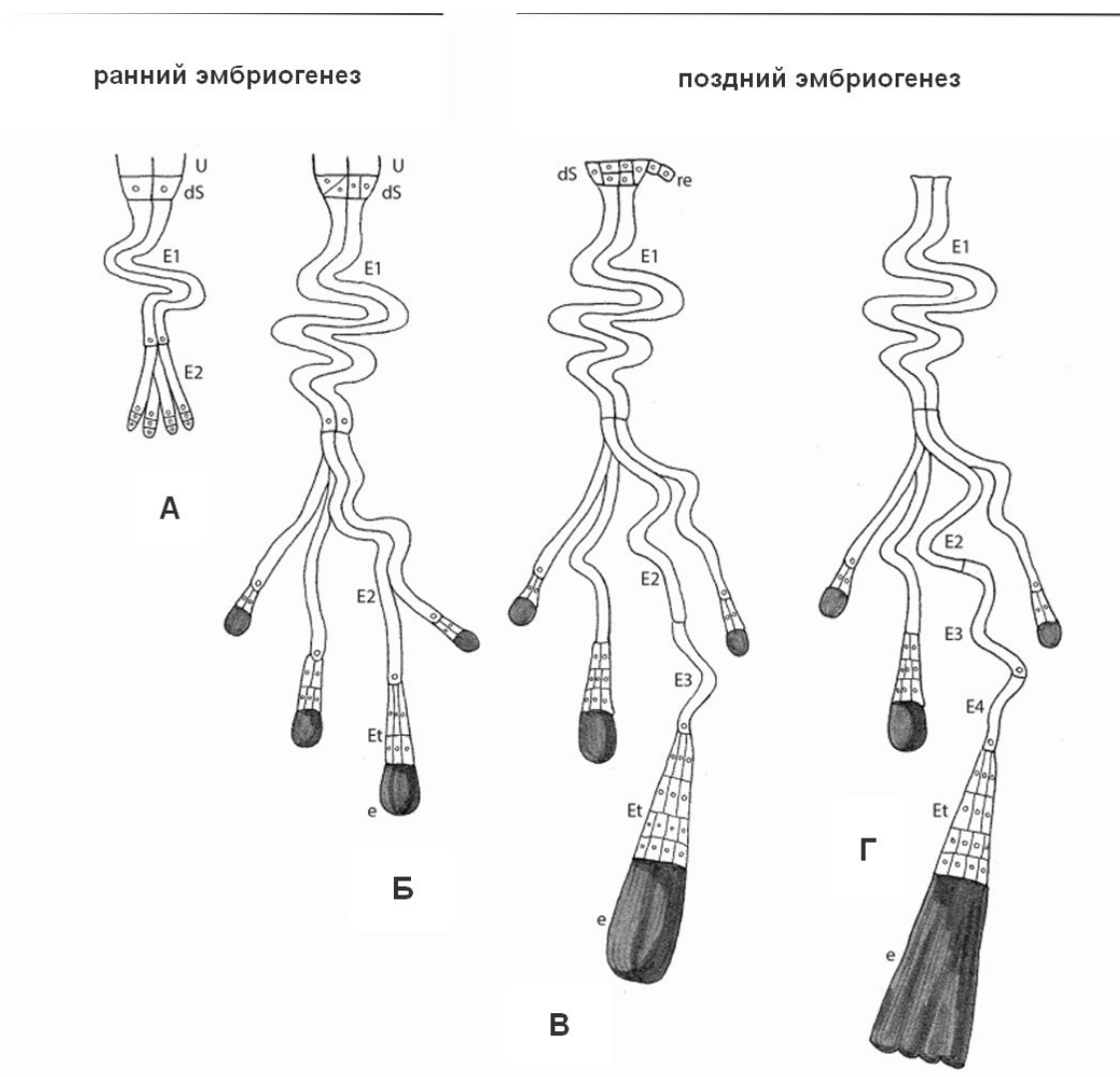


Рисунок 3. - Эмбриогенез у *Pinus*: а- четыре инициали, сформированные в результате кливажного расщепления, б- зародыши становятся многоклеточными, но без выраженной дифференцировки между зародышами; в-один из зародышей становится лидирующим и приобретает ярко проявленные различия в размерах; г- лидирующий зародыш начинает дифференцировку – появляются зачатки семядолей, субординантные зародыши останавливаются в развитии.

В конце фазы раннего эмбриогенеза зародыш принимает булабовидную форму с правильной полукруглой вершиной. Деления чаще всего наблюдаются в клетках, прилегающих к суспензору, но образующиеся новые клетки к суспензору не добавляются, и образуют массу упорядоченно расположенных клеток, ориентированных в поперечном плане. В дальнейшем эти клетки становятся клетками корневого чехлика (Durzan, 2008).

Дифференциация зародыша, начинающаяся с образования семядолей, обозначает переход фазу позднего эмбриогенеза. В течение этой фазы формируются три основные части – семядольное кольцо, гипокотиль и зародышевый корешок. У кедра сибирского образование семядолей обычно происходит в середине июля, когда длина основного зародыша составляет 1,5 – 2 мм (Некрасова, 1972; Третьякова, 1990).

В фазе позднего эмбриогенеза происходит активный гистогенез и рост зародыша. Зрелый зародыш в период созревания семян несет от 6 до 17 семядолей (Тарбаева, 1995; Матвеева, и др., 2006) и дифференцирован на две полярные меристемы - побега и корня. В оси зародыша выделяется кортекс, прокамбий и сердцевина. Длина зрелого зародыша кедра сибирского обычно составляет 5-8 мм (Тарбаева, 1995).

Существенным отличием эмбриогенеза голосеменных является то, что женский гаметофит, окружающий и питающий зародыш завершает свое формирование до оплодотворения, в то время как у покрытосеменных развитие зародыша происходит внутри триплоидного эндосперма, развитие которого начинается только после оплодотворения (Goldberg et al., 1994; Тахтаджян, 2007; Vuosku, 2009). Рост и развитие зародыша хвойных происходит внутри коррозионной полости (зародышевого канала) мегагаметофита. Клетки зародыша выделяют энзимы для лизиса прилегающих клеток и активно абсорбируют образовавшиеся продукты (Третьякова, 1990). Образование коррозионной полости вызывает интерес исследователей, в связи со значительную ролью, которую играет в этом процессе механизм запрограммированной клеточной смерти (Filonova, 2000b; Vuosku, 2009b).

Характерной особенностью раннего эмбриогенеза видов *Pinus*, является полиэмбриония (Dogra, 1967; Singh, 1978; Третьякова, 1990). Полиэмбриония в основном детерминирована генетическими факторами (MakKay et al., 2006), в тоже время внешние условия, возможно, оказывают влияние на степень выраженности этого признака (Шимак, 1973; Воробьев, 1974).

Полиэмбриония может быть архегониальной (простой, полизиготической) и расщепленной (кливажной или монозиготической).

При архегониальной полиэмбрионии зародыши образуются из различных архегониев одной семяпочки. Число архегониев в одной семяпочке у кедра сибирского может варьировать от одного до четырех (Третьякова, 1990). Оплодотворение нескольких архегониев разными пыльцевыми зернами приводит к образованию генетически различающихся зиготических зародышей (Третьякова 1990; MakKay et al., 2006). В результате архегониальной полиэмбрионии на ранних стадиях развития семени в нем могут одновременно присутствовать генетически различающиеся зародыши (Политов, 2007).

Кливажная полиэмбриония является уникальной особенностью раннего эмбриогенеза рода *Pinus*, отличающей его от *Piceae*, *Abies* и *Larix* (рисунок 4). Кливажная полиэмбриония заключается в расщеплении первичного шестнадцатиклеточного проэмбрио, в результате чего образуется четыре новые четырехклеточные эмбриональные инициали. Поскольку все кливажные зародыши являются производными одной яйцеклетки, генетически они идентичны (Singh, 1978). Описано несколько типов кливажной полиэмбрионии (Dogra, 1967; Singh, 1978; Мошкович, 1992; Durzan, 2008).

При нормальном эмбриогенезе полностью развивается один зародыш, наиболее продвинутый в зародышевый канал. Субдоминантные зародыши элиминируются (Bozhkov et al., 2005; Vuosku et al., 2009b; Abrahamsson, 2016).

Кроме того, очень редко встречается двойная гаметофитная полиэмбриония. При этом семя обладает двумя гаметофитами. Данное отклонение возникает, когда две мегаспоры развиваются в виде отдельного зародышевого мешка. Сеянцы, проросшие из одного семени при гаметофитной полиэмбрионии генетически будут различны (Шимаков, 1973).

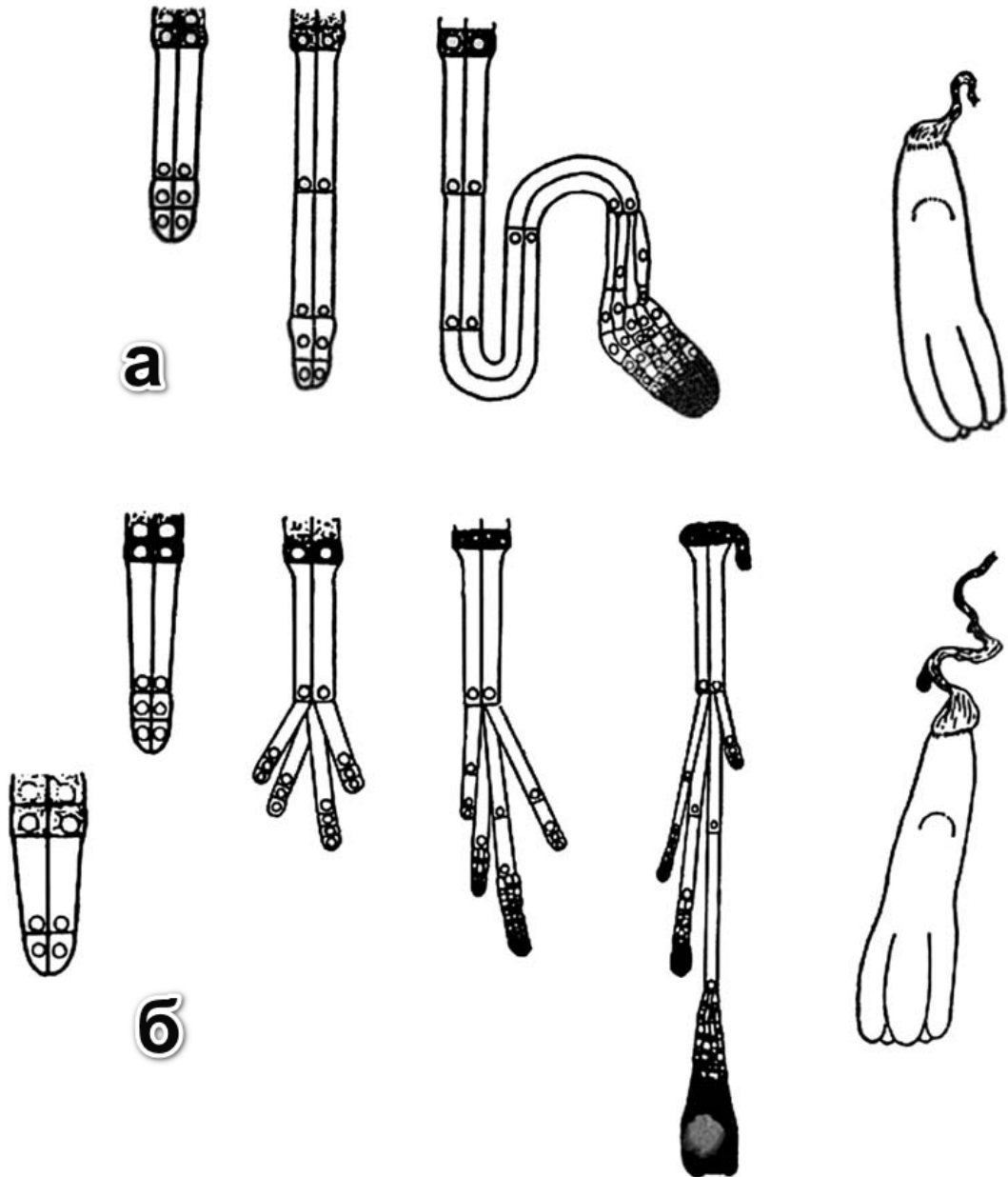


Рисунок 4. - Формирование зародыша у голосеменных (Durzan, 2008):

а - *Picea abies* (кливаж отсутствует), б - *Pinus spp* (кливаж на стадии проэмбриогенеза).

Экологические факторы, действие которых особенно активно проявляется на границах ареала, где условия являются экстремальными для вида, способны оказать значительное влияние на протекание репродуктивных процессов (Сурсо, 2017; Попов, Велисевич, 2023). Так в популяциях кедра сибирского, произрастающих на южной границе ареала, выявлены существенные ограничения

женского генеративного морфогенеза (Велисевич, 2013). У сосен, произрастающих в верхнем поясе гор, в зародышевом канале зачастую одновременно присутствует несколько слабо развитых эмбрионов (Земляной, 1973; Шимаков, 1973; Козубов, 1974), в то время как в нормальных условиях среди зрелых семян доля полиэмбриональных обычно не более 1% (Земляной, 1973).

Выявление оптимальных условий необходимых для успешного прохождения всех этапов эмбриогенеза и развития семени представляет большое значение для развития практического семеноводства хвойных и повышения эффективности лесовосстановления.

1.2 Нарушения половой репродукции у представителей сем. *Pinaceae*

Появление жизнеспособного семени обеспечивается согласованностью процессов развития эмбриологических структур, синхронным взаимодействием микро- и мегагаметофитов, начиная с момента прорастания пыльцы. Нарушение развития на любом из этапов репродуктивного цикла может привести к потере репродуктивной способности. Признаки, характеризующие потери семян на разных стадиях развития характеризуются максимальным уровнем изменчивости (Хуторной, 1998).

В потерях семян на разных стадиях развития наиболее сильно проявляется действие неблагоприятных факторов внешней среды. Одной из главных причин, приводящих к утрате половой репродукции у растений, является отсутствие опыления семян или опыление некачественной пыльцой. При этом стресс в первую очередь влияет на жизнедеятельность мужских половых структур, и поэтому пыльца может служить биологическим индикатором загрязненности воздуха, когда видимых повреждений спорофита еще нет. Женские половые структуры подвергаются стерильности реже и в меньшей степени (Анисимова и др., 2000; Третьякова, Носкова, 2006).

Стерильность пыльцы может вызывать засуха в период заложения флоральных меристем, продолжительные теплые осени, оттепели в зимний период, заморозки весной при прохождении мейоза, дождливая погода в период вылета

пыльцы (Николаева, 1974; Земляной, 1982; Третьякова и др., 2004; Велисевич, 2017; Goroshkevich et al., 2021; Velisevich et al., 2024; Жук, 2025). Кроме того, у *P. sibirica* и *P. sylvestris* описаны отдельные деревья (узкопирамидальные формы), которые продуцируют некачественную пыльцу (Третьякова, 1990).

Из последствий недоопыления, представленных в литературе, обращает на себя внимание противопоставление рода *Pinus* всем остальным родам семейства *Pinaceae*. В то время как у видов родов *Picea*, *Pseudotsuga*, *Tsuga* и *Abies* из неопыленных семяпочек могут формироваться пустые семена, у видов рода *Pinus* остановка развития семяпочек обычно происходит значительно раньше, и семена нормального размера не образуются (Dogra, 1967; Некрасова, 1978; Третьякова, 1990).

Таким образом, течение эмбриологических процессов обусловлено генетическими факторами (видовой спецификой, внутренними свойствами организма: физиолого-биохимическими и генетико-молекулярными особенностями), а также находится под определенным влиянием условий внешней среды. Например, у *P. sylvestris* количество беззародышевых семян обычно не превышает 5%, но возле северных границ ареала оно достигает 65% (Некрасова, 1978; Романовский и др., 1991; Сурсо, 2017).

Исследования эндогенной и внутрипопуляционной изменчивости полнозернистости семян *P. sibirica*, показали, что коэффициент вариации данного признака значительно выше, чем большинства морфометрических показателей шишек. Установлено, что полнозернистость семян *P. sibirica* варьирует от 50 до 95%. Распределение деревьев по полнозернистости свидетельствуют, что на каждом из этапов развития семени, у большинства особей основная часть семяпочек развивается нормально, лишь у немногих аномалии приобретают массовый характер, что подтверждает частичную генетическую обусловленность формирования некачественных семян (Горошкевич, 1996; Велисевич, 2017).

Уменьшение в выборке числа деревьев с увеличением доли абортивных семяпочек является косвенным доказательством зависимости величины потерь от полиморфизма по адаптивным признакам, имеющим нормальное распределение

(Горошкевич, 1996). Например, в популяциях хвойных отмечается нормальное распределение особей по срокам цветения, при этом различия между ранними и поздними формами достигает 5-10 дней (Жук, 2011). У большинства хвойных продолжительность вылета пыльцы гораздо меньше, чем продолжительность рецептивного периода женских мегастробил (Ярославцев и др., 1973; Некрасова, 1983; Жук, 2023), причем у большинства деревьев этот период совпадает со временем максимальной концентрации пыльцы в воздухе. Крайние по срокам цветения особи (рано- и позднецветущие) оказываются в худших условиях опыления и поэтому имеют высокую долю неопыленных семян (Васильева и др., 2012). Таким образом, фенологические различия между особями могут определять внутривидовую изменчивость по качеству семян (Авров, 1990).

У *P. silvestris* в популяциях выявлены две формы, различающиеся по уровню гаметофитной выживаемости семян, которая определяется как доля развитых семян относительно исходного числа семян (Романовский, 1989). Различия между формами создаются вследствие гибели мегагаметофитов на свободной стадии развития в начале второго года развития, до оплодотворения. При этом мужской гаметофит остается без изменения в верхней части нуклеуса (Хромова, 1999). Семяпочки с погибшими мегагаметофитами и жизнеспособными микрогаметофитами формируют мелкие недоразвитые семена. Уровень гаметофитной смертности семян у *P. silvestris* имеет высокую степень наследуемости и определяется особенностями генома материнского дерева (Романовский, 1991).

У некоторых плакучих форм *P. silvestris* стерильность обусловлена отсутствием мегаспорогенеза и связанной с этим остановкой развития семяпочки. При этом мегастробилы данных особей достигают нормальных размеров (Пожидаева, 1982; Третьякова, 1990).

1.3 Несовместимость как причина нарушения половой репродукции

Одним из основных механизмов регуляции процесса семяобразования у растений является несовместимость. В научной литературе возможно

использование термина «несовместимость» для обозначения разных явлений. В одном случае под несовместимостью принято понимать неспособность функциональных гамет осуществить оплодотворение и вызвать развитие семени (Вишнякова, 1994). В другом, термин «несовместимость» часто используется для описания механизма поддержания генетической чистоты вида. Такое определение допускает большой временной интервал и обширный круг событий, являющихся ее проявлением, соответственно в этом случае допускаются понятия «пред»- и «постзиготическая несовместимость». Для более корректного применения терминов было предложено понятие «несовместимость» ограничить до проявления неспособности функциональных гамет осуществлять сингамию, а для арестов развития семени, происходящих после образования зиготы использовать термин «эмбриональная летальность» (Krugman, 1970; Суриков, 1991).

У цветковых растений явление совместимости или несовместимости в большинстве случаев происходит в момент контакта пыльцевой трубки с тканями материнского растения (п-2п), или даже раньше в период контакта пыльцевых оболочек (производных отцовского диплоида) с тканями рыльца (2п-2п) (Френкель, Галун, 1982).

Механизмы несовместимости у голосеменных гораздо менее изучены, мнения различных авторов на проблему несовместимости существенно расходятся (Райт, 1978). По одним данным характерное для цветковых растений взаимодействие пыльцы с тканями спорофита у хвойных не обнаружено (Nagman, Mikkola, 1963; Романовский, Хромова, 2013). С другой стороны, имеются указания на то, что процессы несовместимости у представителей семейства *Pinaceae* начинают проявляться задолго до оплодотворения - с момента попадания пыльцы на нуцеллус. Например, было показано, что толщина каллозных чехликов, окружающих “свои” и “чужие” пыльцевые трубки различается, что отражается на развитии микрогаметофитов *in vivo* (Белостоцкая, 1979).

Также на наличие механизмов распознавания чужеродной пыльцы у хвойных указывает эффект предпочтительного оплодотворения чужой пыльцы:

было показано, что у *P. contorta* выход гетерозигот в 1.5–2 раза превышал ожидание, что по мнению исследователей, подтверждает различия по скорости роста пыльцевых трубок в тканях нуцеллуса (Hagman, Mikkola, 1963). В настоящее время повышение уровня гетерозиготности объясняют другими механизмами, в том числе увеличенной летальностью гомозигот (Политов, 2007).

Для понимания особенностей проявления несовместимости у голосеменных следует иметь в виду, что начальные этапы развития женского гаметофита у большинства видов хвойных происходят до опыления. При этом опыление является необходимым условием для завершения процессов развития мегagamетофита, оказывающим определенное физиологическое влияние и провоцирующим дальнейшее развитие половых структур. Особенно четко это проявляется у сосны обыкновенной, у которой макроспорогенез и развитие женского гаметофита в семяпочках происходят только после опыления. У других родов семейства сосновых – *Abies*, *Larix*, *Picea*, в период опыления в семяпочках может происходить мегаспорогенез и даже формирование ценоцита женского гаметофита (Singh, 1978). Однако и у данных родов дальнейшее развитие свободнаядерного женского гаметофита наблюдается только при прорастании пыльцы в ткань нуцеллуса (Little et al., 2014). У *P. sibirica* в отличие от других представителей семейства, в неопыленных макростробилах мегаспорогенез не заканчивается (Ермаков, 1980; Третьякова, 1990).

Несовместимость может проявляться как в отношении самоопыления, так и при межвидовой гибридизации. Имеются данные, что оплодотворение при самоопылении обычно происходит нормально (Sarvas, 1962; Hagman, 1963; Третьякова и др., 2014), поскольку у хвойных отсутствует механизм подавления самооплодотворения (Koski, 1971). Было высказано предположение, что образование пустого семени при самоопылении объясняется неспособностью зародыша к питанию генетически родственными клетками. Т. е. эмбриональная летальность (постзиготическая несовместимость) проявляется только на уровне трофики растущего зародыша (Романовский, Хромова 2014).

В природных популяциях хвойных гетерозиготность взрослых деревьев часто выше, чем у зародышей (Политов и др., 1992; Политов, 2007). Оценки частоты перекрестного опыления в популяциях *P. sibirica* показали, что в выборках зародышей теоретический коэффициент инбридинга близок к реально наблюдаемому. При этом в достигшей репродуктивной фазы части изученных популяций наблюдается эксцесс гетерозигот, что говорит о существовании отбора, направленного против инбредного потомства, возникающего вследствие самоопыления (Политов и др., 1992).

Первые программы изучения гибридизации у сосен были начаты в 20 гг. XX века в США. Было произведено более 4500 вариантов межвидовых скрещиваний, получено около 95 гибридов (Little, 1965; Critchfield, 1975), (Приложение 1). В результате установлено, что разные виды сосен характеризуются широким спектром способности к межвидовым скрещиваниям (Little, 1965; Krugman, 1970; Kormuták, 1984; Critchfield, 1986).

Для оценки возможности межвидовой гибридизации используется понятие «скрещиваемость». Скрещиваемость выражают как долю полноценных вызревших семян, полученных при скрещивании двух видов, выраженную в процентах от урожая, полученного при внутривидовом опылении. Скрещиваемость различных видов сосен варьирует от 0 до 100 %. (Kriebel, 1972). Например, *P. pinea* (Italian stone pine) оказалась неспособной к скрещиваниям ни с одним другим видом (Critchfield, 1975).

Вызывает интерес географическая обусловленность несовместимости у сосен. Так все ранние попытки искусственного опыления типичного представителя мягких сосен *P. lambertiana* пыльцой других видов пятихвойных сосен Северной Америки потерпели неудачу, но при этом были получены жизнеспособные семена от вариантов скрещивания ее с восточноазиатскими видами – *P. armandii* и *P. koraiensis* которые морфологически значительно различаются между собой и от *P. lambertiana* (Critcheld, 1986). Соответственно, в литературе распространено мнение, что пятихвойные сосны западного и

восточного полушария легко подвергаются гибридизации между собой (Critchfield, 1986).

Большинство гибридов сосен характеризуются высокой жизнеспособностью и фертильностью, что позволяет рассматривать их в качестве перспективного посадочного материала при создании высокопродуктивных лесных плантаций (Chenglin, 2025). Для сохранения эффекта гетерозиса, обеспечивающего высокую жизнеспособность гибридов, большое значение имеет внедрение в современное, в том числе лесное семеноводство, апомиксиса.

1.4 Апомиксис - альтернативный способ репродукции, и его роль в современной биотехнологии.

Для сохранения фертильности и преодоления неблагоприятных факторов среды в ходе эволюции у многих видов растений (более 300 видов, относящихся к 40 семействам) возникли различные типы бесполого размножения (Harada et al., 1998; Батыгина, 1999).

Апомиксис - способ репродукции, при котором образование нового индивидуума происходит внутри семязачатка, при отсутствии полового процесса.

В настоящее время существует несколько определений апомиксиса, отражающих различные точки зрения авторов на данное явление. По мнению некоторых ученых, они привели к путанице и ошибочности терминологии (Bicknell, Koltunow, 2004).

Недостаточная изученность способов перехода к бесполому размножению, как и их многообразие, затрудняют классификацию этого явления. Зародыш может образовываться из самых разнообразных комбинаций клеток и тканей в пределах семязачатка. В зависимости от происхождения и положения соматических зародышей на материнском растении были выделены две основные формы «эмбриодогении»: репродуктивная, или флоральная (когда соматические зародыши могут возникать из клеток нуцеллуса или интегументов) (Батыгина, 2000). При вегетативной эмбриодогении формирование адвентивных зародышей происходит на листьях, побегах и корнях (Митрофанова, 2009).

Доказано, что у покрытосеменных апомиксис, как вторичное явление репродукции, реализуется в рамках половой системы семенного размножения за счет пропуска или модификации определенных стадий репродуктивного цикла (Кашин, 2004). Соответственно, в основу одной из концепций перехода на апомиктичное размножение положена идея о гетерохронной эксперессии генов, осуществляющих процесс семенной репродукции (Eckhardt, 2003; Наумова, 2008).

Дестабилизация системы семенного размножения, находится в сильной зависимости от факторов внешней среды, а значит в переходе на апомиксис и возврате к половому размножению существенная роль принадлежит физиологическим механизмам и задействован уровень гормональной регуляции (Кашин, 1998). В литературе имеются описания опытов по индукции апомиксиса веществами гормональной природы, экстремальными температурами, облучением и другими факторами (Bicknell, Koltunow, 2004).

Многочисленные исследования, проводимые в последнее время, позволяют говорить об эпигенетической регуляции апомиксиса. В частности, одним из путей индукции партеногенетического развития зародыша является смещение фитогормонального баланса в районе зародышевого мешка в сторону повышения концентрации цитокининов относительно концентрации ауксинов (Estrada-Luna et al., 2002). Эпигенетические механизмы индукции апомиксиса могут заключаться, в создании определённых градиентов концентрации основных групп фитогормонов в процессе формирования женских генеративных органов с переопределением за счёт этого пути развития и компетенции соответствующих клеток (Кашин, 2004).

Особое значение в переходе соматических клеток на путь эмбриогенеза имеет асимметричное клеточное деление (Ten Hove, Heidstra, 2008; Paciorek, Bergmann, 2010). Это деление заложено уже в яйцеклетке, по оси которой проявляется полярность и асимметричное строение. Первое дробление зиготы, приводит к образованию двух неравных клеток: маленькой терминальной, которая дает начало собственно зародышу и большой базальной, дающей начало

клеткам суспензора. Полярность, заложенная в зиготе, поддерживается и передается дочерним клеткам.

Рассматривая бесполое размножение (апомиксис) в плане направления эволюции растений исследователи обращают внимание на ослабление функций гаметофита и усиление развития спорофита (Baskin, 2023). Установлено, что апомиксис часто встречается в прогрессивных, высокоорганизованных семействах - *Poaceae*, *Asteraceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae*.

Очевидно, происходит последовательное упрощение морфогенеза и роли гаметофита, между тем как развитие спорофита усиливается. Гаплоидная фаза в жизненном цикле растений постепенно вытесняется диплоидной (Тахтаджян, 2007). У голосеменных гаметофит развивается в полной зависимости от спорофита, находясь в очень редуцированном состоянии. В то же время гаметофит голосеменных, являющийся важной частью семени, остается жизнеспособным и сохраняется после оплодотворения, обеспечивая питанием новое поколение спорофита. Таким образом, гаметофит голосеменных выполняет в семени те же функции, что и эндосперм у покрытосеменных.

Последовательно продолжающаяся редукция гаметофита, в эволюционном процессе растений приводит к возможности образования семян без оплодотворения. Соответственно, в настоящее время все шире принимается точка зрения, что виды, размножающиеся апомиктически, представляют собой закономерный и относительно прогрессивный этап биологической эволюции растительного мира (Хохлов, 1970; Mogie, 1992; Шишкинская, Юдакова, 2009).

По мере совершенствования диагностических приемов и целенаправленных исследований систем размножения, становится очевидным, что для многих видов растений, обычно считающиеся облигатно половыми, свойственна чрезвычайная динамичность процессов определения путей семенной репродукции (van Dijk, 2000; Plitman, 2002).

Переход к апомиксису и закрепление его как механизма, позволяющего растениям преодолевать стерильность, провоцируют экстремальные условия

обитания, приводящие к неустойчивости системы семенного размножения (Кашин, 2004; Narada et al., 1998).

Учитывая роль и значение апомиксиса в эволюции покрытосеменных оправданно, опираясь на закон гомологических рядов Н. И. Вавилова, ожидать проявление параллельной изменчивости в других таксонах – то есть, в ходе эволюции у голосеменных, наряду с половым размножением могли появиться некоторые типы бесполого размножения, направленные на сохранение вида в условиях, приводящих к затруднениям в выполнении полового процесса.

Долгое время считалось, что как регулярный процесс, апомиксис у голосеменных отсутствует (Петров, 1974; Bicknell, Koltunow, 2004). В литературе отмечались лишь отдельные указания на возможность этого явления (Минина, Ларионова, 1979; Tretyakova 1992; Bell, 1994). К настоящему времени получены данные о таких формах отклонений репродуктивных процессов у хвойных, которые могут быть рассмотрены как варианты проявления апомиксиса.

На выраженность этого явления оказывают влияние биологические особенности вида - образование семян без оплодотворения сравнительно легко может быть обнаружено у *Abies*, *Juniperus*, *Larix*, *Picea*, *Taxus* и *Thuja*, в то же время у *Pinus* встречается реже (Singh, 1978). В работах с *P. pinaster*, *P. nigra*, *P. wallichiana*, *P. elliottii*, *P. taeda*, *P. palustris*, *P. virginiana*, *P. echinata*, была показана возможность образования семян в условиях, исключающих оплодотворение (при изоляции женских шишек). Было высказано предположение о том, что в ряде этих случаев имеет место адвентивная эмбриония (Dogra, 1967).

Близкое к апомиксису явление было обнаружено у пихты гималайской *Abies pindrow*, у которой выявлены случаи слияния ядра брюшных канальцевых клеток с ядром яйцеклетки, а также ряд других нарушений, проявляющихся в изменении положения ядра яйцеклетки в архегонии (Singh, 1978).

Известно, что для большинства апомиктических видов покрытосеменных характерна самостерильность (Bicknell, Koltunow, 2004; Шишкинская, Юдакова, 2009). В то же время ярко выраженная самостерильность, отбор в пользу

гетерозигот, против инбредного потомства, возникающего вследствие самоопыления установлено для большинства хвойных (Политов и др., 1992).

Имеются факты, свидетельствующие о прямой корреляции между способностью растений к апомиктическому размножению и повышенному уровню плоидности и полиэмбрионии (Кашин, 1998). Для представителей рода *Pinus* свойственна естественная полиэмбриония как следствие полиархегониальности и кливажных процессов. В результате, на ранних этапах развития семени в одном мегагаметофите может быть обнаружено до 16 зародышей (Singh, 1978; Третьякова, 1990; Durzan, 2008).

Другая специфическая черта развития репродуктивных структур видов сем. *Pinaceae* заключается в том то, что стадия мейоза и начальные этапы развития женского гаметофита происходят независимо от того, произошло или нет опыление. Следовательно, активация репродуктивной системы у *Pinus* не зависит от внешних факторов, например, наличия пыльцы на нуцеллусе (Singh, 1978; Третьякова, 1990). Предполагается, что данная особенность могла возникнуть как адаптация к короткому вегетационному периоду, для эффективного расходования небольшого времени, когда температурный режим позволяет успешно осуществить репродуктивный процесс. Поскольку наиболее ответственные фазы развития у *P. sibirica* сосредоточены в весенние месяцы с неустойчивой погодой, неблагоприятные внешние условия могут привести к значительному снижению семенной продуктивности и качества семян (Кузнецова, 2003; Ругузова, 2014; Бородинцева, 2023).

Возможность становления семязпочки хвойных на путь апомиктического развития следует рассматривать в комплексе вопросов экологической адаптации вида к внешним факторам среды. Встречающиеся в литературе описания фактов гаплоидного деления яйцеклеток у представителей рода *Pinus* чаще случаются в экстремальных условиях, у растений с крайними проявлениями изменчивости, ярко выраженной стерильностью генеративных органов. Например, признаки апомиксиса были обнаружены у *P. silvestris*, произрастающей в условиях экологического стресса (Третьякова, 1990).

Зародыш хвойных развивается внутри женского гаметофита, осуществляющего для него трофические функции. Выполняя ту же роль, что и эндосперм покрытосеменных, гаметофит голосеменных имеет принципиальное отличие. Эндосперм покрытосеменных по своей природе гетерогенен, поскольку образуется в результате двойного оплодотворения. Эндосперм обладает триплоидным набором хромосом, получившимся в результате объединения наследственной информации яйцеклетки и спермиев, в то время как гаметофит голосеменных является гаплоидной тканью, «материнской» по отношению к зародышу (Тырнов, 2000). В связи с этим у голосеменных эффект геномного импринтинга не может быть препятствием в реализации апомиктического типа развития. При этом у покрытосеменных именно инбридинг признается как основное препятствие для формирования жизнеспособных семян у потенциальных апомиктов (Петров, 1974; Соколов, 2006; Соколов и др., 2011).

Минина Е. Г. высказала мнение о том, что у хвойных возникновение апомиксиса может происходить при нарушении семеношения дерева, например, наблюдаемого у гетерозисных форм (Минина, Ларионова, 1979).

Применение современных методов генетического анализа позволило установить особый вариант естественного апомиксиса у кипариса сахарского *Cupressus dupreziana*. Этот вид является эндемиком северной Африки и образует нередуцированную (диплоидную) пыльцу, которая опыляет близкий вид *C. sempervirens*. Внутри семяпочки *C. sempervirens* диплоидная пыльца *C. dupreziana* в результате естественного андрогенеза образует апомиктические зародыши. В это же время, из пыльцы *C. sempervirens* формируются ди- и гаплоидные зародыши в семяпочках *C. dupreziana* (Pichot, 2008).

Тот факт, что в переключении воспроизводства с полового на апомиктическое задействованы механизмы физиологической регуляции, в частности изменение уровня фитогормонального баланса, дает основания предполагать, что апомиксис можно индуцировать фитогормонами. Так, при опрыскивании собраний макростробилов *Pseudotsuga menziesii* растворами индолилмасляной и гиббереллиновой кислоты в них происходило образование

вполне развитых семян с зародышами. В то же время, у сосны ладанной (*P. taeda*) и сосны румелийской (*P. reise*) опрыскивание раствором гиббереллиновой кислоты не опыленных однолетних макростробил вызывало их разрастание, но семена при этом не образовывались.

При рассмотрении вопросов гомологии полового аппарата у покрытосеменных и голосеменных растений исследователи обращают внимание на большую разницу между ними, сложившуюся в филогенезе по скорости развития женского гаметофита. Высоко продвинутым в эволюционном отношении покрытосеменным растениям свойственна акселерация, ускоренный темп развития, между тем, как хвойным, стоящим на более низкой ступени эволюции свойственна замедленность развития женского гаметофита и последующих процессов (Тахатжян, 2007). У голосеменных растений трофическая роль гаметофита не исчезает: длительное время, сохраняясь в семени, гаметофит голосеменных питает развивающееся новое поколение спорофита не только в эмбриональном состоянии, но и при прорастании.

В отличие от покрытосеменных, у которых формирование эндосперма, питающего формирующийся зародыш, без оплодотворения невозможно, у голосеменных развитие тканей мегагаметофита, выполняющих функцию эндосперма, происходит до оплодотворения (Dogra, 1967). Тем не менее, жизнедеятельность семяпочек и мегастробилов обычно строго связана с опылением. Этой чертой сосновые значительно различаются с другими хвойными (*Abies*, *Pseudotsuga*), способными к образованию партеноспермичных семян (Singh, 1978).

Таким образом, у отдельных представителей голосеменных апомиксис может происходить естественным образом, что дает основание предполагать, что подобные морфогенетические пути могут быть обнаружены или достигнуты экспериментальным путем и для других хвойных. Возможно, множественные пути реализации репродуктивного потенциала, в том числе и апомиксиса, архивированы в генофонде голосеменных (Третьякова, Минеев, 2021).

Значительным достижением репродуктивной биологии хвойных является соматический эмбриогенез, который признается одним из наиболее эффективных путей получения и размножения уникальных генотипов, особенно незаменимый для растений, трудно поддающихся традиционным методам вегетативного размножения (Attree, Fowke, 1993; Timmis, 1998; Campbell et al., 2003; Harfouche et al., 2012).

1.5 Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* как технология искусственной репродукции хвойных

Соматический эмбриогенез - процесс, при котором образование зародыша происходит из соматических клеток растения (Klimaszewska, Cyr, 2002). Отсутствие полового процесса (слияния половых клеток) при формировании нового организма позволяет рассматривать соматический одним из проявлений апомиксиса, искусственно индуцируемого в специальных условиях *in vitro*.

У хвойных соматический эмбриогенез впервые был получен в 1985 году у *Picea abies* (Chalupa 1985;) и *Larix decicua* (Nagmani et al., 1985) с тех пор его роль как важнейшего инструмента для исследований процессов развития растительного организма и ускоренного размножения наиболее ценных генотипов только расширяется.

Значительная идентичность событий соматического и зиготического эмбриогенеза подтверждена многочисленными исследованиями (von Anderkas et al., 1991; Pullman, Webb, 1994; Nagmani et al., 1995; Pullman et al., 1999; Stasolla et al., 2002; Pullman et al., 2003; Klimaszewska et al., 2004; Tereso et al., 2007; Abrahamsson, 2016). В том числе, это подтверждается данными о сходстве профиля генной экспрессии соматического и зиготического эмбриогенеза (Cairney et al., 1999; Cairney et al., 2000; Pullman et al., 2003; Stasolla et al., 2004; Gonsalves et al., 2005; Mathieu et al., 2006; Cairney, Pullman, 2007), что позволяет использовать его как модельную систему для исследования различных аспектов раннего развития растительных организмов.

Возможность соматического эмбриогенеза обеспечивается тотипотентностью растительных клеток, которая заключается в потенциальной способности клетки реализовать имеющуюся у нее генетическую информацию, вплоть до формирования нового организма (Батыгина, 1999). Феномен соматического эмбриогенеза демонстрирует два важных аспекта эмбриогенеза растений: во-первых, помимо половых и другие клетки высших растений могут приобретать эмбриогенную компетентность, во-вторых, триггером фертилизации соматических клеток могут быть эндогенные механизмы (Feher et al., 2003; Feher, 2015). Показано, что механизм включения эмбриогенеза из соматических клеток во многом сходен у представителей разных систематических групп (Geri et al., 1999; Harvengt et al., 2001; Elhiti, 2013). Поиск условий или факторов, способствующих инициации соматического эмбриогенеза у вегетативных клеток, является одной из актуальных задач современной биологии развития (Feher, 2008).

Помимо научного значения, соматический эмбриогенез приобретает все большую важность как актуальный метод современного семеноводства древесных видов благодаря возможности получения практически неограниченного числа идентичных генотипов (клонов) (Klimaszwska et al., 2016; Chenglin et al., 2025).

Соматический эмбриогенез является ключевым методом MVF (Multi-varietal forestry) - подхода, получающего все большее признание и применение в современном лесоводстве (Denchev, Grossnickle, 2019). В настоящее время до 60% заготавливаемой в Бразилии древесины получают на высокопродуктивных плантациях, созданных с применением технологии соматического эмбриогенеза. Большая доля объема древесины сосны лучистой (*P. radiata*) в Чили и Новой Зеландии также обеспечиваются плантационными посадками (Fraga, et al., 2023).

Только соматический эмбриогенез является единственным реальным методом тиражирования уникальных генотипов, чем объясняется его значение для размножения редких и исчезающих растений (Maruyama et al., 2007), и что обеспечивает возможность сохранения биологического разнообразия в условиях

все возрастающей антропогенной нагрузки на естественные экосистемы (Merkle, 2000).

В сложном многоступенчатом процессе репродукции путем соматического эмбриогенеза выделяют несколько стадий: инициацию, пролиферацию, созревание и прорастание (Castander-Olarieta et al., 2022). Каждая из стадий соматического эмбриогенеза характеризуется своими требованиями к внешним экспериментальным условиям и влияющим на ее успешное прохождение факторами.

Преимущества соматического эмбриогенеза как метода получения посадочного материала, значительно усиливаются благодаря возможности применения криоконсервации и геномной селекции. Криоконсервацию осуществляют на стадии пролиферации эмбрионных клеточных линий, и она обеспечивает сохранение стабильных характеристик генотипов до получения результатов селекционных исследований и полевых испытаний. Геномная селекция в свою очередь, сокращает продолжительность отбора особей, позволяя избежать трудоемких и малопредсказуемых результатов традиционных скрещиваний (Attree, Fowke, 1993; Li, et al., 2024).

Инициация является первым и обязательным этапом соматического эмбриогенеза, определяющим успешность прохождения всех последующих этапов и формирование полноценного нового растения. Все факторы инициации условно можно разделить на внешние и внутренние. К внешним факторам относятся условия культивирования - состав питательных сред, температура и уровень освещенности, к внутренним – разнообразные характеристики экспланта (генотип деревьев доноров, физиологическое состояние, тип тканей и т.д.).

Для инициации соматического эмбриогенеза в культуре ткани хвойных применяют несколько основных типов сред (Приложение 2). При этом считается, что модификации минерального, углеводного и гормонального состава среды оставляют возможность значительного повышения частоты инициации соматического эмбриогенеза (Bonga et al., 2010). В тоже время, поскольку различные виды рода *Pinus* и даже отдельные особи внутри вида обладают разной

чувствительностью к определенным компонентам (Li et al., 1998; Klimaszewska et al., 2001; Niskanen et al., 2004; Park et al., 2006), нет оснований говорить о том, что будет найдена универсальная питательная среда. В настоящее время введение в культуру *in vitro* каждого нового вида сосен предполагает необходимость подбора и оптимизации состава питательной среды для инициации соматического эмбриогенеза.

Процесс соматического эмбриогенеза возможно индуцировать такими внешними факторами как высокая температура, низкое содержание органического азота, высокая концентрация углекислого газа, ионы тяжелых металлов, изменение pH, температуры, уровня освещенности, механические или химические повреждения и др. (Klimaszewska, 1997; Haggman et al., 1999; Ramarosandratana et al., 2001; Pullman et al., 2005; Pullman et al., 2009; Zavattieri, 2010; Prier et al., 2016; Castander-Olarieta et al., 2020).

Общепризнанно, что растительные регуляторы роста (фитогормоны) способны играть роль сигналов, приводящих к перепрограммированию клеток с соматического на эмбриогенный путь развития. Соответственно, в условиях культуры *in vitro* фитогормоны являются наиболее распространенными индукторами инициации соматического эмбриогенеза (Li, et al., 1998; Feher et al., 2003; Jimenes, Thomas, 2005; Feher, 2008; Elhiti et al., 2013). Наиболее важными в индукции соматического эмбриогенеза у сем. *Pinaceae* признаны гормоны ауксинового ряда, главным образом, 2,4 дихлорфеноксиуксусная кислота (Lelu et al., 1999; Klimaszewska et al., 2001; Lelu et al., 2006; Sharma et al., 2008). В тоже время, было обнаружено, что сигнальные функции регуляторов роста в растении могут выполнять соединения других классов (полиамины, олигосахариды, жасмонаты и брассиностероиды) (Pullman, 2003; Nataraja, 2007; Nie et al., 2023).

Индукция соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* напрямую зависит от свойств экспланта. В то время как у представителей родов не имеющих кливажных процессов в раннем эмбриогенезе (*Piceae*, *Abies* и др.) (рисунок 4 а) возможно индуцировать соматический эмбриогенез из зрелых семян и даже сегментов побегов (Ruaud et al., 1992), у представителей рода *Pinus* инициация

возможна исключительно из незрелых зиготических зародышей (Egertsdotter, 2018; Castander-Olarieta et al., 2022).

Сложности реализации соматического эмбриогенеза у сосен привели к введению специального термина «recalcitrance», для описания свойства не проявлять ожидаемого отклика при применении стандартных процедур, ставших рутинными для других видов (Bonga et al., 2010). В тоже время перспективы, которые открываются при разработке методов активации соматических клеток к эмбриональному развитию, порождают значительный интерес исследователей к индукции соматического эмбриогенеза у других категорий эксплантов (Prehn et al., 2003; Ravindra et al., 2005; Malabadi, Natarya, 2006; Bonga, 2008; Klimaszewska et al., 2009).

Генетические особенности растений-доноров эксплантов также оказывают существенное влияние на успешность процесса инициации соматического эмбриогенеза (Garin et al., 1998; Miguel, et al., 2004; Niskanen et al., 2004; MakKay, 2006; Chen et al., 2021). В ряде случаев, частота инициации соматического эмбриогенеза может быть значительно повышена путем подбора соответствующих родительских форм для проведения контролируемого опыления (Becwar, 1994; Lelu-Walter et al., 2008).

Значительный теоретический и практический интерес представляют механизмы и способы и формирования соматических зародышей в культуре *in vitro*. Установлено два пути соматического эмбриогенеза (Bozhkov et al., 1997). Первый — прямой, когда зародыши образуются непосредственно из клеток эксплантата без этапа каллусообразования. В этом случае соматические зародыши формируются из проэмбриогенных детерминированных клеток (Митрофанова, 2009). Второй — непрямой эмбриогенез, когда необходимым является этап пролиферации каллусной массы (Bozhkov et al., 1997; Filonova et al., 2000; von Arnold et al., 2002). Кроме того, высказано предположение, что для хвойных одним из важных механизмов образования соматических зародышей в культуре *in vitro* могут являться кливажные процессы (Durzan, Gupta 1987; Durzan, et al., 2008; Bonga, 2012; Третьякова, Минеев, 2021).

Для эмбриогенной компетентности клеток огромное значение придается ассиметричному клеточному делению и приобретению клеткой свойства полярности (Goldberg et al., 1994; Батыгина 2002; Ten Hove, 2008; d'Erfurth et al., 2009).

Для эмбриогенных клеточных культур характерен высокий митотический индекс и уровень метаболической активности – свойства меристемных клеток (Носов, 2011). В развитии зародыша хвойных задействовано примерно 3500 генов. Индукция соматического эмбриогенеза заключается в создании условий, при которых возможен запуск экспрессии эмбриогенной программы. Активно проводятся исследования по поиску и идентификации морфологических и молекулярных маркеров специфических стадий эмбриогенеза (Elhiti et al., 2013; Egerstdotter, 2016).

В настоящее время применение технологии массового размножения растений посредством соматического эмбриогенеза, сдерживается недостаточным пониманием и оценкой факторов, контролирующих данный процесс (Egertsdotter et al., 2018; Aronen et al., 2025) при этом различные виды и отдельные генотипы исследуемых видов имеют широкий спектр морфогенетических реакций по отношению к условиям культивирования (Bonga et al., 2010 Garcia-Mendiguren et al., 2016).

Необходимость модернизации лесного семеноводства требует применения новых методов и технологий, в связи с чем значение исследования соматического эмбриогенеза, как системы искусственной репродукции у лесообразующих хвойных, и, в частности *P. sibirica*, имеет огромное значение.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Pinus sibirica Du Tour 1803, сосна кедровая сибирская, кедр сибирский, (Siberian stone pine) — вид подсекции *Strobus* секции *Quinquefolia* рода *Pinus*.

Систематическое положение *P. sibirica*, а также морфологически близких к нему *P. cembra* L. (кедр европейский), *P. koraiensis* Siebold & Zucc 1812 (кедр корейский), *P. pumila* (кедровый стланник), продолжает оставаться дискуссионным. В наиболее распространенном представлении данные виды объединяют в подсекцию *Cembrae*, в русскоязычной литературе употребляют термин «кедровые сосны». Изначально к подсекции *Cembrae* относили виды пятихвойных сосен, имеющие нераскрывающуюся шишку с крупными бескрылыми семенами, основными агентами распространения, которых являются птицы и животные. К подсекции *Strobi* относили виды пятихвойных сосен, имеющие раскрывающуюся шишку и крылатые семена, распространяемые ветром (Critchfield, 1986). При этом появлялись различные данные, как допускающие сомнения, так и подтверждающие правомерность такого разделения (Куприянова, 1974; Козубов, Муратова, 1986; Крутовский и др., 1990).

Например, применение молекулярно-генетических методов показало отсутствие четких различий между *Cembrae* и *Strobi* (Senjo et al., 1999). Соответственно, было высказано мнение, что выделенные подсекции не отражают реальной картины филогенетической истории рода, а являются искусственно созданными группами, причастность к которым основывается на морфологическом сходстве. Недавние исследования с использованием транскриптомных данных вновь подтвердили правомерность выделения кедровых сосен в отдельную подсекцию *Cembrae*. Согласно результатам этого исследования группа кедровых сосен - евразийские: *P. pumila*, *P. cembra*, *P. sibirica*, *P. koraiensis* и североамериканский *P. albicaulis* — имеет монофилетическое происхождение и является сестринской по отношению к другой группе сосен из Юго-Восточной Азии (Jin et al., 2021). Противоречивость данных о таксономической структуре

(Gernandt et al., 2005; Christenhusz et al., 2011) может быть отчасти снята принятием гипотезы о интрогрессивной гибридизации (Бобров, 1983), согласно которой сосны подсекции *Cembrae* не являются естественной группой видов, а образуют единую филогенетическую систему, сформировавшуюся в результате чередования циклов естественной гибридизации с некоторыми видами сосен подсекции *Strobi* и дивергенции обусловленных климатическими изменениями (Горошкевич и др., 2010).

Современный ареал *P. sibirica* в основном сосредоточен на территории Российской Федерации и составляет около 5 млн км² (рисунок 5).



Рисунок 5. Современный ареал сосны кедровой сибирской (Бех, 2004).

Знаком★ отмечен район проведения исследований.

Северная граница ареала вида соответствует границе зоны вечной мерзлоты. Восточная граница идет по водоразделу Лены и Амура до 460 30' с. ш., юго-западная граница ареала *P. sibirica* проходит по 550 с. ш. на Урал. В Центральном Алтае верхняя граница распространения лежит на высоте 1900—2000 м над уровнем моря, а в южных районах она поднимается до высоты 2400 м (Бех, 2004). Таким образом, экологическая амплитуда произрастания *P. sibirica* охватывает условия с различной тепло- и влагообеспеченностью, однако оптимальным для

роста и плодоношения является умеренно холодный и влажный климат южной тайги и средней части гор южной Сибири и Алтая.

Доказано, что современный ареал вида является результатом расселения после оледенения в четвертичный период из рефугниумов (Бобров, 2003). В качестве очагов реликтовых популяций традиционно принято рассматривать горы южной Сибири, но в последнее время появились данные, позволяющие говорить о возможности выделения нескольких очагов расселения - Уральского, Алтае-Саянского, Прибайкальского (Жилина, 2010, Shuvaev et al., 2023).

Исследование трансформаций полового процесса при акселерации развития репродуктивных структур и при проведении контролируемого межвидового опыления *P. sibirica* проводили у особей, произрастающих на территории Ермаковского района Красноярского края.

Характеристика исследованных деревьев с однолетним развитием женских шишек приводится в таблице 1.

Таблица 1- Характеристика деревьев *Pinus sibirica* с однолетним циклом развития.

Обозначение дерева	Возраст, лет	Высота, м	Диаметр, см	Длина хвои, мм	Продолжительность генеративного цикла, мес	Район произрастания
1К	38	18	35	144	12 месяцев (10 лет наблюдений)	Ермаковский район 20 км к западу от п.Танзыбей.
107	100	35	48	151	12 месяцев (7 лет наблюдений)	Ермаковский район п. Танзыбей.
106	88	38	62	147	Смешанный. Наблюдали однолетний и двухлетний цикл	Шушенский район 0,5 км от п. Субботино
106*П	15	3,8	18	143	12 месяцев (10 лет наблюдений)	Ермаковский район, п.Танзыбей.
1Ш	115	42	73	139	12 месяцев (3 года наблюдений)	Шушенский район 1 км от п.Шушенское
810	94	34	61	144	12 месяцев (7 лет наблюдений)	Ермаковский район, 25 км от п.Разъезджее
277(контроль)	120	21	68	123	13 лет наблюдений	Ермаковский район, п.Танзыбей,

*Прививка дерева 106 с однолетним репродуктивным циклом сделана Ю.А.Череповским в клоновом архиве Западно-Саянского опытного лесного хозяйства. В качестве подвоя использовали потомство дерева 277.

Район исследования представляет собой низкогорный пояс Западного Саяна и признается областью экологического оптимума и сосредоточения наиболее ценного генофонда вида (Бех, 2004).

По данным метеорологических станций сумма активных температур выше 10 градусов в Ермаковском районе составляет от 1437 (Нижне-Усинская метеостанция) до 1917 (Ермаковская метеостанция), с продолжительностью периода от 100 до 120 дней. Среднегодовая температура воздуха $-4,2^{\circ}$ и $0,2^{\circ}$ С соответственно. Метеорологическое лето начинается в конце мая, когда среднесуточная температура воздуха устанавливается выше 10°C .

2.2 Структура урожая женской шишки

Для характеристики репродукции исследуемых деревьев применяли систему элементарных признаков на основании предложенного Д. И. Сабининым понятия «структуры урожая», адаптированную для *P. sibirica*. Под структурой урожая понимается совокупность показателей, последовательно характеризующих формирование урожая семян на различных этапах репродуктивного цикла и уровнях структурной организации (Горошкевич, Хуторной, 1996). У мегастробилов определяли длину и ширину (максимальный диаметр). Производили подсчет фертильных и стерильных (бессемянных) чешуй.

Стерильные чешуи разделяли на 3 группы в соответствии с местом их положения – в дистальной, проксимальной или средней части мегастробила. Учитывали число полных и пустых семян, средний вес семени. Семенную продуктивность (уровень сеимификации) мегастробилов рассчитывали как процентное отношение числа семян в шишке (выхода семян) к удвоенному числу фертильных чешуй в той же шишке:

$$С.П. = \left(\frac{n}{2 \times m} \right) \times 100\%$$

где С.П. – семенная продуктивность, n – число семян, m – общее количество семенных чешуй (Горошкевич, Хуторной, 1996).

2.3 Проведение контролируемого опыления

Проведение контролируемого опыления осуществляли на прививках из клонового архива Западно-Саянского опытного лесного хозяйства, расположенного на территории Даурского лесничества вблизи пос. Ермаковское (53°16' с.ш, 92°23' в.д, высота над уровнем моря 300-320 м). В эксперименте были задействованы 5 клонов, каждый из которых представлен 12–15 ракетами. Возраст прививок – 20-22 лет.

Контролируемое опыление включает следующие процедуры: отбор родительских форм, укрепление изоляционных мешков, собственно опыление, снятие изоляционных мешков, сбор урожая (Матвеева и др., 2006). Для предотвращения неконтролируемого опыления за 5-7 дней до массового вылета пыльцы на побеги несущие мегастробилы, надевали пакеты из крафт-бумаги, изоляционные пакеты закрепляли веревкой. На не изолированных шишках проводили наблюдения, для определения максимально эффективной стадии для проведения опыления (Ярославцев, 1973).

Начало расхождения семенных чешуй женских шишек считали переходом в рецептивную фазу «открытая шишка» когда становится возможным ее опыление. В этой фазе выделяют 8 стадий, хорошо определяемых невооруженным глазом. Продолжительность каждой стадии составляет примерно одни сутки. На первой стадии семенные чешуи расположены под острым углом к оси стробила, они короче кроющих чешуй. На протяжении трех последующих стадий постепенно увеличивается угол, под которым семенные чешуи расположены к оси шишки, и их длина, по сравнению с кроющими чешуями. На пятой и шестой стадиях семенные чешуи широко раскрыты, кроющие чешуи отгибаются вниз. На седьмой и восьмой стадиях семенные чешуи соприкасаются друг с другом и

располагаются под острым углом к оси. В основном восприимчивость к пыльце семяпочек значительно ослабевает в шестой стадии, еще при широко раскрытых семенных чешуях, но в отдельных случаях сохраняется даже на 7-8 стадии (Жук, 2023).

Опыление проводили в период массового вылета пыльцы, который совпадает с максимальной рецептивностью мегастробилов (конец первой-начало второй декады июня). В изоляционном пакете проделывали отверстие и с помощью кисточки наносили пыльцу на поверхность женской шишки, после чего края отверстия соединяли скотчем. Изоляционные пакеты снимали спустя неделю после проведения опыления.

Для получения пыльцы у отобранных деревьев собирали микростробилы за 1 - 2 дня до раскрытия микроспорангиев. После просушивания микростробилы раскрывались, выпавшую пыльцу просеивали и сразу же использовали для проведения опыления.

Пыльца кедра корейского *P. koraiensis* была получена от деревьев, произрастающих на географической клоновой плантации кедровых сосен лаборатории лесной генетики и селекции Института леса СО РАН. Поскольку у *P. koraiensis* в условиях географической культуры период пыления на 10 -14 дней позже, чем у *P. sibirica*, пыльцу до проведения эксперимента по искусственному опылению сохраняли в течение года. Хранение просушенной и просеянной пыльцы осуществляли в условиях исключающих попадание влаги и преждевременное прорастание (в эксикаторе, в присутствии хлористого кальция, при температуре +2С).

Проверка жизнеспособности пыльцы, используемой в эксперименте с контролируемым опылением, осуществлялась согласно общепринятой методике (Сурсо, 1989), путем проращивания на 1,5 % растворе сахарозы в термостате при температуре +20-22С. Подсчет проросших пыльцевых зерен производили через 2 суток. На время проведения контролируемого опыления число проросших пыльцевых зерен *P. koraiensis* составило $76,5 \pm 5,4\%$, длина пыльцевых трубок

64,8±3,34мкм, что свидетельствует о хорошей жизнеспособности пыльцы и ее пригодности для проведения эксперимента.

Схема эксперимента по контролируемому внутри- и межвидовому опылению представлена в таблице 2.

Таблица 2- Схема эксперимента по контролируемому опылению

	СО	106	107	K1	K2	СО*	<i>P. koraiensis</i>
277/22	10 /6	8/3	11/9	10/8	5/3	12	8/3
145/4	8/3	12/4	5/4	7/4	24/18	9	-
153/13	10/3	5/2	13/9	8/5	21/19	10	7/2
002/13	12/7	15/8	12/8	17/15	14/12	9	5/1
106/4		7/3	-	-	-	5	-

СО свободное опыление (контроль); в числителе – число опыленных мегастробиллов, в знаменателе – число сохранившихся мегастробиллов.

Кедр корейский (*P. koraiensis*) – распространен на российском Дальнем Востоке, а также в северо-восточном Китае и на Корейском полуострове. Крайние точки ареалов кедра корейского и кедра сибирского разделяют примерно 750 км лиственничной лесостепи, что исключает возможность их естественной гибридизации. По ряду анатомо-морфологических и молекулярно-генетических признаков *P. koraiensis* занимает промежуточное положение между *P. sibirica* и *P. armandii*, в связи с чем было высказано предположение о гибридном происхождения данного вида (Горошкевич и др., 2010).

2.4 Цитозмбриологические исследования контролируемого межвидового опыления *P. sibirica*

Изучали семяпочки второго года развития, полученные в результате контролируемого опыления *P. sibirica* (клон №90 и клон № 02) пыльцой *P. armandii*, *P. parviflora*, *P. strobus*, *P. hokkaidensis*, *P. wallichiana*, *P. cembra*. Эксперимент по контролируемому межвидовому опылению был проведен д.б.н.

С. Н. Горошкевичем и Г. В. Васильевой на научном стационаре «Кедр» Института мониторинга климатических и экологических систем СО РАН (56°13' с.ш, 84°51' в.д, 78 м. высота над уровнем моря) (Vasilyeva, Goroshkevich, 2018). Для цитоэмбриологических исследований были предоставлены по 1-2 женские шишки каждого варианта опыления.

Ареалы видов, использованных в эксперименте, не контактируют в природной среде (таблица 3), что исключает возможность естественного переопыления.

Таблица 3 - Виды 5-хвойных сосен, задействованные в эксперименте по контролируемому межвидовому опылению

вид	ареал
<i>Pinus sibirica</i>	Южная, западная Сибирь
<i>Pinus cembra</i> L. (кедр европейский)	Альпы, Татры, Карпаты
<i>Pinus koraiensis</i> (кедр корейский)	Дальний Восток
<i>Pinus armandii</i> Franch. сосна белая китайская, сосна Армана	Центральный Китай
<i>Pinus wallichiana</i> A.B. Jacks сосна гималайская, или сосна бутанская	Гималаи
<i>Pinus parviflora</i> Siebold&Zucc сосна белая японская	Япония
<i>Pinus hakkodensis</i> Makino естественный гибрид [<i>Pinus parviflora</i> var. <i>pentaphylla</i> × <i>Pinus pumila</i>]	Япония
<i>Pinus monticola</i> Douglas & Don сосна белая западная, или сосна горная веймутова	Северо-запад Северной Америки

Использованные в качестве материнских клоны №90 и № 02 имеют разрастания типа «Ведьмина метла», представляющее собой локальную систему

ветвления с нарушенным апикальным контролем роста побегов, что приводит к образованию большого числа апексов. Мутационные ведьмины метлы обладают нормальной фертильностью, т.е. способны образовывать мега- и микростробилы (Ямбуров, 2011).

Приготовление постоянных препаратов проводили в соответствии с общепринятой методикой (Круглова и др., 2013). Семяпочки извлекали из мегастробилов и фиксировали в растворе Навашина (1% хромовая кислота :16% формалин: ледяная уксусная кислота в соотношении 10:4:1). Через сутки образцы промывали под проточной водой от фиксатора и проводили обезвоживание через выдерживание в спиртах возрастающей концентрации, с последующим заключением в парафин. Хранение образцов осуществляли в 80% спирте.

Для изготовления срезов использовали роторный микротом НМ 340 Е (MICROM International GmbH). Толщина среза 10 мкм. Микротомные срезы окрашивали проционовыми красителями (Иванов, 1982).

Временные препараты для проведения цитологического анализа клеточных культур готовили по стандартным методикам (Барыкина и др., 2004, Круглова и др., 2013). Образцы клеточных культур помещали на предметное стекло, окрашивали гематоксилином с добавлением капли железных квасцов в течение 5-7 минут, добавляли каплю глицерина, накрывали предметным стеклом и осторожно придавливали.

Препараты просматривали на микроскопе «МИКРОМЕД – 6 ЛОМО», изображения фиксировали цифровой насадкой НСМ510. Замеры клеток и эмбриональных структур проводили при помощи системы Scope Photo, с последующим переводом полученных единиц в микрометры.

2.5 Инициация соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro*.

В качестве доноров эксплантов использовали 15 особей *P. sibirica* из естественного древостоя (таблица 4). Сбор женских шишек проводили в период с

первой декады июня по последнюю декаду августа, с интервалом 7-10 дней. В 2024 сбор шишек производили с 12 июня по 6 июля с интервалом в 3 дня.

Срезанные шишки помещали в пакеты из крафт-бумаги и хранили при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. В течение 1-3 суток после сбора осуществляли введение в культуру *in vitro*, фиксацию и определение стадии развития зиготических зародышей.

Для определения стадии развития зиготических зародышей применяли периодизацию, разработанную для *P. taeda* L. (рисунок 6), в которой выделяется девять стадий (Pullman, Webb, 1994).

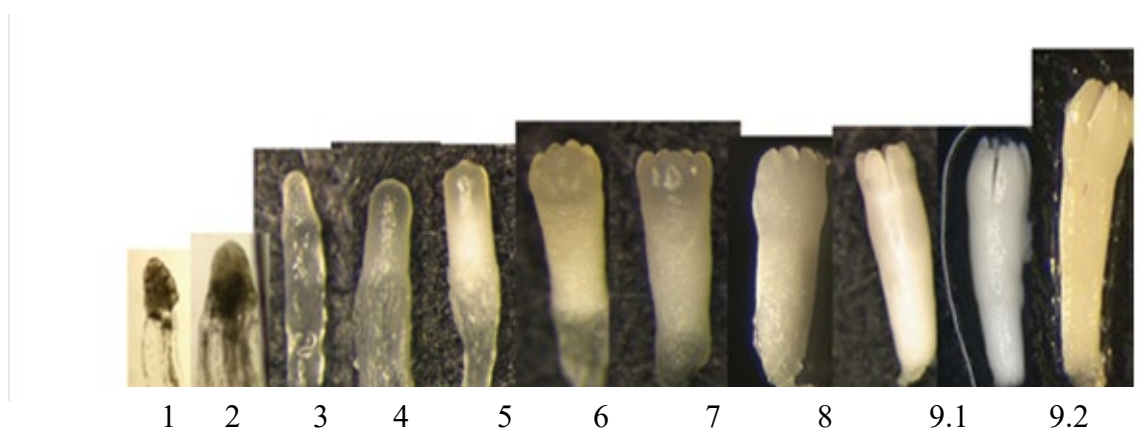


Рисунок 6- Стадии развития зиготического зародыша у представителей рода *Pinus* на примере *P. taeda* L. (Pullman et al., 1999).

Первая стадия данной периодизации охватывает период от свободнуклеарного проэмбрио до двенадцатиклеточного зародыша, включая таким образом весь период проэмбриогенеза и часть раннего эмбриогенеза. Вторая стадия – это период, когда зародыш по-прежнему располагается в микропиллярной части, и состоит более чем из двенадцати клеток. Между третьей и четвертой стадией не предложено ярко выраженных различий, но отмечается, что зародыш перемещается в халазальную часть коррозионной полости,

Таблица 4. - Характеристики деревьев *P. sibirica*, использованных в качестве доноров эксплантов для инициации соматического эмбриогенеза.

№	Высота, м/ D _{1,3} , см / возраст±3.	Длина шишек, мм	Выход семян, шт.	Семенная продуктивно сть, %	Полно- зернистость, %	Масса 1000 семян, г	Примечания
1	52/92/85	79,7 ±3,1	80,6 ± 11,5	87,2± 12,0	82,3 ± 10,2	269,0 ±27,3	-
2	48/104/110	79,1±2,2	69,5 ± 10,8	86,7± 10,9	83,1 ± 92,5	338,4 ±13,5	-
3	43/96/100	77,0±1,6	86,1 ±7,9	80,8 ± 9,1	92,7 ±10,3	298,1±19,2	-
4	20/86/82	67,1 ±1,7	88,8 ± 5,2	80,0 ±10,3	90,1 ±6,7	258,9 ±30,2	-
5	26/64/54	74,9 ±2,2	71,8 ± 4,5	88,8 ± 12,1	76,1 ±11,3	277,5 ±11,1	
6	45/73/68	81,8 ±2,5	104,5 ± 6,9	90,0± 9,5	97,0 ± 5,4	332,2±23,5	Отдельно стоящее дерево
7	34/82/70	82,6±3,0	110,7 ± 9,8	84,6± 79,9	93,1 ±3,3	261,0±14,3	-
8	24/67/96	74,8 ±1,5	87,3 ± 6,3	88,8 ± 11,0	95,0 ± 3,3	253,6 ± 20,2	Замедленное развитие -
9	17/66/76	63,3 ± 0,9	46,6 ± 7,0	32,4 ± 2,9	82,1 ± 10,6	345,6 ± 31,7	Развитие одной семязпочки.
10	24/58/62	54,3 ±1,2	79,5 ± 9,8	90,2 ± 8,9	90,1 ± 8,8	289,4 ± 18,4	-
11	32/64/78	71,8 ±2,0	96,2 ± 3,9	87,5± 7,7	91,5 ± 7,9	299,0 ± 25,2	-
12	23/48/68	82,6±1,3	98,4 ±10,1	80,6 ± 6,9	85,4 ± 9,0	268,8 ± 22,7	Отдельно стоящее дерево
13	18/42/60	57,5 ± 1,5	61,8 ± 9,5	71,9 ± 8,4	89,7 ±11,3	183,5 ± 15,6	Произрастание на границе лесной зоны h = 1200
14	20/56/88	60,3 ± 0,9	54,5± 4,7	65,5 ± 5,9	77,2 ± 5,9	176,7 ± 11,5	Произрастание на границе лесной зоны h = 1200
15	22/60/100	53,1 ±1,1	40,7± 5,0	56,2 ± 4,6	82,8 ± 7,3	155, 4 ±9,8	Произрастание на границе лесной зоны h = 1400

становится непрозрачным, (приобретает белый цвет), радиальное приращение получает суспензор. Пятая стадия характеризуется начальной тканевой дифференцировкой и появлением апикальной меристемы. На шестой стадии становятся заметными примордии семядолей зародыша. Исследователи, использующие эту периодизацию в работе отмечают максимальный уровень инициации соматического эмбриогенеза из эксплантов на 3-4 стадии (Haggman et al., 1999; Klimaszewska, et al., 2001; Bonga et al., 2010).

В 2024 году для описания начальных этапов эмбриогенеза применили собственную периодизацию, опирающуюся на работы (Koski, 1971; Skinner, 1992), более детально отражающую события про- и раннего эмбриогенеза.

Для определения стадии развития зародыша в каждую дату сбора образцов у каждого мегастробила в произвольном порядке вскрывали по 5-20 мегагаметофитов.

Для инициации соматического эмбриогенеза в качестве эксплантов применяли мегагаметофиты с интактными зиготическими зародышами (при сборе шишек на ранних стадиях развития), а также отдельные зиготические зародыши.

Стерилизация. За период проведения исследований с учетом имеющихся литературных данных (Ершова и др., 2022) были протестированы два варианта стерилизации эксплантов при введении в культуру *in vitro*:

1. Извлеченные из шишек незрелые семена обрабатывали 3% водным раствором перманганата калия в течение 15 минут, промывали в проточной воде и очищали от покровов. Мегагаметофиты стерилизовали в 5% спиртовом растворе йода в течение 10-12 минут с последующим трехкратным промыванием в дистиллированной воде и помещали на 5 минут в 10% раствор перекиси водорода, после чего еще раз трижды промывали в стерильной дистиллированной воде.

2. Семена извлекали из мегастробилов, проводили поверхностную стерилизацию 15%-ным раствором перекиси водорода в течение 12 мин. с последующим промыванием в стерильной воде. Дальнейшие работы проводили в условиях бокса антибактериальной воздушной среды БАВп-01 («Ламинар-С», Россия). Мегагаметофиты освобождали от покровов, производили еще одну

стерилизацию 8% -ным раствором перекиси водорода, в течение 10 минут с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде.

Для инициации соматического эмбриогенеза у *P. sibirica* использовали в три варианта питательных сред (таблица 5). Во всех вариантах концентрация макро- и микроэлементов соответствовала среде DCR (Gupta, 1987). Полная пропись среды DCR приводится в Приложении 2. В качестве регулятора роста ауксинового ряда применяли 2,4 дихлорфеноксиуксусную кислоту, в качестве цитокининов применяли 6-бензиламинопурин. Варианты сред различались источником углеводов (сахароза или глюкоза) и концентрацией гормонов.

Таблица 5. Среда, протестированные в ходе экспериментов по инициации соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro*

вариант	Макро- микро- элементы	Источник углеводов	Концентрация эндогенных регуляторов роста
№ 1	DCR	Сахароза 30г/л	2,4 Д 2 мг/л, 6–БАП 1 мг/л
№ 2	DCR	Глюкоза 30г/л	2,4 Д 2 мг/л, 6–БАП 1 мг/л
№ 3	DCR	Сахароза 30г/л	2,4 Д 1 мг/л, 6–БАП 0,5 мг/л

Среды дополняли 0,5 г/л гидролизата казеина (Sigma-Aldrich) и 0,1 г/л мезоинозита (Sigma-Aldrich). В качестве желирующего компонента использовали агар в концентрации 7 г/л. Перед автоклавированием pH среды довели до 5,8. После автоклавирования, когда среда остывала до 50°C, через фильтр с полиэфирсульфоновой мембраной, (диаметр пор 0,22мкм) (TPP, Швейцария), добавляли 0,5 г/л глутамин (Sigma-Aldrich) и 0,1 г/л аскорбиновой кислоты (Sigma-Aldrich).

Среды разливали в стеклянные сосуды по 25 мл на сосуд и закрывали алюминиевой фольгой. В одном сосуде размещали по 7 - 8 эксплантов.

Общая схема эксперимента для изучения влияния различных факторов на инициацию соматического эмбриогенеза у *P. sibirica* отображена в таблице 6.

Таблица 6. Основные переменные исследований инициации соматического эмбриогенеза у *P. sibirica* в культуре *in vitro*

Год исследований	Даты сбора	Число деревьев-доноров/обозначения согласно табл. 5	Варианты сред	Число введенных эксплантов
2020	16.07, 23.07, 30.07.	2/ №1, №2	№1, №2	210
2021	10.07.	12 (№№3-14)	№1, №2, №3	845
2023	24.06, 01.07.	6 (№3-7, №15)	№1, №3	600
2024	09.06, 12.06, 15.06, 18.06, 21.06, 24.06, 27.06, 30.06, 3.07, 6.07.	5 (№3-5, №8)	№1	1205

После введения эксплантов условия *in vitro* дальнейшее культивирование осуществляли в термостатах при температуре 22-23⁰С, в отсутствии света.

Регистрацию отклика на введение в условия культуры проводили еженедельно в течение 10 недель. В качестве положительного отклика для индукции соматического эмбриогенеза рассматривали экструзию – появление новых клеточных масс на микропиллярном конце мегагаметофита.

Через 14 - 20 дней после регистрации отклика производили пересадку полученных клеточных масс на свежую питательную среду такого же минерального и гормонального состава. Во время 1-го пассажа проводили цитологический анализ клеточных культур с использованием временных препаратов. Временные препараты окрашивали 0,1% раствором сафранина и 0,05 % процентным раствором ацетокармина.

Полученные клеточные линии подразделяли на обладающие и не обладающие эмбриогенной компетентностью. В соответствии с литературными данными, морфологическим маркером эмбриогенного потенциала клеточных культур является присутствие в клеточных линиях клеток двух типов: мелких, округлых, интенсивно окрашенных эмбриогенных глобул и примыкающими к ним удлинёнными, сильно вакуолизированными, слабо удерживающими краситель

клеток - трубок (Klimaszewska, Cyr, 2002; Cairney, Pullman, 2007; Castander-Olarieta et al., 2022;).

Компетентность эксплантов к инициации соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* оценивали на основании значения частоты инициации – процентной доли полученных клеточных линий, обладающих эмбриогенным потенциалом, от числа эксплантов, введенных в культуру (Носов, 2011).

Для сравнения активности пролиферации клеточных линий использовали изменение массы клеточной культуры по сравнению с первоначальным весом экспланта (Бутенко, 1994), для чего на 14 - 21 сутки культивирования (при каждом пассаже) фиксировали изменение веса культур.

2.6 Статистическая обработка

Статистическую обработку полученных данных проводили по стандартным методикам (Гланц, 1998; Унгурияну, Гржибовский, 2011, 2014) при помощи программы Microsoft Excel 2003. Определяли следующие основные показатели: среднее значение признака ($\bar{x}$), ошибка среднего значения ($S_{\bar{x}}$), коэффициент вариации признака (C_v). Вариабельность признака считалась слабой при $C_v < 11\%$, средней при $C_v = 11 - 25\%$, и сильной при $C_v > 25\%$. Проверку нормальности распределения данных проводили при помощи критерия Шапиро-Уилка.

Оценку достоверности различий проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Для оценки достоверности различий между малыми выборками, а также выборками, не имевшими нормального распределения (оценка влияния варианта искусственного опыления на размеры репродуктивных структур), использовали U-критерий Манна — Уитни.

Для оценки влияния стадии развития зиготического зародыша и генотипа дерева-донора эксплантов на инициацию соматического эмбриогенеза применяли двухфакторный дисперсионный анализ.

Различия признавали достоверными при 5% пороге доверительной вероятности ($p < 0,05$).

ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РЕПРОДУКТИВНЫХ СТРУКТУР У ОСОБЕЙ *P. sibirica* С ОДНОЛЕТНИМ РАЗВИТИЕМ ЖЕНСКИХ ШИШЕК.

Внешне феномен ускоренного развития проявляется в локализации мегастробилов на кончиках побегов, где в норме располагается озимь (рисунок 7).



Рисунок 7. - Генеративные побеги *P. sibirica* с женскими шишками в начале третьей декады августа: а – типичное дерево 277 (контроль); б-г– деревья с однолетним развитием: № 107 (б), № К1 (в, г).

Изучение феномена ускоренного развития репродуктивных структур у *P. sibirica*, как и других крайних проявлений изменчивости (аномалий) в строении растительных организмов имеет большое значение, поскольку такие формы являются уникальными природными моделями для изучения репродуктивных процессов, видообразования и эволюции, у представителей рода *Pinus* и

семейства *Pinaceae* в целом, а также проведении генетико-селекционных работ, направленных на получение высокоурожайных орехоплодных плантаций.

3.1 Семенная продуктивность мегастробиллов особей с однолетним развитием репродуктивных структур.

Изучение показателей семеношения *P. sibirica* в разных эколого-географических зонах позволили выявить закономерности изменчивости данной группы признаков (Ирошников, 1974; Горошкевич, 1996; Кузнецова, 2003; и др.). В тоже время установлено, что характеристики структуры урожая шишек и семян не связаны с общим уровнем роста деревьев и обладают высокой степенью генотипической обусловленности (Хуторной, 1998).

Результаты исследования структуры урожая особей с однолетним циклом развития репродуктивных структур представлены в таблице 7.

По данным литературных источников (Некрасова, 1972; Ирошников, 1974; Бех, 1974; Земляной, 1977; Воробьев, 1983; Горошкевич, Хуторной, 1996; Матвеева и др., 2003, 2006; Кузнецова, 2009; Бех, 2010; Земляной и др., 2010; Васильева, 2011), длина мегастробиллов *P. sibirica* может варьировать от 30 до 130 мм, ширина от 30 до 80 мм, но типичный интервал составляет 50-80 мм для длины и 40-60 мм – для ширины. У особей с акселерацией развития репродуктивных структур длина мегастробиллов варьирует от 38,5 до 61,7 мм, ширина – от 31,1 до 42, 7 мм. Таким образом, размеры мегастробиллов особей с акселерацией развития репродуктивных структур соответствуют нижним пороговым значениям данного признака у вида. При этом длина шишек аномальных особей достоверно ниже по сравнению с контролем (типичным деревом в рассматриваемом районе). Снижение линейных размеров мегастробиллов *P. sibirica* отмечено при неблагоприятных экологических условиях произрастания, а также у молодых деревьев в начале вступления в репродуктивную фазу онтогенеза (Новоселова, 2003; Савельев, 2011). Однако обе эти причины исключаются для приведенной группы.

Таблица 7 - Структура урожая особей *P. sibirica* с акселерацией развития женских шишек (над чертой среднее значение $\pm$ стандартное отклонение; под чертой – $C_v\%$; буквенные индексы показывают достоверность различий по методу множественных сравнений - индекс одинаков при отсутствии различий).

№ дерева	длина мегастро- била, мм	ширина мегастро- била, мм	отношение ширина/ длина	общее число семенных чешуй, шт	число развитых семян, шт	семенная продуктив- ность, %	диаметр семени, мм	средняя масса полного семени, мг
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1К*	<u>38,5$\pm$12,4a</u> 22,1	<u>32,3$\pm$7,3a</u> 10,0	<u>0,84a</u> 5,3	<u>68,6$\pm$9,0</u> 14,3	<u>67,9$\pm$9,3</u> 21,1	<u>49,5$\pm$14,1</u> 25,5	<u>3,8$\pm$0,2</u> 3,0	<u>142$\pm$24</u> 5,2
107**	<u>61,7$\pm$10,1b</u> 13,4	<u>42,7$\pm$8,9ab</u> 6,2	<u>0,69b</u> 3,1	<u>90,5$\pm$5,4</u> 9,7	<u>138,3$\pm$15,3</u> 8,9	<u>76,7$\pm$10,7</u> 16,2	<u>4,8$\pm$0,4</u> 4,0	<u>163$\pm$20</u> 4,8
106***	<u>55,2$\pm$13,4a</u> 15,9	<u>38,1 $\pm$6,9a</u> 9,1	<u>0,69b</u> 4,2	<u>88,3$\pm$10,3</u> 15,4	<u>101,5$\pm$12,5</u> 22,1	<u>57,4$\pm$10,3</u> 13,7	<u>4,0$\pm$0,2</u> 3,4	<u>154$\pm$22</u> 5,1

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4	5	6	7	8	9
106П****	<u>46,3±9,1a</u> 17,3	<u>41,1±6,2a</u> 6,8	<u>0,67b</u> 5,2	<u>73,7±11,9</u> 12,3	<u>55,1±8,2</u> 13,3	<u>37,4±6,3</u> 15,0	<u>3,9±0,5</u> 5,0	<u>127±27</u> 6,4
1Ш*****	<u>42,8±7,7a</u> 15,8	<u>31,4±7,0a</u> 8,1	<u>0,73a</u> 4,9	<u>77,9±8,8</u> 10,1	<u>61,2±10,4</u> 14,3	<u>39,2±8,0</u> 12,2	<u>4,1±0,3</u> 4,2	<u>115±19,6</u> 7,5
810	<u>40,4±11,0a</u> 14,7	<u>35,9±6,3a</u> 7,5	<u>0,89a</u> 5,1	<u>66,9±12,1</u> 15,1	<u>59,2±9,0</u> <u>9,2</u>	<u>55,1±3,8</u> 6,3	<u>3,7±0,2</u> 4,3	<u>129±18,3</u> <u>7,2</u>
Среднее для группы особей с акселерацией созревания мегастробил ов	<u>47,1±17,0</u> 30,2	<u>36,9±6,7</u> 7,3	<u>0,78</u> 6,8	<u>76,6±16,4</u> 27,0	<u>77,5±29,7</u> 46,4	<u>51,2±18,3</u> 34,5	<u>4,1±0,2</u> 5,2	<u>133,4±28,3</u> 21,9

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4	5	6	7	8	9
277 (контроль)	<u>79,7±15,3b</u> 15,4	<u>52,5±8,1b</u> 6,7	0,66b	<u>73,6±11,4</u> 14,7	<u>64,5±9,4</u> 10,0	<u>83,1±11,1</u> 12,1	<u>5,2±0,3</u> 3,2	<u>238±25,8</u> 5,5
ЛИМИТЫ для вида *****	<u>30-130</u> 5-20	<u>30-80</u> 4-20	0,61-0,97	<u>26,0-97,6</u> 15-37	<u>20-180</u> 15-48	<u>4-85</u> 6-60	<u>6,2-8,5</u> 3-14	<u>155-340</u> 9-31

*Средние данные за 2003 – 2010гг

**Средние данные за 2010-2013

***Средние данные за 2003-2013гг

****Единственный урожай в 2011 гг

*****Данные за 2013г

***** (Некрасова, 1972; Ирошников, 1974; Бех, 1974; Земляной, 1977; Воробьев, 1983; Горошкевич, Хуторной, 1996; Петрова, 2002; Матвеева и др., 2003, 2006; Кузнецова, 2009; Бех, 2010; Земляной и др., 2010; Васильева, 2011).

Внутрипопуляционная изменчивость длины шишек в природном ареале вида и в условиях интродукции определяется коэффициентами вариации в 5-20% (обычно 9-15%), ширины шишек – 4 - 20%, их отношения – около 8%. В исследованной группе аномальных особей для линейных параметров шишек установлен аналогичный уровень изменчивости. Коэффициент вариации длины мегастробилов для группы особей с акселерацией созревания репродуктивных структур относительно высокий, что отражает высокий уровень внутrigрупповой изменчивости данного признака. Принято считать, что диаметр (ширина) мегастробила – показатель более стабильный, чем его длина и, следовательно, более видоспецифичен у *P. sibirica* (Горошкевич, Хуторной, 1996; Путенихина и др., 2014).

Пропорции линейных размеров мегастробилов у деревьев с однолетним циклом развития репродуктивных структур находятся в пределах, свойственных виду (0,66-0,89). Таким образом, средние значения линейных параметров мегастробила тяготеют к минимальным значениям в пределах типичного интервала каждого признака, характерных для природных популяций, а также интродукционных культур вида (Андропова, Хамитов, 2016).

Структура урожая женских шишек у деревьев с однолетним развитием не имеет принципиальных отличий от таковой у нормальных деревьев – в шишке выделяется фертильная и две (дистальная и проксимальная) стерильные зоны. Общее число семенных чешуй варьирует от 66,1 у дерева №810, до 90, 5 у дерева №107, таким образом, число семенных чешуй у особей с однолетним репродуктивным циклом располагается в пределах свойственных виду, при этом группа характеризуется относительно высоким уровнем изменчивости по данному признаку (коэффициент вариации 27,5 %).

Число сформированных семян и семенная продуктивность особей с акселерацией развития мегастробилов характеризуются широкой амплитудой значений (от 55 до 136 штук и от 37,4% до 76,7% соответственно). Высокий уровень изменчивости числа сформированных семян и семенной продуктивности установлен многими исследователями и для других изученных в этом отношении

выборки вида (Некрасова, 1972; Воробьев, 1974; Горошкевич, Хуторной 1996; Хуторной, 1998; Бех, 2004, Земляной и др., 2010; Велисевич, 2013; Хамитов, Хамитова, 2013; Путенихина, 2014; Андропова, Хамитов, 2016; Велисевич, 2014).

В тоже время, в период созревания масса семян деревьев с акселерацией развития мегастробиллов в 1,5-2 раза ниже, чем у семян контрольного дерева с двухлетним циклом (табл. 3.1.). Установлено, что размер семян у *P. sibirica* положительно связан с размером шишек (Ирошников, 1974; Горошкевич, Хуторной 1996; Путенихина и др., 2014), соответственно это правило подтверждается на примере группы особей с ускоренным развитием.

Таким образом, в исследованной группе особей с однолетним развитием репродуктивных структур все ростовые признаки (линейные размеры, масса шишек и семян) меньше, а морфогенетические (число семенных чешуй) и уровень изменчивости признаков структуры урожая сопоставим с изменчивостью в популяциях *P. sibirica* в целом. Установлено (Хуторной, 1998), что признаки морфоструктуры шишек и семян слабо зависят от текущего физиологического состояния дерева, что позволяет предположить значительный уровень их генотипической обусловленности.

Учитывая, что среди прочих показателей структуры урожая, потери семян на разных стадиях развития наиболее сильно определяются влиянием неблагоприятных факторов внешней среды, внутри группы можно выделить устойчивые индивидуальные различия между особями. Так низкие значения семенной продуктивности у особи K1 обусловлены наличием значительной доли стерильных, не развитых семенных чешуй в фертильной зоне мегастробиллов. Принято считать, что такие случаи в норме могут происходить при отсутствии опыления (Некрасова, 1972; Горошкевич, Хуторной, 1996). У дерева №107 за все годы наблюдения стерильных чешуй в фертильной зоне не наблюдали, это дерево характеризуется самыми стабильными показателями семенной продуктивности в течение ряда лет, что говорит об относительно большей независимости формирования урожая этого дерева от опыления.

3.2 Особенности формирования эмбриологических структур у особей *P. sibirica* с однолетним репродуктивным циклом.

Согласно данным наблюдений, проведенных в 2004-2007 и 2010-2014 гг, начальные этапы формирования репродуктивных структур особей с ускоренным циклом развития не отличались от таковых у типичных деревьев, произрастающих в Западном Саяне. В районе исследования вылет пыльцы и опыление у сосны сибирской зависит от погодных условий и обычно происходит в конце первой декады июня. К этому времени семяпочки исследуемых особей уже сформированы и дифференцированы на присущие роду *Pinus* структуры: интегумент, микропиле, нуцеллус с четко выделенной зоной губчатой ткани (нуцеллярный тапетум), инициальную клетку мегаспороцита (рисунок 8).

Мегаспорогенез у особей с однолетним циклом формирования репродуктивных структур, как и у типичных представителей *P. sibirica*, происходит независимо от опыления. Начало мегаспорогенеза характеризуется относительной синхронностью развития семяпочек в пределах мегастробила. На микропрепаратах в большей части мегаспороцитов отмечается профазы первого деления (рисунок 8г), в единичных семяпочках отмечено прохождение первого деления и соответственно, формирование диад. Через неделю после опыления в семяпочках наблюдаются линейные тетрады и триады мегаспор (рисунок 8д), в дальнейшем апикальные мегаспоры дегенерируют, а базальная мегаспора трансформируется в функциональную мегаспору.

Проращение пыльцевого зерна проходит на фоне профазы редукционного деления мегаспороцита. Через 9-12 дней после завершения опыления большинство пыльцевых зерен, проросло в ткань нуцеллуса. К концу июля длина пыльцевых трубок достигает 200-220 мкм. В пыльцевых трубках как особей с однолетним, так и двухлетним циклом развития просматривалось три ядра: сифогенное, сперматогенное и стерильное.

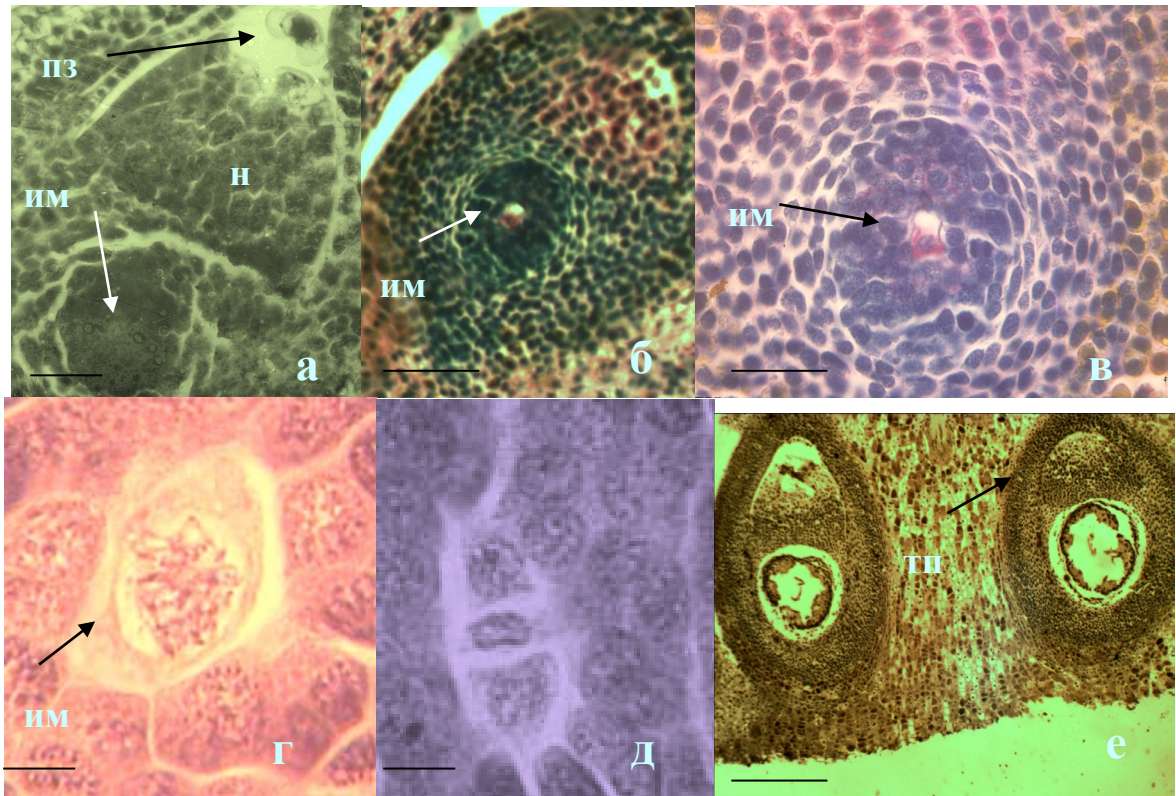


Рисунок 8. - Опыление и мегаспорогенез у *P. sibirica* с однолетним репродуктивным циклом (дерево №106): а – пыльцевое зерно (пз) на нуцеллусе фиксация 12.06. 2006 (масштабная линейка 250 мкм); б, в – инициальная клетка мегаспороцита (им) среди клеток нуцеллуса 12.06.2006 (масштабная линейка 350 мкм,); г – первое деление инициальной клетки мегаспороцита 17.06.2006 (масштабная линейка 650 мкм); д - триада мегаспор 17.06.2006 (масштабная линейка 650 мкм); е - ценоцитная стадия развития мегагаметофита 02.07.2006 (тп – тапетум), (масштабная линейка 250 мкм).

Развитие мегагаметофита у изучаемых деревьев *P. sibirica*, также как у других видов семейства *Pinaceae*, протекало по ценоцитарному типу. Спустя 10-14 дней после опыления ядро функциональной макроспоры женского гаметофита подвергается ряду синхронных делений без образования клеточных стенок – происходит формирование ценоцита. На препаратах в первых числах июля, как у типичных, так и у особей с акселерацией развития мегастробиллов можно видеть от шести до шестнадцати свободных дочерних ядер, располагающихся в цитоплазме женского гаметофита. Мегагаметофит окружен тапетумом, представленным 4-5 слоями темноокрашенных губчатых клеток (рисунок 8е).

Размеры мегагаметофитов у особей с однолетним циклом развития репродуктивных структур и типичных деревьев в этот период статистически не различаются ($t_{106}=1,03$, $t_{107}=1,17$, $t_{\text{крит}}=2,17$) (таблица 8).

Таблица 8. - Рост мегагаметофитов у особей *P. sibirica* с однолетним развитием мегастробиллов.

дата	№ дерева								
	107			106			277		
	Размер мегагаметофита, мкм (М±м)		Число свободных ядер в мегагаметофите (М±м)	Размер мегагаметофита, мкм (М±м)		Число свободных ядер в мегагаметофите (М±м)	Размер мегагаметофита, мкм (М±м)		Число свободных ядер в мегагаметофите (М±м)
	длина	ширина		длина	ширина		длина	ширина	
15.06	45,2±6,0	35,9±4,2	8,7±1,2	40,7±4,1	33,2±6,7	6,3±1,4	43,3±6,3	36,6±5,9	6,4±1,2
02.07	163,4±12,8	125,5±10,1	64,0±7,0	142,5±10,9	108,1±24,6	72,8±13,0	155,2±15,6	115,2±8,7	36,8±1,0
16.07	432±18,7	383±20,9	392±44,2	382±30,8	307±50,7	256±31,1	327±23,1	281±40,2	64,5±10,2
30.07	1154±29,5	965±25,4	Формируются клеточные стенки	756±31,3	622±55,2	Формируются клеточные стенки	366±64,2	306±40,9	128,7±32,3
10.08	1861±44,9	987±30,0	Целлюлярная стадия	1273±33,8	976±61,8	Целлюлярная стадия	364±49,5	316±45,7	132,3±37,9
26.08	2190±51,4	1157±49,9	Целлюлярная стадия	1780±76,5	1185±66,2	Целлюлярная стадия	368±57,8	316±44,8	128,8±40,8

Незначительные вариации в темпах развития семязачек особей с однолетним циклом развития репродуктивных структур, как и типичных особей *P. sibirica*, в указанный период находятся в пределах индивидуальной изменчивости этого признака, и определяются как норма, поскольку подобные картины асинхронности наблюдаются в репродуктивном цикле *P. sibirica* и других видов рода *Pinus* (Некрасова, 1972; Третьякова, 1990).

В начале июля (через 3 недели после опыления) размеры мегагаметофитов у типичных деревьев и особей с однолетним циклом развития репродуктивных структур так же значимо не различаются ($t_{106}=1,98$, $t_{107}=1,73$, $t_{\text{крит}}=2,17$) (таблица 8, рисунок 9).

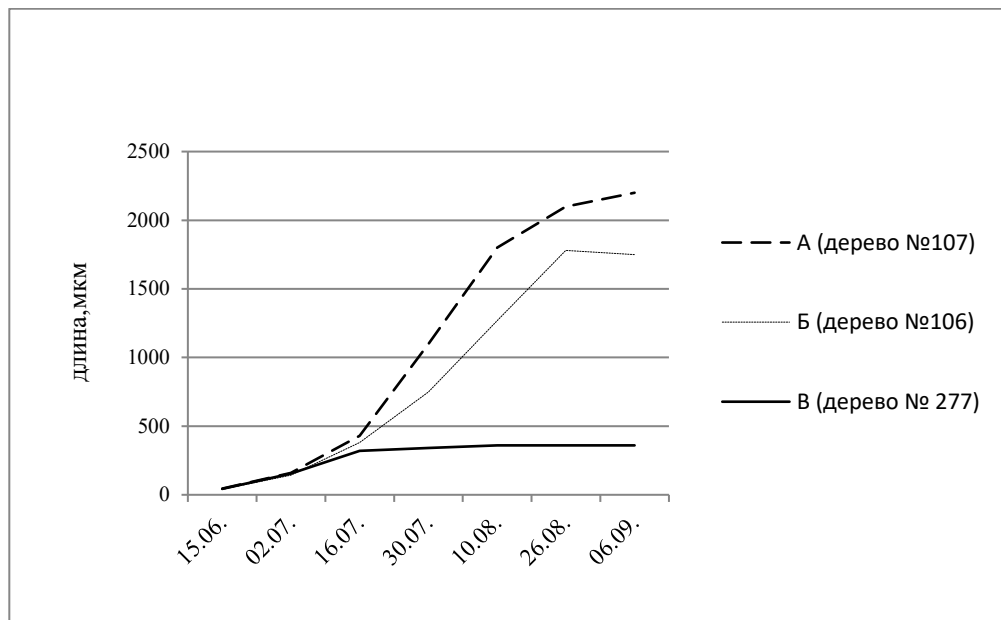


Рисунок 9 - Динамика роста мегагаметофита *P. sibirica* с однолетним (А – дерево №107, Б – дерево №106) и двухлетним репродуктивным циклом (В – дерево №277).

Различия в пролиферативной активности тканей семязпочек типичных особей и особей с акселерацией развития репродуктивных структур становятся заметными в середине июля (через 6 - 7 недель после опыления). Наиболее развитые ценоциты типичных деревьев к этому времени заключают не более 64 свободных ядер, в то время как у исследуемых особей максимальное значение этого признака в 5-6 раз выше. Одновременно с этим выявляется более интенсивный линейный рост семязпочек особей с однолетним циклом развития ($t_{106}=2,42$, $t_{107}=2,25$, $t_{\text{крит}}=2,17$).

Во второй половине июля различия в протекании процессов гаметофитогенеза у типичных и деревьев с однолетним периодом формирования мегастробилов проявляются более ярко. В этот период у особей с однолетним циклом репродуктивного развития начиналось разрастание семенных чешуй, и различия в темпах развитии становятся доступными для непосредственного

визуального наблюдения. К этому времени пыльцевые трубки, внедрившиеся в ткань микропилярного участка нуцеллуса, в среднем достигают 200 мкм, что составляет около 1/3 длины участка от вершины нуцеллуса до границы полости мегагаметофита.

В пыльцевых трубках располагаются спермии, с крупными ядрами и тонким слоем цитоплазмы, а также стерильная клетка.

С середины июля свободноядерные деления в мегагаметофите типичных деревьев *P. sibirica* прекращаются, рост семязпочек и мегастробилов останавливается до весны следующего года. В это же время у форм с ускоренным циклом развития рост мегагаметофита не останавливается, а напротив, становится более интенсивным (рисунок 9).

В третьей декаде июля у особей с однолетним циклом развития репродуктивных структур в мегагаметофите формируются клеточные стенки, что означает переход от ценоцитной к целлюлярной стадии развития.

В начале августа мегагаметофиты особей с ускоренным циклом развития имеют клеточную структуру. В микропилярной зоне мегагаметофита происходит дифференциация архегониев, центральная клетка которых вакуолизируется (рисунок 10 а, б). В одной семязпочке особи с однолетним циклом репродуктивного развития может находиться от двух до четырех архегониев, что также характерно и для типичных деревьев *P. sibirica* с двухлетним репродуктивным циклом. В архегониях происходит деление ядра центральной клетки с образованием яйцеклетки и брюшной канальцевой клетки. Примерно к середине августа в архегониях особей, развивающихся по однолетнему циклу, образовывалась яйцеклетка (рисунок 10 г, д). Центральное расположение ядра яйцеклетки свидетельствует о завершении процессов мегагаметофитогенеза и оогенеза.

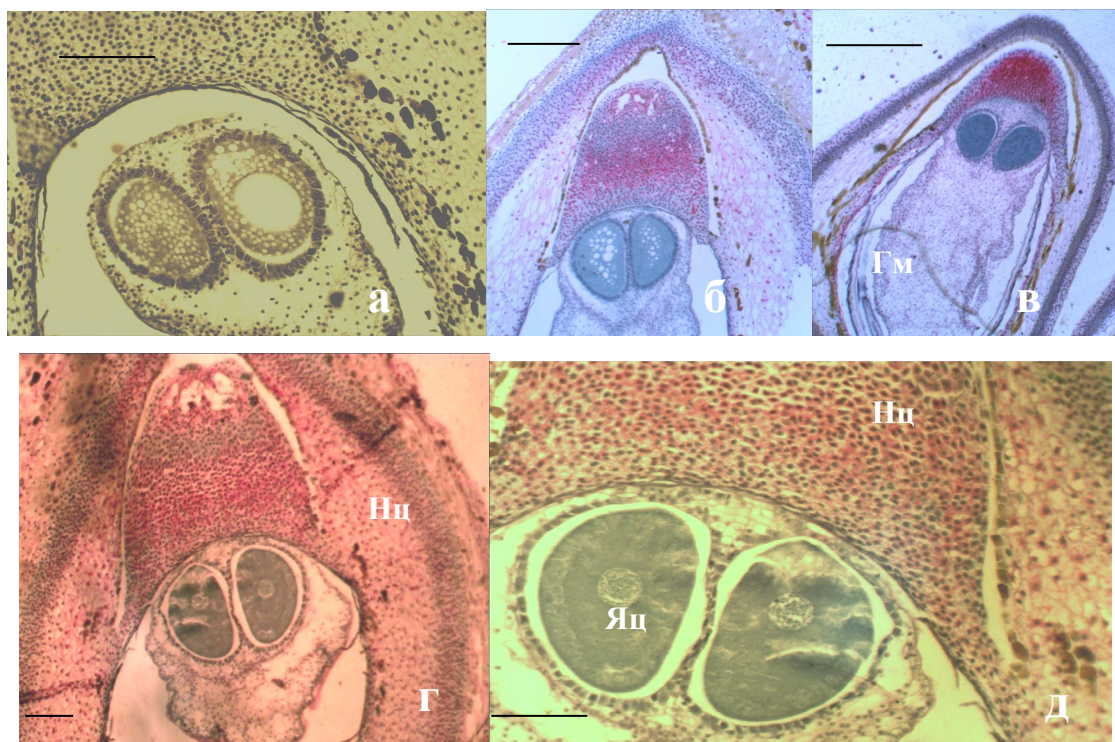


Рисунок 10. Формирование женских репродуктивных структур у *P. sibirica* с однолетним циклом репродуктивного развития: а - вакуолизированные архегонии (дерево 808), б, в- вакуолизированные архегонии (дерево К1) (фиксация 04. 08. 2016); г,д - зрелые архегонии, вмещающие ядро яйцеклетки (дерево 107) фиксация 08. 08. 2006, масштабная линейка 260 Мкм. Обозначения: Нц – нуцеллус, Яц – яйцеклетка, Гм – ткани гаметофита.

Морфологически семяпочки, мегагаметофит и архегонии у особей *P. sibirica* с однолетним циклом развития не отличаются от семяпочек типичных деревьев с двухлетним циклом, при этом размеры семяпочек и мегагаметофитов аномальных особей достоверно ниже ($t_{106} = 2,51$, $t_{107} = 2,73$, $t_{\text{крит}} = 2,31$), чем у типичного дерева 277, различия в размерах архегониев не выявляются.

После образования яйцеклетки в центральной части женского гаметофита особей, с однолетним циклом развития репродуктивных структур, начинается формирование коррозионной полости (зародышевого канала). На микропрепаратах под архегониями выделяется интенсивно окрашиваемая область, что свидетельствуют о заполнении клеток белками, нуклеиновыми кислотами и крахмалом (рисунок 11). Ранее считали, что таким образом клетки оказываются

подготовленными для обеспечения питания растущего зародыша (Doyle, 1963; Singh, 1978; Тарбаева, 1995). В течение пяти-семи дней клетки, заполненные крахмалом, подвергаются лизису, что приводит к формированию коррозионной полости.

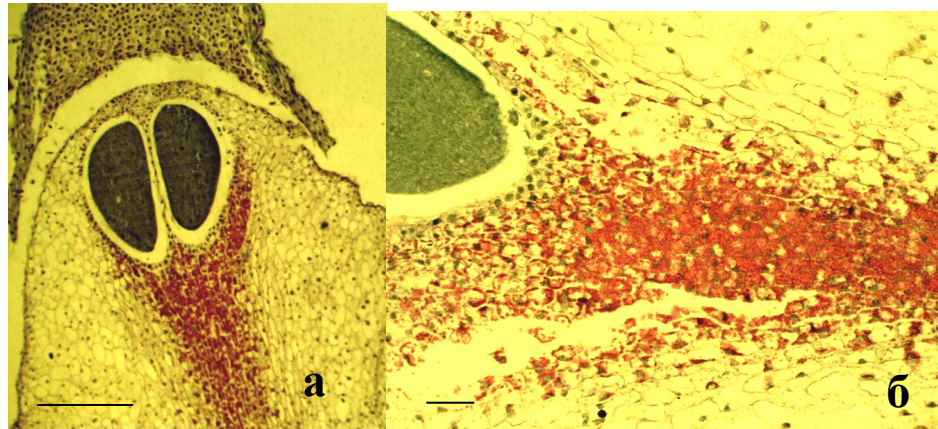


Рисунок 11. - Формирование коррозионной полости в мегагаметофите *P. sibirica* с однолетним репродуктивным циклом (дерево 107): а- накопление крахмала в клетках, расположенных под архегониями; б - лизис клеточных оболочек в средней части мегагаметофита (фиксация 10.08.2006, масштабная линейка 500 Мкм).

Образование коррозионной полости в мегагаметофите до появления зародыша заслуживает особенного внимания, поскольку свидетельствует о жесткой генетической детерминации данного события и допускает возможность пересмотра имеющихся представлений о взаимоотношении зародыша и гаметофита на ранних стадиях развития семени.

Полностью сформированные, готовые к оплодотворению архегонии в семяпочках деревьев с однолетним репродуктивным циклом остаются без изменений около 7 суток. В это время пыльцевые трубки находятся в верхней части нукеллуса, их рост не возобновляется и прорастания к архегониям не происходит.

Несмотря на отсутствие сингамии на некоторых микропрепаратах в этот период наблюдали деление неоплодотворенных яйцеклеток и образование проэмбрио (рисунок 12).

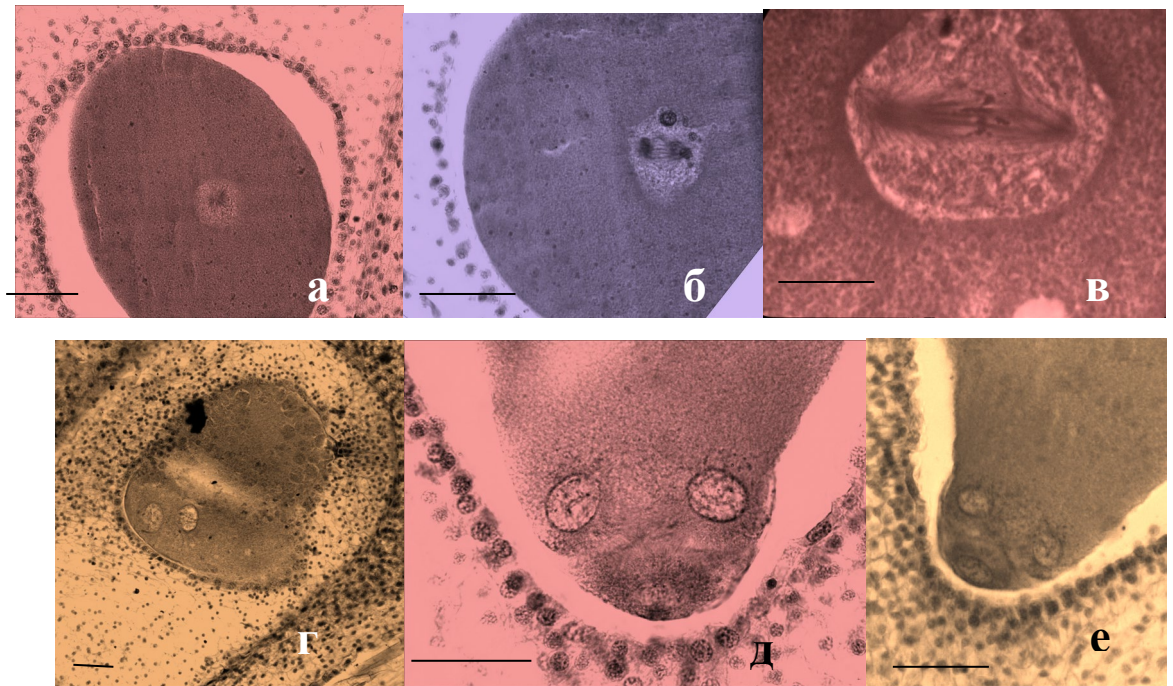


Рисунок 12. Деление неоплодотворенной яйцеклетки у *P. sibirica* с однолетним репродуктивным циклом (дерево 107): а-в - деление ядра (масштабная линейка 1500 Мкм), д - е – образование проэмбрио (масштабная линейка 700 Мкм, фиксация 15.08.2011).

Доля семязпочек с признаками партеногенетического деления варьирует по годам и между особями. Наиболее часто деление неоплодотворенных яйцеклеток наблюдали у дерева №107 (максимальное значение 37% зафиксировано в 2010). У особи №808 деления неоплодотворенных яйцеклеток не отмечали.

Обнаруженное у особей с однолетним циклом развития репродуктивных структур деление неоплодотворенных яйцеклеток является проявлением апомиксиса (по типу партеногенеза) и свидетельствует о высокой физиологической активности семязпочек. Тем не менее, дальнейшие события апомиксиса остаются нереализованным, поскольку образующиеся проэмбрио в дальнейшем подвергаются деструкции.

В третьей декаде августа на микропрепаратах начинают наблюдаться трансформации структуры ядра неоплодотворенных яйцеклеток, что в первую очередь проявлялось в лизисе оболочки. В это время деления клеток в женском гаметофите в большинстве семязпочек отсутствуют или наблюдаются в

незначительном количестве в клетках периферической зоны. Во многих семязпочках в мегагаметофите можно обнаружить признаки деструкции (пикнотические, дисковидные ядра, сжатие и дегенерация цитоплазмы и ядер), происходит разрушение сначала ядер, а в дальнейшем и клеток гаметофита. В конце третьей декады августа во всех семязпочках особей с однолетним репродуктивным циклом архегонии дегенерировали полностью, наблюдались только темные сгустки остатков цитоплазмы яйцеклеток и клеток обкладки (рисунок 13).

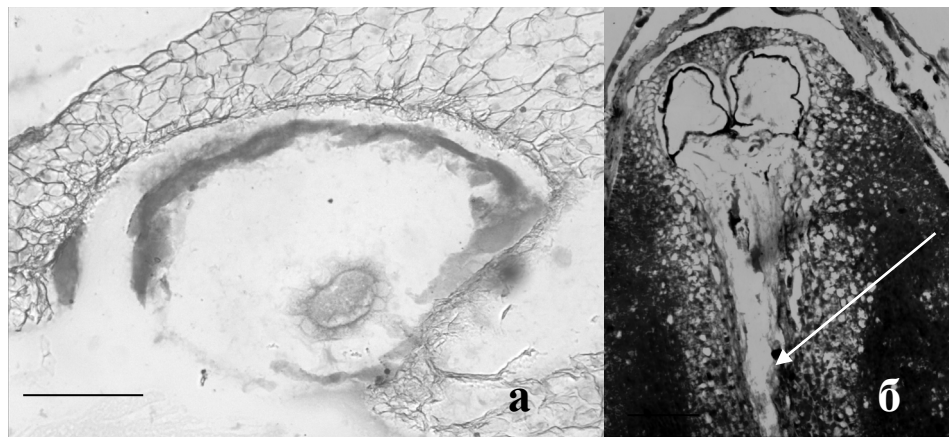


Рисунок 13. - Дегенерация мегагаметофитов и архегониев у *P. sibirica* с однолетним репродуктивным циклом (дерево 107): а - лизис яйцеклетки; б - дегенерация архегониев. Стрелкой показана коррозионная полость. Фиксация 28.08. 2011, масштабная линейка 250 Мкм.

Таким образом, трансформация репродуктивного цикла у особей с акселерацией развития репродуктивных структур заключается в сокращении продолжительности свободоядерной стадии женского гаметофита, и связанной с этим асинхронности развития мужских и женских репродуктивных элементов, что приводит к отсутствию сингамии и незавершенности полового процесса. В тоже время, независимость процессов мегаспорогенеза *P. sibirica* от опыления семязпочек, определяет возможность их вступления на путь партеногенетического (апомиктического) развития.

3.3 Влияние контролируемого опыления пыльцой особей с однолетним репродуктивным циклом на развитие эмбриологических структур *P. sibirica*.

Установленная асинхронность созревания мужского и женского гаметофита у *P. sibirica* с однолетним репродуктивным циклом является вариантом проявления гаметной несовместимости. Поскольку до настоящего времени не обнаружено формирования жизнеспособных зародышей в семенах особей с однолетним репродуктивным циклом, то возникает вопрос о возможности их размножения и способах распространения в естественных условиях.

В течение 2005-2014г.г. проводили контролируемое опыление 17-22- летних клонов *P. sibirica*, произрастающих на прививочной клоновой плантации Западно-Саянского опытного лесного хозяйства (ОЛХ), пыльцой деревьев с однолетним репродуктивным циклом развития женских мегастробилов № 106 и №107. Цель исследований заключалась в выявлении влияния опыления пыльцой деревьев с однолетним репродуктивным циклом развития женских мегастробилов № 106 и №107 на течение эмбриологических процессов в гибридных семенах, получении гибридного потомства и изучении его свойств.

Результаты анализа вариантов контролируемого опыления показали, что пыльца деревьев с однолетним репродуктивным циклом не оказала влияния на морфогенез женских фруктификаций – развитие мегастробилов клоновых деревьев осуществлялось в течении двух лет, по типичному сценарию. В конце первого вегетационного периода размеры мегастробилов у разных клонов составляли 20 - 25мм, что соответствует размерам мегастробилов при свободном опылении. В конце второго вегетационного периода формировались типичные по размерам мегастробилы (длина 60 – 80 мм, ширина 40- 60 мм). При этом семенная продуктивность их в основном, не отличалась, а в ряде случаев, превышала результаты других вариантов контролируемого опыления. Размеры семяпочек, мегагаметофитов и архегониев у клонов не выходят за пределы размеров соответствующих структур, произрастающих в естественном древостое Западного Саяна (таблица 9).

Таблица 9. - Размеры репродуктивных структур у клонов *P. sibirica* при опылении пыльцой деревьев с однолетним репродуктивным циклом.

№ клона	Вариант опыления	Семяпочка, мм		Мегагаметофит, мм		Архегоний, мкм	
		длина $\pm$ m	ширина $\pm$ m	длина $\pm$ m	ширина $\pm$ m	длина $\pm$ m	ширина $\pm$ m
277/ 22	106	8,2 $\pm$ 0,03	3,4 $\pm$ 0,06	7,2 $\pm$ 0,17	2,9 $\pm$ 0,11	620 $\pm$ 103	319 $\pm$ 24
277/ 22	107	8,3 $\pm$ 0,07	3,5 $\pm$ 0,04	7,3 $\pm$ 0,20	3,4 $\pm$ 0,20	642 $\pm$ 75	323 $\pm$ 34
277/ 22	CO	8,2 $\pm$ 0,03	3,4 $\pm$ 0,06	7,2 $\pm$ 0,17	2,9 $\pm$ 0,11	620 $\pm$ 103	319 $\pm$ 24
002/13	106	7,8 $\pm$ 0,07	3,0 $\pm$ 0,05	6,7 $\pm$ 0,07	2,8 $\pm$ 0,01	710 $\pm$ 98	390 $\pm$ 23
002/13	107	7,7 $\pm$ 0,09	2,8 $\pm$ 0,05	6,6 $\pm$ 0,04	2,6 $\pm$ 0,03	704 $\pm$ 69	375 $\pm$ 32
002/13	CO	7,9 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,07	6,9 $\pm$ 0,05	3,1 $\pm$ 0,02	721 $\pm$ 78	407 $\pm$ 39
145/ 4	106	6,9 $\pm$ 0,6	3,1 $\pm$ 0,02	5,8 $\pm$ 0,50	2,9 $\pm$ 0,07	690 $\pm$ 122	395 $\pm$ 19
145/ 4	107	6,5 $\pm$ 0,4	2,9 $\pm$ 0,04	5,5 $\pm$ 0,33	2,5 $\pm$ 0,04	667 $\pm$ 102	365 $\pm$ 27
145/ 4	CO	7,1 $\pm$ 0,6	2,9 $\pm$ 0,03	5,7 $\pm$ 0,51	3,2 $\pm$ 0,04	686 $\pm$ 52	409 $\pm$ 41
153 /13	106	7,2 $\pm$ 0,8	3,0 $\pm$ 0,02	5,9 $\pm$ 0,40	2,7 $\pm$ 0,07	645 $\pm$ 111	373 $\pm$ 18
153 /13	107	7,5 $\pm$ 0,8	3,2 $\pm$ 0,04	6,3 $\pm$ 0,32	3,2 $\pm$ 0,03	662 $\pm$ 98	395 $\pm$ 24
153 /13	CO	7,0 $\pm$ 0,8	2,6 $\pm$ 0,03	5,1 $\pm$ 0,40	2,3 $\pm$ 0,01	625 $\pm$ 111	353 $\pm$ 28
Лимиты для вида (Третьякова, 1990)	CO	6.2-10.4	5.9-9.2	5.8-9.0	2.9-3.5	625-712	324-392

Таким образом, пыльца особей с однолетним репродуктивным циклом не оказывает влияния на скорость развития и конечные размеры эмбриологических структур у клоновых прививок типичных особей *P. sibirica*.

В 2011г. на клоновой плантации впервые появились мегастробилы у 12-летнего клона № 106/4, где в качестве привоя использовалось дерево с акселерацией формирования репродуктивных структур №106. Мегастробилы клона № 106/4 развивались по однолетнему репродуктивному циклу, что свидетельствует о том, что признак передается вегетативному потомству.

3.4 Причины акселерации развития репродуктивных структур у аномальных особей *P. sibirica*

Цитоэмбриологические исследования показали, что мегаспорогенез и морфология женского гаметофита у особей *P. sibirica* с однолетним и двухлетним

генеративным циклом не различаются. В норме продолжительность ценоцитной стадии у *P. sibirica* составляет 10 месяцев и связана с погружением репродуктивных органов в состояние физиологического покоя в середине июля в год опыления. У аномальных особей продолжительность ценоцитной стадии значительно сокращается и составляет несколько недель. Соответственно, акселерация развития репродуктивных структур у исследованных особей объясняется отсутствием периода физиологического покоя мегagamетофита, поскольку в середине июля имеет место аномальная активизация физиологических процессов, обеспечивающих непрерывное развитие женских репродуктивных структур. Изменение скорости и относительных сроков процессов развития - явление, обозначаемое термином «гетерохрония» - может быть обусловлена как мутациями, так и изменением уровня экспрессии генов, вызванным действием регуляторных участков генома (Шишкинская, Юдакова, 2009).

Причины, вызывающие гетерохронию у аномальных особей *P. sibirica*, могут быть установлены дальнейшими исследованиями, в том числе с привлечением молекулярно-генетических методов. Следствием гетерохронии у рассматриваемых особей является асинхронность развития мужских и женских репродуктивных органов, что делает сингамию неосуществимой, и в то же время, становится предпосылкой для вступления семяпочек на путь партеногенетического развития.

Гетерохрония признается одним из классических механизмов эволюции, приводящей к быстрому видообразованию. При этом эволюционный статус особей с однолетним циклом развития репродуктивных структур продолжает оставаться дискуссионным. Высказано мнение, что аномальные особи относятся к реликтам, сохранившим признак однолетнего созревания репродуктивных структур со времен отсутствия резко выраженной смены сезонности, когда развитие женских генеративных органов происходило непрерывно. Данный признак мог сохраниться в оптимальных условиях произрастания низкогорных областей Западного Саяна и Алтая в рецессивном состоянии и периодически проявляться в результате расщепления (Ирошников, 1974).

С другой стороны, одним из признаков эволюционной продвинутости таксона является темп развития женских генеративных структур на период опыления (Тахтаджян, 2007). Разница в сроках формирования гаметофита у *Pinaceae* (от 30 дней до года) обусловлена значительной растянутостью свободной ядерной стадии развития у представителей рода *Pinus*. Этот признак отражает начальные этапы развития мужского и женского гаметофитов в семязачатке и свидетельствует об относительной автономности этих процессов, или о тесном взаимодействии между мужским и женским гаметофитами (Zavada et al., 1986). В таком случае, высокая физиологическая активность рассматриваемых особей, акселерация репродуктивного цикла, ускоренное и в значительной степени автономное развитие женских репродуктивных структур, вплоть до отдельных проявлений апомиксиса позволяют предположить, что изучаемые особи в эволюционном плане обладают чертами определенной прогрессивности. Соответственно, проявление данного признака в популяциях *P. sibirica*, можно рассматривать как свидетельство эволюционного прогресса вида в целом.

Кроме того, известно, что особи с акселерацией репродуктивного цикла характеризуются высоким уровнем углеводного, аминокислотного и гормонального обмена (Минина, Ларионова, 1976), что позволяет предполагать возможность их гибридного происхождения, а саму активацию рассматривать как проявление гетерозиса, обуславливающего высокий физиолого-биохимический потенциал их вегетативных и генеративных органов.

Таким образом, рассматриваемые аномальные формы *P. sibirica* с ускоренным циклом развития репродуктивных структур являются ценным материалом не только для биологических и селекционно-генетических исследований, но и представляют большой интерес для изучения эволюционного процесса у хвойных.

ГЛАВА 4. ФОРМИРОВАНИЕ РЕПРОДУКТИВНЫХ СТРУКТУР У *P. sibirica* ПРИ МЕЖВИДОВЫХ СКРЕЩИВАНИЯХ.

Естественная и искусственная гибридизация являются важным источником генетического разнообразия и новых форм, перспективных для лесной селекции. Искусственная гибридизация проводится с целью получения улучшенных потомков, сочетающих в себе желательные признаки, имеющиеся у каждого из родителей. Кроме того, явление гетерозиса обеспечивает превосходство гибридного потомства в ряде аспектов, включая быстрый рост, высокое качество древесины, устойчивость к болезням и неблагоприятным факторам внешней среды (Houminer, et al., 2022).

Принято считать, что межвидовая гибридизация в семействе *Pinaceae* играет существенную роль в адаптации и эволюции этого таксона (Райт, 1978; Бобров, 1983; Critchfield, 1986; Коропачинский, Милютин, 2006; НАО, et al., 2015; Goroshkevich et al., 2018).

Эксперименты по контролируемому опылению различных видов семейства *Pinaceae*, демонстрирующие возможность получения межвидовых гибридов, позволяют эмпирически подтвердить данное предположение (Vasilyeva, Goroshkevich, 2018). Необходимо признать, что до настоящего времени сообщения об успешных результатах межвидовой гибридизации у *P. sibirica* крайне ограничены, и потенциал, которым обладают гибридные формы не нашел полноценного воплощения в современном лесоводстве и лесовосстановлении.

Учитывая огромное значение, которое имеет гибридизация для выполнения селекционно-генетических программ, следует признать, что имеющихся данных недостаточно для качественного понимания закономерностей и тонкостей процессов, происходящих при межвидовых скрещиваниях как у представителей сосновых вообще, так и у *P. sibirica* в частности. Глубокое знание особенностей развития репродуктивных структур при гибридизации позволит преодолеть проблему несовместимости, получить доступ к преимуществам гетерозисных поколений и новым формам с хозяйственно ценными признаками.

Цель нашей работы заключалась в выявлении особенностей развития репродуктивных органов и эмбриологических структур при искусственном межвидовом опылении у *P. sibirica*.

4.1 Развитие репродуктивных структур *P. sibirica* при контролируемом межвидовом опылении *P. sibirica* × *P. koraiensis*

Развитие репродуктивных структур у семян первого года в опытном и контрольном варианте происходило сходным образом, по сценарию, характерному для *P. sibirica* в целом.

Микрогаметогенез. В течение недели после опыления пыльцевые зерна прорастали на нуцеллусе. В целом начальные этапы развития мужских репродуктивных структур в варианте опыления *P. sibirica* × *P. koraiensis* происходили аналогично их развитию в контрольном варианте (рисунок 14).

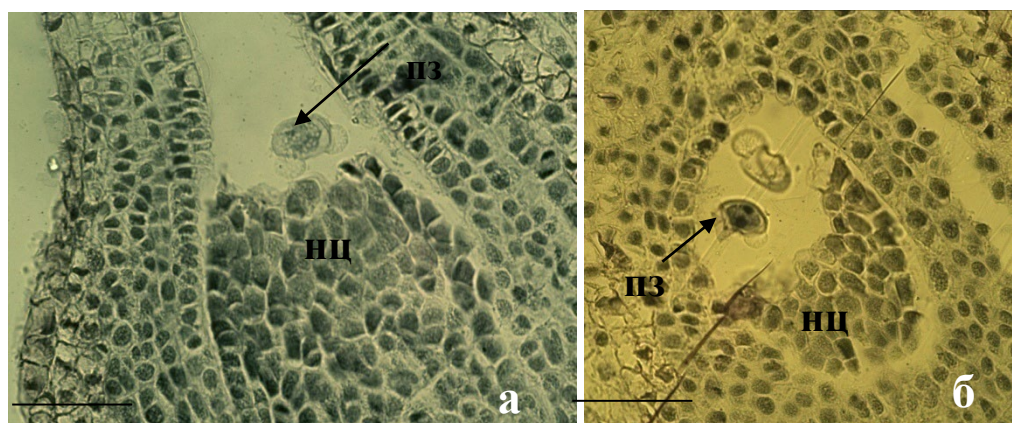


Рисунок 14. - Пыльцевое зерно (пз) на нуцеллусе (нц) *P. sibirica*: а – вариант опыления *P. sibirica* × *P. koraiensis*, б – вариант опыления *P. sibirica* × *P. sibirica*. Фиксация 12.06. 2013, масштабная линейка 50 Мкм.

Через месяц после опыления (середина июля) как в опытном, так и в контрольном варианте пыльцевые трубки проросли вглубь нуцеллуса примерно на одну третью часть, при этом не выявлено статистически достоверных различий в длине пыльцевых трубок в контрольном и опытном варианте (Таблица 10).

Таблица 10. Развитие мужских половых структур в семяпочке *P. sibirica* при искусственном меж- и внутривидовом опылении

	Вариант опыления	
Дата наблюдения	<i>P. sibirica</i> × <i>P. koraiensis</i>	<i>P. sibirica</i> × <i>P. sibirica</i>
10.06	Проведение искусственного опыления. Жизнеспособность пыльцы 74,5%	Начало вылета пыльцы 09.06. Жизнеспособность пыльцы 89,4%
15.07	Длина пыльцевых трубок $129,9 \pm 15,8$ мкм ($C_v=15,8\%$).	Длина пыльцевых трубок $132,6 \pm 13,6$ мкм, ($C_v=9,9\%$).
$t_{\text{крит}} = 2,3$	$t=1,1$ - различия не достоверны ($p=0,21$)	
30.07	Длина пыльцевых трубок $142,6 \pm 30,3$ мкм, ($C_v=27,3\%$).	Длина пыльцевых трубок $147,0 \pm 16,8$ мкм ($C_v=15,2\%$).
$t_{\text{крит}} = 2,3$	$t=1,7$ - различия не достоверны ($p=0,61$)	
28.08	Длина пыльцевых трубок $145,1 \pm 13,9$ мкм ($C_v=35,7\%$).	Длина пыльцевых трубок $152,9 \pm 13,7$ мкм ($C_v=12,7\%$).
$t_{\text{крит}} = 2,3$	$t=1,9$ различия не достоверны ($p=0,58$);	

Продолжительность роста мужского гаметофита в год опыления составила 40 - 45 дней, о завершении ростовых процессов свидетельствовало отсутствие изменений размеров пыльцевых трубок в последний месяц вегетации семяпочек первого года. К окончанию вегетации длина пыльцевых трубок в опытном варианте достоверно не отличалась от контроля (Таблица 10), при этом и в опытном, и в контрольном варианте генеративная клетка переместилась из пыльцевого зерна в пыльцевую трубку. Таким образом, в год опыления рост пыльцевых трубок *P. koraiensis* в семяпочке *P. sibirica* происходил сходным с контролем образом.

Мегагаметогенез. Развитие женского гаметофита в варианте межвидового опыления *P. sibirica* × *P. koraiensis* и в контрольном варианте происходило

сходным образом (рисунок 15). В период опыления в функциональном мегаспороците завершались первые деления мейоза, происходило образование тетрады мегаспор, соответственно женский гаметофит развивался от мегаспоры материнской клетки до стадии функциональной мегаспоры.

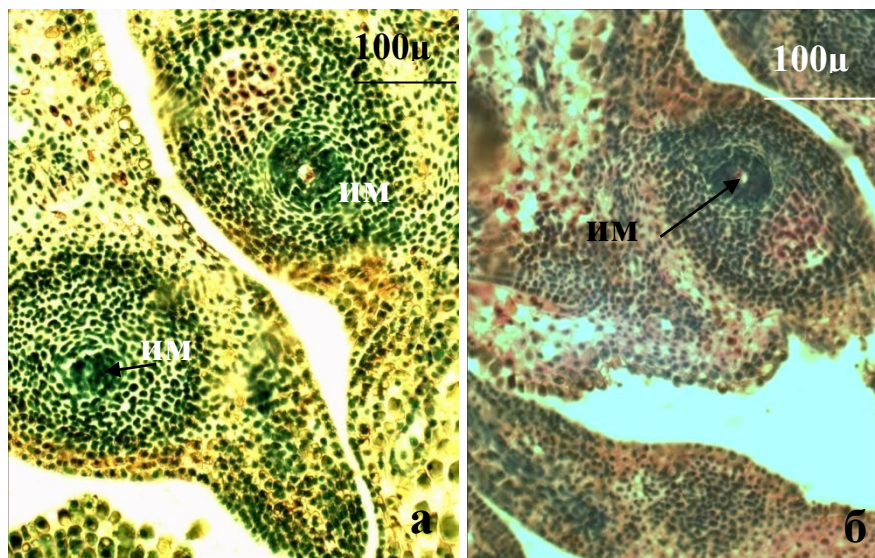


Рисунок 15.- Инициальная клетка мегаспороцита (им) *P. sibirica*: а – внутривидовое опыление (контроль); б – межвидовое опыление *P. sibirica* × *P. koraiensis*.

На препаратах от 15 июля (через 4-5 недель после опыления) в функциональной мегаспоре отмечали увеличение числа свободных ядер, располагающихся в цитоплазме, что свидетельствует о вступлении мегагаметофита в ценоцитную стадию, при этом размеры женских репродуктивных структур в опытном и контрольном варианте достоверно не различались. К завершению вегетации (28 августа) длина мегагаметофита в опытном варианте составила 623 ± 51 мкм, длина семязпочки 1525 ± 120 мкм, в контрольном варианте длина мегагаметофита – 635 ± 44 мкм, длина семязпочки – 1518 ± 135 мкм (рисунок 16). Различия в размерах женских репродуктивных структур (семязпочек и мегагаметофитов) в опытном и контрольном варианте статистически недостоверны ($t = 0,95$; $t_{\text{крит}} = 2,13$). Таким образом, у исследованных особей *P. sibirica* женский гаметофит в опытном, как и в контрольном варианте в год опыления развивается до ценоцитной стадии, в ней

заканчивает вегетацию и погружается в зимний покой, что является признаком, характерным для вида в целом.

Размеры мегастробилов при искусственном межвидовом и внутривидовом опылении в первый год развития так же достоверно не различались: к окончанию вегетации длина шишек при свободном опылении составила $1,7 \text{ см} \pm 0,3$, длина шишек в контрольном варианте $1,6 \text{ см} \pm 0,5$ ($t=1,38$; $t_{\text{крит}}=2,13$).

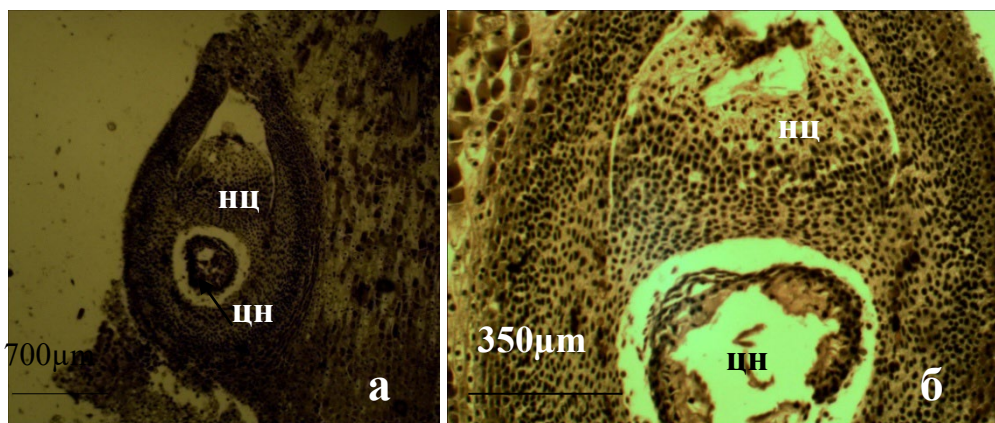


Рисунок 16.- Первый год развития семязпочки (ценоцитная стадия) у *P. sibirica*: а – внутривидовое опыление (контроль); б – опыление *P. sibirica* × *P. koraiensis*. Фиксация 28.08.2013. Обозначения: нц – нуцеллус, цн – ценоцит.

Таким образом, в год опыления начальные этапы развития репродуктивных структур при внутривидовом опылении и в варианте опыления *P. sibirica* × *P. koraiensis* осуществляются сходным образом. Прорастание пыльцевых зерен отмечали во всех исследованных образцах. Кроме того, следует отметить, что на данном этапе не наблюдали каких-либо отклонений или аномалий в развитии как женских, так и мужских репродуктивных структур, ни в контрольном, ни в опытном варианте, что говорит об отсутствии проявлений несовместимости гамет в первый год.

Различия опытных и контрольных вариантов наиболее ярко начинали проявляться после периода зимнего покоя, на второй год развития. В период проведения наблюдений (первая декада июня), мегастробилы в опытном и контрольном вариантах выглядели жизнеспособными и возобновили вегетацию. Микропрепараты показали, что в этот период мегагаметофиты уже находились на

стадии сформированных архегониев (рисунок 16). Вакуоли в центральных клетках архегониев значительно увеличились и достигли максимальных размеров в середине первой декады июня. Принято считать, что данный этап характеризуется максимальной насыщенностью метаболических процессов и событий.

Важно заметить, что в период возобновления развития репродуктивных структур у *P. sibirica* выявляли определенную асинхронность прохождения фаз мегаспорогенеза, которая проявлялась как на уровне отдельных особей в выборке, так и в пределах одного мегастробила. Например, в семяпочках мегастробилов собранных 12.06.2014 можно было наблюдать несколько стадий зрелости архегония – от более ранней, когда архегоний заполнен крупными вакуолями и не готов к оплодотворению (рисунок 16), до полной спелости, когда ядро зрелой яйцеклетки располагается в центре архегония (рисунок 17, 18).

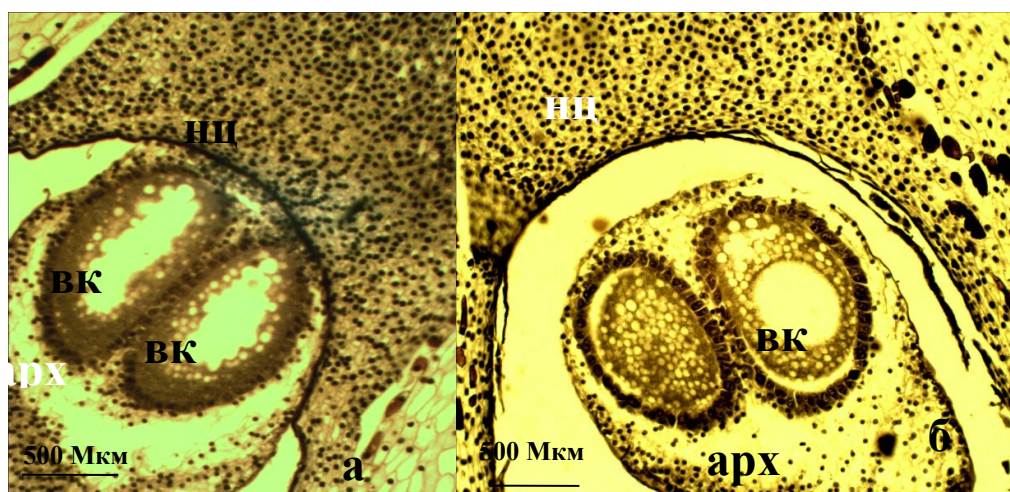


Рисунок 17.- Вакуолизированные архегонии у *P. sibirica*: а - внутривидовое опыление (контроль); б – межвидовое опыление *P. sibirica* × *P. koraiensis*. Фиксация 12.06.2014. Обозначения: нц – нуцеллус, вк – вакуоли, арх – архегоний.

После деления центральной клетки архегония происходит образование яйцеклетки и брюшной канальцевой клетки, которая располагается в микропиллярной части архегония (рисунок 18).

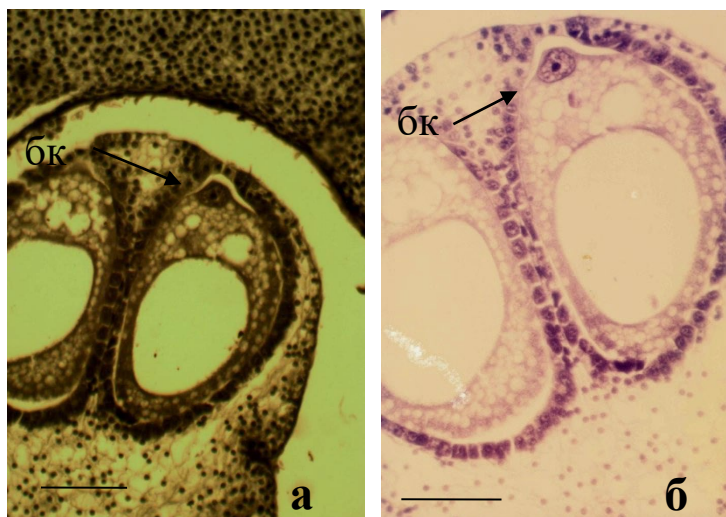


Рисунок 18.- Развитие архегониев у *P. sibirica*: образование яйцеклетки и брюшной канальцевой клетки: а - внутривидовое опыление (контроль), б – межвидовое опыление *P. sibirica* × *P. koraiensis*. Фиксация 12.06.2014, масштабная линейка 500 Мкм. Обозначения: бк - брюшная канальцевая клетка, як – яйцеклетка.

Мегагаметофиты исследуемых особей *P. sibirica* достигают полной зрелости в конце первой – начале второй декады июня, что в районе исследования характерно для вида в целом. Сформированные архегонии включают расположенное в центре ядро яйцеклетки (диаметр - 160-180 мкм) и окружены однослойной обкладкой. Основной объем клеток обкладки занят ядром, они интенсивно окрашиваются на белки и нуклеиновые кислоты (рисунок 19).

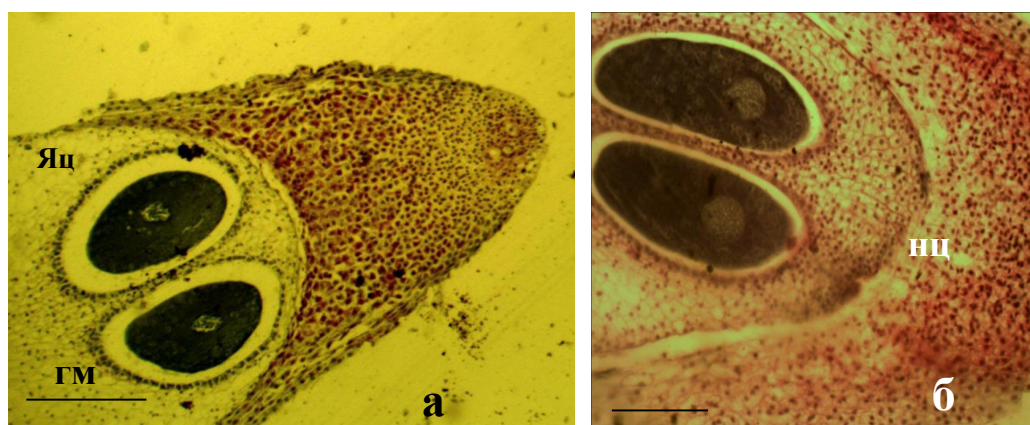


Рисунок 19. - Зрелые яйцеклетки *P. sibirica*: а - внутривидовое опыление (контроль), б - межвидовое опыление *P. sibirica* × *P. koraiensis*. Фиксация 12.06.2014, масштабная линейка 200Мкм. Обозначения: Яц – яйцеклетка, Нц – нуцеллус, Арх – архегоний, Гм – гаметофит.

Опыление чужеродной пылью не оказало существенного влияния на размеры женских репродуктивных структур. Размеры зрелых семязачатков, мегаспорофитов и архегониев в варианте опыления *P. sibirica* × *P. koraiensis* статистически не отличаются от размеров репродуктивных структур в контрольном варианте (таблица 11), что свидетельствует о том, что в начале второго года вегетации развитие женских репродуктивных структур в контрольном и опытном варианте осуществляется сходным образом.

Таблица 11. Размеры репродуктивных структур у *P. sibirica* при разных вариантах опыления в начале второго года внепочечного развития

Вариант опыления	Семязачаток		Мегаспорофит		Архегонии	
	длина	ширина	длина	ширина	длина	ширина
	M±m, мм	M±m, мм	M±m, мм	M±m, мм	M±m, мкм	M±m, мкм
<i>P. sibirica</i>	8,2±0,2	3,4±0,1	3,5±0,3	1,9±0,1	620±14	340±12
<i>P. koraiensis</i>	7,8±0,4	3,1±0,1	3,4±0,3	1,9±0,1	610±16	345±19
$t_{крит}=2,5$	$t = 2,3$	$t = 0,9$	$t = 1,5$	$t = 0,7$	$t = 1,1$	$t = 1,2$

В середине июня в варианте внутривидового опыления оплодотворение было зафиксировано в 90% рассмотренных препаратов, семязачатки содержали до 4-8 ядер первичных проэмбрио, в отдельных случаях фиксировали переход к собственно эмбриогенезу, связанному с выходом первичного проэмбрио за пределы архегония в коррозионную полость. Не оплодотворенными оставалось не более 10% семязачатков внутривидового варианта опыления. В это же время в варианте межвидового опыления *P. sibirica* × *P. koraiensis* оплодотворения обнаружить не удалось. При этом в течение 7-10 дней большинство семязачатков оставались в стадии зрелой яйцеклетки. На фоне нормального завершения развития и готовности к оплодотворению женских репродуктивных структур не было обнаружено признаков возобновления роста пыльцевых трубок, не было завершено прорастание через ткани нуцеллуса и достижения канальцевой клетки, ведущей к архегонию. В большинстве случаев следы пыльцевых трубок

просматривались в верхней трети нуцеллуса, где их наблюдали в конце первого года вегетации. Важно отметить, что в условиях проведения эксперимента (географические клоновые плантации кедровых сосен лаборатории лесной генетики и селекции Института леса СО РАН, Ермаковский район, Красноярский край) все фенологические события (возобновление вегетации, цветение и пыление и пр.) у особей *P. koraiensis* происходят на 12-14 дней позднее, чем у *P. sibirica*. Возможно, что более высокие требования к температуре воздуха имеют критичное значение и приводят к рассинхронизации развития мужского и женского гаметофитов при искусственном межвидовом опылении и невозможности оплодотворения. Также возможно, что в начале вегетации второго года, в период возобновления роста, в тканях семязпочек произошло разрушение и резорбция пыльцевых трубок чужого вида.

Таким образом, на второй год внепочечного развития в опытном варианте искусственного опыления *P. sibirica* пыльцой *P. koraiensis* было обнаружено отсутствие синхронного развития микрогаметофита, произошедшее на фоне нормального развития мегагаметофита, что привело к незавершенности полового процесса и отсутствию оплодотворения.

Обращает внимание что, несмотря на отсутствие оплодотворения в варианте опыления *P. sibirica* × *P. koraiensis* после созревания архегониев, по описанной ранее схеме, характерной для *P. sibirica* в целом, происходило формирование коррозионной полости. Образование коррозионной полости в отсутствии зародыша в развитых мегагаметофитах *P. sibirica* при межвидовых скрещиваниях (как и у особей с акселерацией репродуктивного цикла), подтверждает генетическую детерминированность данного процесса и позволяет ставить вопрос о пересмотре традиционных представлений о характере взаимоотношений между мегагаметофитом и зародышем, имеющих место при нормальном эмбриогенезе.

В начале июля в большей части семязпочек опытного варианта ярко проявляются деструктивные процессы. Сначала происходит распад содержимого архегониев, в последующем разрушается весь мегагаметофит. В середине июля

семена, полученные в результате контролируемого искусственного опыления, заполнены деградирующим содержимым (рисунок 20).

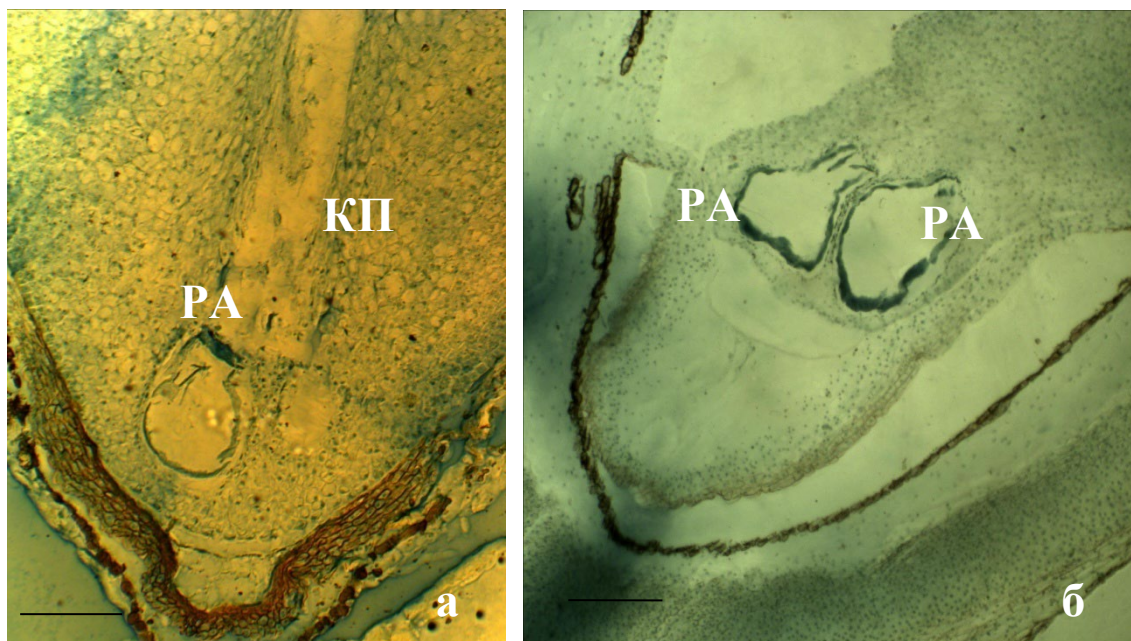


Рисунок 20.- Состояние гаметофита в середине вегетации 2 года внепочечного развития при отсутствии оплодотворения вариант *P. sibirica* × *P. koraiensis*. Обозначения: РА – разрушенный архегоний, КП – коррозионная полость. Фиксация 24.07.2014.

В середине июля (через 3 - 4 недели после созревания яйцеклеток) различия размеров мегастробиллов контрольных и опытных деревьев ($40,2 \pm 1,8$ и $32,5 \pm 2,1$ мм соответственно) становятся статистически значимыми ($t=14,08$; $p=0,123$), (рисунок 21).

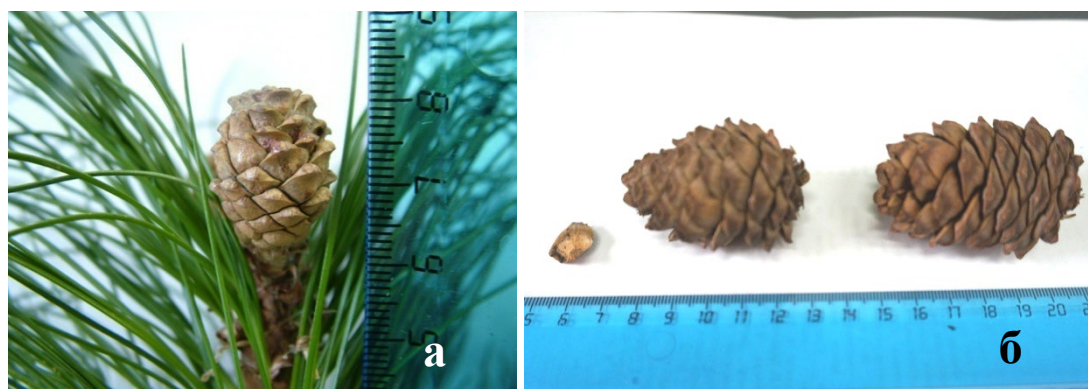


Рисунок 21. - Женские шишки варианта опыления *P. sibirica* × *P. koraiensis*: а – в период окончания первого года вегетации, 26.08.2013; б – на второй год вегетации, 24.07.2014.

В последних числах июля в сохранившихся мегастробилах содержатся пустые, мелкие семена (длина в контроле $5,4 \pm 0,18$ мм, в опыте $2,3 \pm 0,1$ мм, различия статистически значимы $t=4,81$; $p = 0,102$). В единичных случаях отмечали гаметофиты не подверженные деструкции, но и в таких случаях в развитой коррозионной полости зародыш не обнаруживался.

Наши исследования показали, что при искусственном межвидовом опылении *P. sibirica* $\times$ *P. koraiensis*, прорастание пыльцы *P. koraiensis* на нуцеллусе *P. sibirica* происходит, но на второй год вегетации развитие мужских гаметофитов не возобновляется. Не зафиксировано завершения прорастания пыльцевых трубок к архегониям, соответственно, не удалось обнаружить признаков сингамии половых клеток данных видов.

Сообщений об успешных межвидовых скрещиваниях *P. sibirica* $\times$ *P. koraiensis* не много, при этом авторы сходятся во мнении, что скрещивания *P. sibirica* $\times$ *P. koraiensis* менее успешны, чем *P. sibirica* $\times$ *P. cembra* (Титов, 1988; Vasilyeva, Goroshkevich, 2018). В эксперименте Докучаевой М. И. для опыления *P. sibirica* была использована смесь пыльцы *P. sibirica* и *P. koraiensis*. Были получены полные семена, которые были высажены и проросли. Из восьмидесяти полученных взрослых растений, у четырех, согласно данным изоферментного анализа, доказано гибридное происхождение (Политов, 2007). При этом у выявленных гибридов отмечается значительное (до 3 раз) увеличение скорости роста, что является важным фактором, обеспечивающим интерес к продолжению и масштабированию подобных исследований. Таким образом, в описанном эксперименте выход гибридов составил не более 5%, что позволяет говорить о наличии барьеров гибридизации для межвидового скрещивания *P. sibirica* $\times$ *P. koraiensis*.

Механизмы барьеров гибридизации данных видов ранее не рассматривались. Как и у других представителей рода *Pinus* несовместимость данных видов может проявляться как на уровне избирательности оплодотворения, так и предпочтительности роста пыльцевых трубок своего вида или элиминации гибридных зародышей на ранних стадиях развития.

В нашем исследовании был обнаружен арест развития микрогаметофтов *P. koraiensis* на нуцеллусе *P. sibirica*, что является проявлением прогамных (до оплодотворения) репродуктивных барьеров, а также позволяет говорить о наличии механизмов распознавания чужеродной пыльцы у *P. sibirica*. Сходные явления описаны для других сосновых (Hiratsuka, 2011). В тоже время не исключено, что несовместимость обусловлена несовпадением ритмов развития репродуктивных структур данных видов, либо разными экологическими требованиями для возобновления роста. В последнем случае, в отдельные годы, при совпадении определенных погодных условий, мужские гаметофиты *P. koraiensis* могут успеть завершить развитие в тканях *P. sibirica* и осуществить оплодотворение.

Важно заметить, что для количественного учета выраженности явления несовместимости у *P. sibirica*, изучения влияния экологических факторов, поиска методов экспериментальных воздействий исследования должны быть продолжены.

4.2 Развитие эмбриологических структур в варианте опыления *P. sibirica* × *P. cembra*.

Основные параметры женских репродуктивных структур материнского дерева (клон № 02 «Ведьмина метла») соответствуют таковым у нормальных деревьев (таблица 13).

Таблица 13. Размеры эмбриологических структур у *P. sibirica* клон № 02 при разных вариантах опыления

Вариант опыления	Семяпочка		Мегаметофит		Архегоний	
	длина M±m, мм	ширина M±m, мм	длина M±m, мм	ширина M±m, мм	длина M±m, мкм	ширина M±m, мкм
Свободное опыление	6.5±0.4	2.3±0.2	3,5±0,4	2,3±0,2	610±51	422±39
<i>P. cembra</i>	6.2±0.3	2.3±0.1	3.8±0.7	2.3±0.1	573±38	368±21
$t_{крит}=2,5$	$t=1,5$	$t=0,5$	$t=1,7$	$t=1,5$	$t=1,9$	$t=1,1$

В варианте опыления *P. sibirica* × *P. cembra* развитие женских репродуктивных структур и их размеры не имеют статистически значимых различий от свободноопыленных.

В доступную для наблюдения фазу анатомическое строение и время развития гибридных зародышей *P. sibirica* × *P. cembra* соответствовали таковым у зародыша *P. sibirica* (рисунки 22,23).

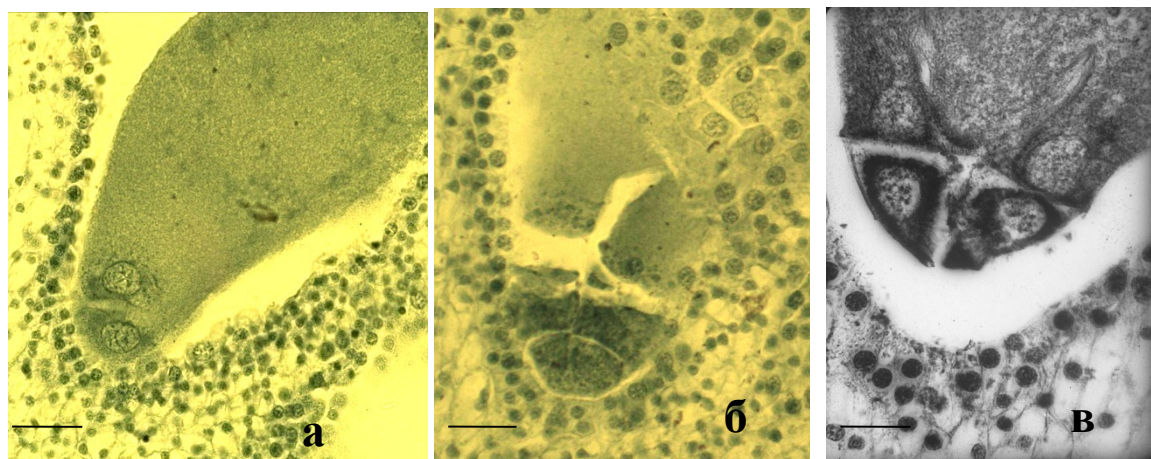


Рисунок 22. - Начальные этапы формирования гибридного зародыша *P. sibirica* × *P. cembra*: а - ядра проэмбрио располагаются в основании архегония; б – окончание свободнуклеарной стадии, обособление первого проэмбрионального слоя; в – восьмиклеточный первичный проэмбрио.

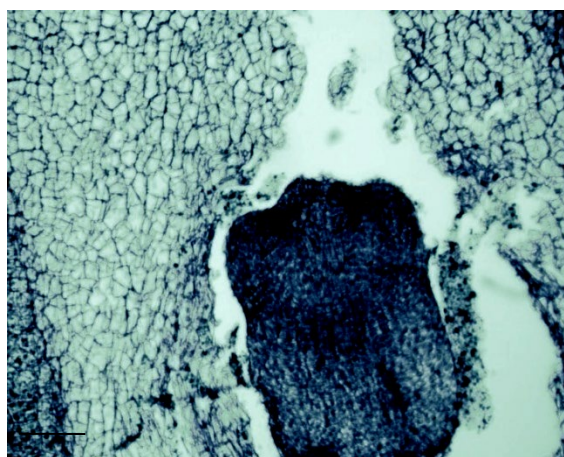


Рисунок 23. - Закладка примордиев семядолей у гибридного зародыша *P. sibirica* × *P. cembra*. Фиксация 28.06.2014, масштабная линейка 500 мкм.

Данный вариант межвидового опыления *P. sibirica* признается наиболее успешным в имеющихся литературных источниках (Титов, 1988; Vasilyeva, Goroshkevich 2018).

Сингамия и последующее развитие зародыша свидетельствуют об гаметной совместимости, отсутствие эндогенных механизмов репродуктивной изоляции между данными видами, что подтверждает имеющееся у многих авторов представление об их филогенетической близости, основанное на отсутствии четких морфологических и молекулярно-генетических различий между ними (Куприянова, 1974; Муратова, 1983; Крутовский и др., 1990; Тарбаева, 1995; Белоконь, 1998; Политов, 2007). В частности, у *P. sibirica* и *P. cembra* выявлено идентичное строение проводящих пучков и клеточных стенок мезофилла, значительное отличающее их от других представителей кедровых сосен (Горошкевич, Попов, 2009). Также показано, что уровень генетических различий у *P. sibirica* и *P. cembra* на порядок меньше, чем между другими видами пятихвойных сосен (Политов, 2007).

Совокупность имеющихся данных о значительной филогенетической близости между *P. sibirica* и *P. cembra* приводит к тому, что периодически поднимается вопрос о необходимости таксономической ревизии и пересмотре таксономического статуса данных видов. В любом случае, очевидно, что *P. sibirica* и *P. cembra* являются потомками общего предка, единый ареал которого оказался разорванным во время последнего оледенения, около 5 млн. лет (Бобров, 1983; Шуваев, 2025).

В процессе видообразования определяющее значение имеет возникновение барьеров репродуктивной изоляции между видами. Времени, прошедшего с момента размыкания ареалов *P. sibirica* и *P. cembra* недостаточно для формирования пост- и предзиготических репродуктивных барьеров, являющихся проявлением дивергенции видов, а значит имеющаяся между ними репродуктивная изоляция носит чисто внешний, экологический характер.

4.3 Развитие репродуктивных структур *P. sibirica* при контролируемом межвидовом опылении пыльцой некоторых видов секции *Strobi*

В пределах подсекции *Strobi* проведен цитозмбриологический анализ результатов пяти вариантов искусственного межвидового опыления: *P. sibirica* × *P. armandii*, *P. sibirica* × *P. parviflora*, *P. sibirica* × *P. strobilus*, *P. sibirica* × *P. hokkaidensis* и *P. sibirica* × *P. wallichiana*.

Объектами нашего исследования были мегастробилы второго года развития, собранные во второй декаде июня. Известно, что в случае отсутствия опыления у *P. sibirica* семяпочки останавливаются в росте и неопыленные мегастробилы засыхают в течение первого года вегетации (Третьякова, 1990). Во всех рассмотренных вариантах межвидового опыления шишки в начале вегетации второго года сохраняли витальность, что может косвенно подтверждать прорастание чужеродных пыльцевых зерен в ткань нуцеллуса.

Исследование семяпочек второго года показало, что формирование женских репродуктивных структур в разных вариантах контролируемого межвидового опыления происходило сходным образом, по сценарию, характерному для *P. sibirica*. В зависимости от погодных условий, главным образом суммы эффективных температур семяпочки *P. sibirica* возобновляют развитие в конце второй - начале третьей декады мая. К началу июня мегагаметофит увеличивается в размерах и приобретает клеточную структуру.

В рассмотренных опытных вариантах наблюдали значительную вариативность и асинхронность развития женских репродуктивных структур. В пределах одного мегагастробила одновременно присутствовали семяпочки с недоразвитыми, вакуолизированными архегониями, сформированными яйцеклетками, а также с разной выраженностью деградиционных процессов в мегагаметофите (некротизированные архегонии, с пустыми клеточными оболочками (рисунок 24).

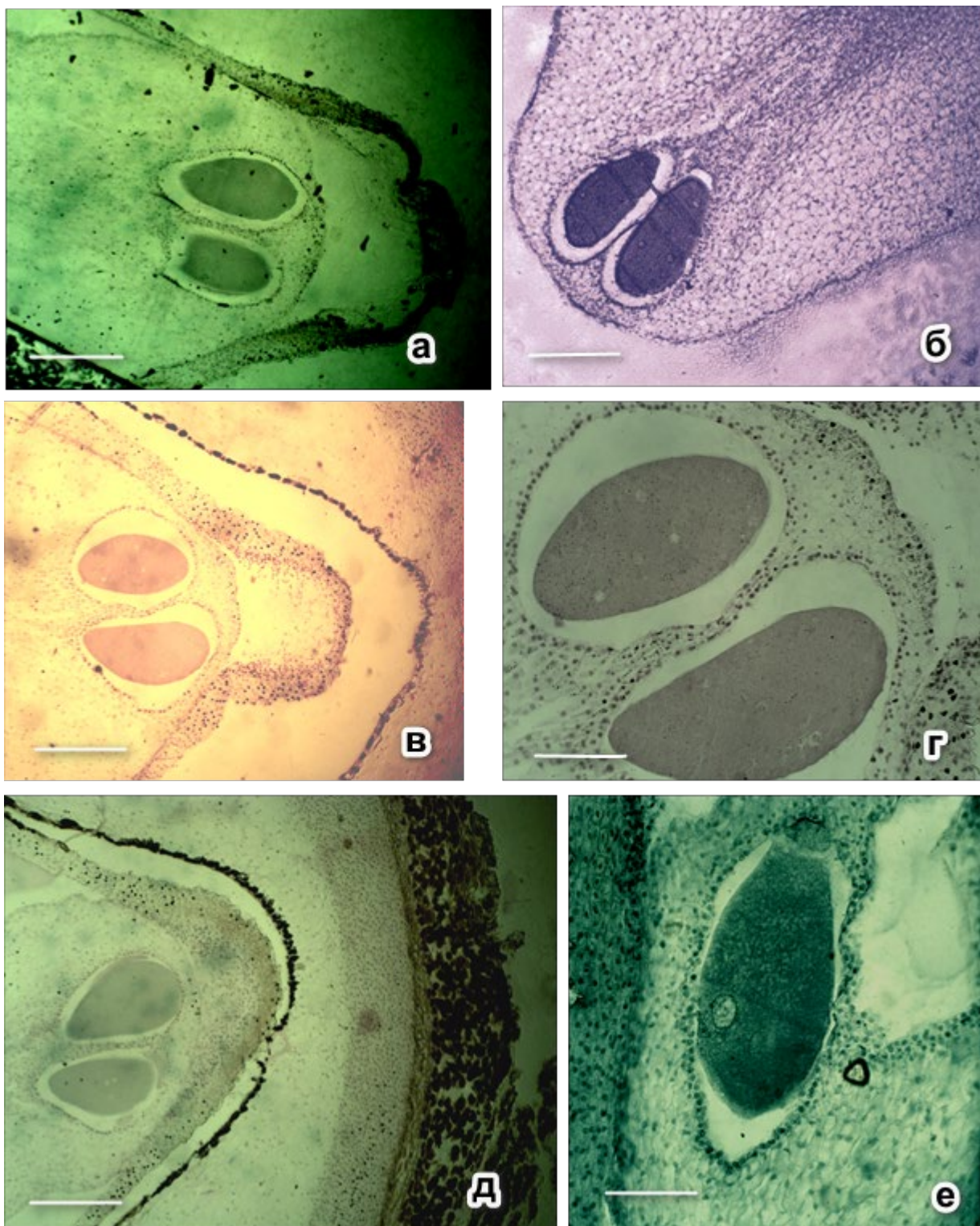


Рисунок 24. - Зрелые архегонии *P. sibirica* клон № 90 при различных вариантах контролируемого межвидового опыления: а - опыление *P. parviflora*; б - опыление *P. strobus*; в - опыление *P. wallichiana*; г - опыление *P. hokkaidensis*; д – опыление *P. armandii*; е – свободное опыление, видны ядра проэмбрио. Фиксация 12.06.2013, масштабная линейка 250 Мкм.

Размеры семязпочек во всех вариантах контролируемого межвидового опыления оказались статистически значимо ниже, чем в контрольном варианте ($F_{5/51}=3,12$, $p=0,19$) в то время, как размеры мегагаметофитов и архегониев опытных вариантов и свободноопылённых семязпочек *P. sibirica* статистически не различались ($F_{5/51}=2,03$, $F_{5/51}=1,92$) (таблица 14).

Таблица 14 - Размеры женских репродуктивных структур у *P. sibirica* на второй год развития при различных вариантах контролируемого межвидового опыления

Вариант опыления	Семязпочка		Мегагаметофит		Архегонии	
	длина М±m, мм	ширина М±m, мм	длина М±m, мм	ширина М±m, мм	длина М±m, мкм	ширина М±m, мкм
СО	6,0±0,5	4,7±0,26	3,7±0,2	2,5±0,1	630±17	352±19
<i>P. hokkaidensis</i>	5,4±1,4	3,3±0,3	3,3±0,2	2,2±0,2	604±43	357±31
<i>P. parviflora</i>	5,5± 0,2	4,0±0,3	3,4±0,2	2,4±0,1	576±54	334±28
<i>P. strobus</i>	5,1±0,7	4,0±0,5	2,9±0,1	1,7±0,3	524±58	248±25
<i>P. wallichiana</i>	5,4±0,03	3,7±0,1	3,4 ±0,2	1,9±0,2	544±32	254±29
<i>P. armandi</i>	5,5±0,03	3,2±0,05	3,2±02	1,6±0,1	636±38	285±25

Таким образом, искусственное опыление семязпочек *P. sibirica* пылью видов подсекции *Strobi* не оказало статистически значимого влияния на размеры женских репродуктивных структур.

Полученные результаты позволяют предположить, что конечные размеры женских репродуктивных структур у *P. sibirica* в значительной мере детерминированы генетическими факторами, при этом для активации их развития необходимо стимулирующее присутствие мужского гаметофита.

Во всех опытных вариантах отмечали характерные отклонения от нормального развития репродуктивных структур. В первую очередь это проявлялось в отсутствии или замедлении развития микрогаметофита, при этом в ряде случаев пылевые трубки на нуцеллусе семязпочек не просматривались. Наблюдаемое отсутствие пылевых трубок на второй год развития в вариантах межвидового опыления, может свидетельствовать о резорбции проросших

пыльцевых трубок. Время образования клеточного мегагаметофита и архегониев (начало июня) является критическим периодом, когда ярко проявляются деградиционные процессы в семяпочках сосновых. Этот период характеризуется стремительным увеличением размеров (в 6-7 раз) женского гаметофита. Интенсификация роста сопровождается усилением обменных процессов в семяпочке и зародышевом мешке, в первую очередь трофических и гормональных (Минина, Ларионова, 1979; Баранцева, 1992), повышается содержание ДНК (Ермаков, 1980). Возможно, что при напряженности ростовых и сопутствующих физиологических процессов, несовместимость генотипов, а также воздействие неблагоприятных (несоответствующих) экологических факторов, могут привести к деградации и последующей резорбции мужского гаметофита.

Незавершенность полового процесса и отсутствие оплодотворения в течении 1,5 – 2 недель приводит к последовательной деградации женского гаметофита, которая начинается с разрушения архегониев, а в дальнейшем распространяется на весь мегагаметофит (рисунок 25), что в свою очередь приводит к развитию пустосемянности к окончанию вегетационного периода.

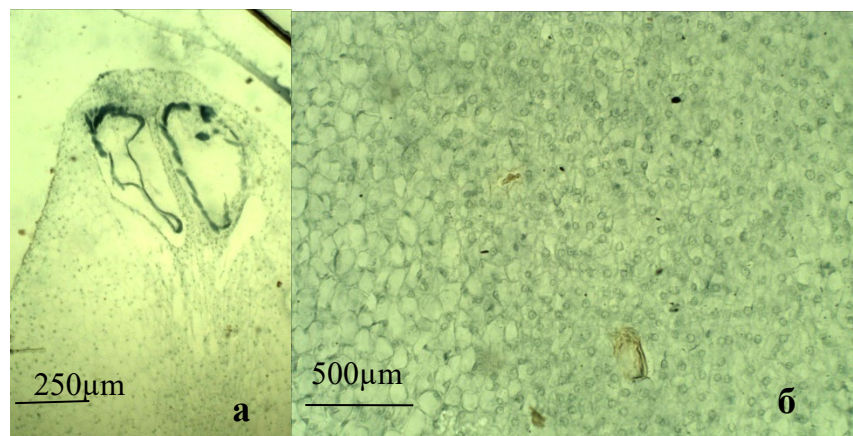


Рисунок 25. - Деградация мегагаметофитов при межвидовом скрещивании: а-разрушение архегониев; б -пустые оболочки клеток мегагаметофита (фиксация 10.08. 2014).

4.4 Структура урожая мегастробиллов при контролируемом межвидовом опылении

Результаты исследования структуры урожая женских шишек представлены в таблице 15.

Таблица 15. - Структура урожая мегастробиллов *P. sibirica* при разных вариантах опыления

Вариант скрещивания	длина <i>l</i> шишки, мм	диаметр <i>d</i> шишки, мм	отношение ширина / длина	число семенных чешуй, шт	число развитых семян, шт	семенная продуктив- ность, %
<i>P. sibirica</i> × <i>P. koraiensis</i>	584	412	0,71	72	43	28
<i>P. sibirica</i> × <i>P. cembra</i>	607	427	0,69	70	53	37
<i>P. sibirica</i> × <i>P. armandii</i>	555	363	0,65	63	22	17
<i>P. sibirica</i> × <i>P. parviflora</i>	563	401	0,71	71	23	16
<i>P. sibirica</i> × <i>P. strobilus</i>	587	378	0,64	72	18	14
<i>P. sibirica</i> × <i>P. hokkaidensis</i>	600	389	0,65	69	22	16
<i>P. sibirica</i> × <i>P. wallichiana</i>	577	397	0,69	66	24	17

Значения линейных размеров мегастробиллов во всех рассмотренных вариантах искусственного межвидового опыления располагаются в пределах, характерных для линейных размеров мегастробиллов *P. sibirica* при свободном опылении (555-607мм в опытных и 540-635 мм в контрольном вариантах). Пропорции линейных размеров также соответствуют видовым характеристикам (0,65-0,89). Наблюдаемый эксцесс значений к нижней границе нормы может быть связан как с особенностями материнских деревьев (клона, задействованного в эксперименте), так и с большим числом недоразвитых семян в фертильной зоне мегастробиллов опытных вариантов, что приводит к снижению средних значений этого показателя.

Обращает внимание значительное снижение семенной продуктивности, на фоне нормального числа семенных чешуй. Общее число семенных чешуй – морфогенетический признак, определяющийся генотипом материнского растения и не зависящий от опыления. Число семян и общая семенная продуктивность – признаки, детерминированные как внутренними (генотипом и физиологическим состоянием особи), так и внешними факторами (экологические условия, пыльцевой режим и т.д.). Таким образом, можно однозначно утверждать, что искусственное опыление чужеродной пылью привело к значительному снижению числа полных семян в фертильной зоне мегастробиллов. Причем даже в наиболее успешном варианте искусственного опыления *P. sibirica* × *P. cembra* семенная продуктивность снижена по сравнению с нормой (60% вместо 70-80%). Снижение семенной продуктивности при нормальном заложении семязачатков в фертильной зоне помимо прочего, может указывать на недостаточное опыление в условиях эксперимента. Варианты опыления пылью видов, относящихся к подсекции *Strobi*, приводят к более чем трехкратному снижению числа полных семян, по сравнению с самым удачным вариантом межвидового опыления *P. sibirica* × *P. cembra* и в 1,5-2 раза по сравнению с вариантом опыления *P. sibirica* × *P. koraiensis*.

4.5 Проявления несовместимости при межвидовых скрещиваниях *P. sibirica* и возможности их преодоления.

В результате проведенных исследований установлено, что из представленных в эксперименте семи вариантов опыления *P. sibirica* пыльцой видов подсекции *Strobus*, завершение полового процесса, оплодотворение и формирование зародыша было осуществлено только в варианте *P. sibirica* × *P. cembra*. В остальных вариантах получить гибридные зародыши не удалось, более того, не было зафиксировано случаев оплодотворения чужеродных яйцеклеток. Отсутствие сингамии в рассмотренных вариантах межвидового опыления обусловлено задержкой или полным отсутствием развития мужского гаметофита на фоне нормального развития женского гаметофита. Когда препятствием для получения гибридного потомства является неспособность чужеродных гамет осуществить сингамию, принято говорить о предзиготической несовместимости.

Несовместимость, проявляющаяся в предсингамный период возможна только при наличии у организма механизма распознавания чужеродных гамет, существование которого у *Pinaceae* продолжает оставаться мало изученным вопросом. Основой для реакции предзиготической несовместимости у покрытосеменных растений является сложный полисахаридный состав клеточных стенок и мембран (Вишнякова, 1994; Першина, Трубачеева 2016), в тоже время высокая специфичность реакций несовместимости позволяет предполагать важную роль белков в этом процессе (Breygina, et al., 2021).

В литературных источниках представлено очень незначительное работ по межвидовым скрещиваниям у сосен. Ограниченное число видов, фокус внимания исследователей и особенности описания результатов в доступных источниках не позволяют говорить о глубоком понимании проблемы несовместимости в семействе *Pinaceae*.

Например, в одной из ранних работ были получены данные, позволяющие отрицать наличие барьеров несовместимости, связанных с развитием микрогаметофита или аббераций в процессе оплодотворения. Так было установлено, что в вариантах скрещиваний *P. peuce* × *P. cembra*, *P. peuce* × *P.*

koraensis, *P. strobilus* × *P. flexilis* оплодотворение происходит нормально. У 100% семяночек варианта *P. strobilus* × *P. cembra* и 60% семяночек варианта *P. strobilus* × *P. koraiensis* отмечалось присутствие как минимум одного эмбриона в коррозионной полости, но на 3-12 сутки после оплодотворения отмечали гибель образовавшихся зародышей на стадии проэмбриона, еще внутри архегония (Hagman, Mikkola, 1963).

В ряде случаев несовместимость при межвидовых скрещиваниях у сосен связана с асинхронностью развития мужского и женского гаметофитов: к моменту прорастания пыльцевой трубки через нуцеллус яйцеклетка была еще не готова к оплодотворению или наоборот, уже начинались проявления распада (Krugman, 1972).

Данные о межвидовых скрещиваниях с участием *P. sibirica* ограничены очень небольшим числом комбинаций, причем цитоэмбриологические исследования не проводились. Несколько более обширный материал доступен по результатам искусственного межвидового опыления максимально генетически близкого вида - *P. cembra*, кедра европейского (Swiss stone pine). Опубликованы данные, что получены гибриды в вариантах искусственного межвидового опыления, *P. cembra* × *P. wallichiana*, *P. cembra* × *P. monticola*, *P. cembra* × *P. sibirica*. При этом варианты опыления *P. cembra* × *P. koraiensis*, а также *P. cembra* × *P. pumila* оказались гораздо менее успешными (Blada, 1994).

Были получены жизнеспособные семена от вариантов скрещивания *P. lambertiana* × *P. armandii* и *P. lambertiana* × *P. koraiensis* (Critcheld, 1986).

Для *P. sibirica* получены данные *P. sibirica* × *P. pumila* -25%, *P. sibirica* × *P. peuce* - не более 1% (Vasilyeva, Goroshkevich, 2018).

Наиболее успешный вариант скрещиваний, полученный в этом эксперименте - *P. sibirica* × *P. cembra* (63, 5% полных семян), что в целом подтверждается нашими данными по структуре урожая и цитоэмбриологии – в доступные периоды исследований наблюдалось нормальное развитие зародыша. Значительно менее успешен вариант опыления *P. sibirica* × *P. wallichiana* – 13% полных семян и почти такой же результат -11% полных семян получен в вариантах скрещивания *P. koraiensis* × *P. armandii* и *P. koraiensis* × *P. sibirica*.

Особого внимания заслуживают результаты реципрокного скрещивания – в варианте *P. koraiensis* × *P. sibirica* получено 11,3% полных семян, в то время как опыление *P. sibirica* × *P. koraiensis* менее удачное – получено только 4,2 % полных семян. Возможно, что это связано с результатом влияния цитоплазмы или особенностей ядерно-цитоплазматических взаимодействий. Реципрокные гибриды сочетают один и тот же ядерный гибридный геном с разной цитоплазмой, поэтому при наличии различий между парами реципрокных гибридов их можно считать примером роли ядерно-цитоплазматических взаимодействий в постзиготической изоляции.

Наличие естественной гибридизации у *P. pumila* и *P. parviflora* (Watano et al., 1996), *P. echinata* и *P. taeda* L. (Xu, 2008), *P. pumila* и *P. sibirica* считается доказанной молекулярно-генетическими методами (Политов, 2007; Горошкевич и др, 2010), но количественной оценки скрещиваемости в условиях эксперимента пока не производилось.

В ряде источников представлено мнение, что у сосен отсутствуют барьеры несовместимости, связанные с развитием микрогаметофита или абберации в процессе оплодотворения. При этом не всегда учитываются диссонирующие с этим представлением данные. Например, в эксперименте по искусственному ксено- и аллогамному опылению у *P. contorta* наличие механизма самонесовместимости доказано эффектом предпочтительного оплодотворения чужой пылью: выход гетерозигот в 1.5–2 раза превышал расчетные ожидания, что подтверждается выявленными различиями по скорости роста пыльцевых трубок в тканях нуцеллуса (Hagman, Mikkola 1963). В часто цитируемой работе «Incompatibility and inviability systems among some western north American pines» (Krugman, 1972) прямо указывается, что «...наиболее критический период в развитии гибридных семян у сосен происходит до оплодотворения и связан с неспособностью пыльцевых трубок прорасти на нуцеллусе».

Также о наличии механизма распознавания чужеродной пыльцы может свидетельствовать тот факт, что даже в успешных вариантах контролируемого межвидового опыления, завершившихся формированием полных семян, сингамия

происходит на 2-7 дней позднее, чем в случае внутривидового скрещивания (Kriebel, 1972).

Данные о результатах межвидового скрещивания имеют важное значение для уточнения таксономии и систематики. Выделенные таксономические единицы должны отражать реальные эволюционные взаимоотношения, что соответственно, позволяет быть основанием для аргументированных ожиданий результатов межвидовых скрещиваний. Важно отметить, что если первоначально имевшиеся представления о систематике хвойных в основном базировались на результатах анализа морфологических признаков, то в последнее время, все шире применяются молекулярно-генетические методы, которые лишь в отдельных случаях подтверждают ранее сделанные выводы (Wei-Tao Jin et al., 2021). Привлечение цитоэмбриологических признаков (строение и развитие мужских и женских репродуктивных органов, оплодотворение и ранние этапы эмбриогенеза), являющихся наиболее консервативными структурами растительного организма (Тахтаджян, 2007), может явиться одним из условий для решения вопроса о филогенетической систематике сем. *Pinaceae*.

В результате анализа результатов нескольких сотен вариантов искусственного межвидового опыления более 40 разных видов сосен (Приложение) было установлена невозможность успешных скрещиваний между видами, принадлежащими к разным подродам. Помимо констатации факта, что представители подрода *Pinus* и *Strobus* абсолютно не способны к скрещиванию между собой, было высказано предположение о принципиальном различии в характере проявления несовместимости у представителей подрода *Pinus* и *Strobus*. В то время как для *Pinus* характерно полное торможение прорастания чужеродных пыльцевых зерен на нуцеллусе, что приводит к деградации внутренней структуры семяпочек, постепенном засыхании целых макростробилов и опадении их через несколько месяцев после опыления, еще в первый год развития, у *Strobus* развитие и мужского и женского гаметофитов в первый год после опыления происходит нормальным образом независимо от варианта опыления (Critchfield, et al., 1986).

Также на основании результатов исследований проявлений несовместимости было высказано предположение, что родство между видами внутри секции *Strobus* значительно больше, чем между видами в секции *Pinus* (Kriebel, 1972).

Получены многочисленные подтверждения того, что в роде *Pinus* не только секции, но и подсекции генетически изолированы друг от друга, и гибридизация возможна лишь внутри подсекций. Таким образом, данные о проявлениях несовместимости при скрещивании видов, относящихся к секции *Strobus* позволяют уточнять таксономическое подразделение рода *Pinus*, а на основании этого, прогнозировать результаты еще неосуществленных скрещиваний и наличие полезных характеристик и свойств у гибридов.

Вариант скрещивания *P. sibirica* x *P. koraiensis* по нашим и литературным данным (Титов, 1988; Vasilyeva, Goroshkevich, 2018) менее успешен, чем *P. sibirica* x *P. cembra*. Этот факт также согласуется данными, другими методами: в морфологическом и молекулярно-генетическом отношении *P. koraiensis* отстоит от *P. sibirica* дальше *P. cembra* (Козубов, Муратова, 1986; Gernandt, 2005; Политов, 2007; Wei-Tao, 2021).

Очевидно, что для учета данных о межвидовой гибридизации для принятия решения о необходимости деления секции *Strobus* на две подсекции, необходимы глубокие исследования на более объемных выборках, с учетом частоты встречаемости и качественной фиксацией времени наступления проявлений несовместимости. В общем виде наши исследования показали, что результаты скрещивания кедра сибирского с кедром корейским, ранее относимым к подсекции *Cembra*, не имеют принципиальных отличий от результатов скрещивания с видами сосен, относимых к подсекции *Strobi*.

Кроме того, заслуживает внимания факт, что искусственное опыление *P. koraiensis* пыльцой максимально генетически близких видов *P. sibirica* и *P. cembra* привело к значительно различающимся результатам: в первом случае получено 11% полных семян, а вариант скрещивания *P. koraiensis* x *P. cembra* оказался неудачным -100% полученных семян были пустые (Vasilyeva, Goroshkevich,

2018). Если исключить возможность повреждений и дезактивации пыльцы *P. cembra* во время хранения, то данный факт может свидетельствовать о наличии генетических различий между *P. sibirica* и *P. cembra*, и соответственно, подтверждать необходимость отдельного таксономического статуса данных видов.

Для понимания результатов межвидовых скрещиваний важно учитывать, характерные особенности развития репродуктивных структур сем. *Pinaceae*, например, что мейоз и начальные этапы формирования мегagamетофита могут происходить независимо от опыления (Owens et al., 1982; Третьякова, 1990). Принципиальной новизной обладает установленное нашими исследованиями автономное развитие женских репродуктивных структур у *P. sibirica*. В то время как у сосны обыкновенной *P. sylvestris* деградация мужского и женского гаметофитов в период после опыления до оплодотворения, приводит к отсутствию возобновления роста семяпочки весной второго года развития (Белостоцкая, 1979), у *P. sibirica* на второй год семяпочка начинает расти и признаки деградации появляются значительно позднее – только после полного созревания яйцеклетки, в связи с незавершенностью полового процесса.

Результаты наших исследований показали, что при искусственном межвидовом опылении в семяпочках *P. sibirica*, пыльцевые зерна могут прорасти в ткань нуцеллуса и оказывать стимулирующее действие на развитие женского гаметофита – в год опыления развитие женских гаметофитов опытных вариантов осуществляется сходно с развитием контрольного варианта. Причины остановки развития чужеродных микрогаметофитов в тканях *P. sibirica* в настоящее время неизвестны. У *P. sibirica*, после опыления гаплоидные клетки мужского гаметофита вступают в контакт с тканями диплоидного спорофита – нуцеллуса. В варианте межвидового опыления *P. sibirica* x *P. koraiensis* в первый год задержки развития микрогаметофита, проявляющейся в недостаточном росте пыльцевых трубок, не отмечалось. Тем не менее, поскольку нам не удалось зафиксировать случаев сингамии или прямого контакта между мужским и

женским гаметофитом, можно говорить о гаметной селективности и проявлении несовместимости в предсингамный период.

Полученные результаты свидетельствуют, что проявления несовместимости, приводящие к развитию пустосемянности у *P. sibirica* могут заключаться как в остановке эмбрионального развития в постсингамный период, при взаимодействии зародыш – мегагаметофит (Политов, 2007), или ядра проэмбрио – окружающая цитоплазма, так и значительно раньше - в предсингамный период, вследствие гаметной несовместимости, подобно тому, как описано у *P. sylvestris* (Белостоцкая, 1979).

Схожие данные получены при межвидовом опылении *P. lambertiana* × *P. monticola* - семяпочки не возобновляли развитие после выхода из периода зимнего покоя и коллапсировали на ценоцитной стадии, не переходя к клеточной. Затем в течение недели происходило потемнение и усыхание мегастробиллов (Fernando et al., 2005).

Время и механизмы ареста развития мужского гаметофита должны быть прояснены путем дальнейших исследований. При постановке последующих экспериментов необходимо учитывать, что обнаруженная незавершенность полового процесса и арест развития чужеродных микрогаметофитов в семяпочке *P. sibirica*, также может быть связан с рядом других причин (например, неблагоприятными температурными условиями в период возобновления роста репродуктивных структур). Для более глубокого понимания исследования должны быть продолжены с участием (и подробной фиксацией нюансов) разных родительских генотипов и учетом действия экологических факторов.

Кроме того, во всех рассмотренных вариантах межвидового опыления нельзя исключить влияния хранения пыльцы на протекание репродуктивных процессов. Например, было показано, что даже при хороших показателях проращивания пыльцы сосны обыкновенной после хранения при температуре 0-4 °C в эксикаторах над хлористым кальцием, опыление такой пыльцой приводит к различным нарушениям нормального развития семяпочек и значительно повышает выход пустых семян в зрелых шишках при внутривидовом опылении

(Сурсо, 1989). Соответственно, при планировании последующих экспериментов необходимо отдельное внимание уделить хранению пыльцы и контролю ее качества.

Наши исследования показали, что при межвидовом опылении *P. sibirica* в отдельных семязпочках возможно полное развитие архегониев, которые разрушаются только на стадии яйцеклетки. То есть, после опыления мегagamетофит *P. sibirica* способен проходить все стадии развития вплоть до зрелой яйцеклетки независимо от развития мужского гаметофита. Таким образом, женская репродуктивная система *P. sibirica* отличается значительной детерминированностью - ее развитие запускается автономно, активизируется опылением, и в некоторых случаях может продолжаться даже при отсутствии сопряженного развития мужских гамет. Относительная автономность развития мегagamетофита с одной стороны является предпосылкой, обеспечивающей возможность вступления семязпочек *P. sibirica* на путь апомиктического развития, с другой стороны может объяснять расхождение в результатах, полученных разными исследователями.

Следует учесть, что продолжительность стадий эмбриогенеза у *P. sibirica* очень различается. Например, развитие архегониев длится несколько недель, зрелая яйцеклетка сохраняет способность к оплодотворению в течении нескольких суток, а сингамия и последующие события проэмбриогенеза завершается, в течении нескольких часов. Соответственно, чем короче продолжительность какой - либо фазы в эмбриогенезе, тем реже ее фиксация и затруднительней изучение на микропрепаратах.

В ряде работ по межвидовой гибридизации сосен принято полагать, что развитие коррозионной полости запускается только актом оплодотворения. В таком случае, наличие коррозионной полости рассматривают как подтверждение факта сингамии, а отсутствие развивающихся зародышей объясняется их ранней элиминацией. В нашей работе было показано, что у *P. sibirica* формирование коррозионной полости запускается созревaniem архегония, и может проходит на фоне отсутствия сингамии. Соответственно, наличие коррозионной полости в

мегагаметофитах у *P. sibirica* не может быть индикатором завершения полового процесса (оплодотворения).

Таким образом, полученные цитозмбриологические данные свидетельствуют о жесткой генетической детерминации развития репродуктивных структур у *P. sibirica*.

Имеющиеся данные показывают, что вопрос о формах и проявлениях межвидовой несовместимости у хвойных далек от однозначного решения.

Преодоление барьеров несовместимости. Исследования многих видов растений показали, что течение репродуктивных процессов обусловлено не только генетическими особенностями организма, но и в значительной степени определяется факторами внешней среды (Gauthier, et al, 1993; Носкова, 2006). Поскольку было показано, что биолого-экологических факторы оказывают значительное влияние на результаты гибридизации *P. sibirica* (Титов, 1983), то учет экологической составляющей при проведении экспериментов по гибридизации должен быть обязателен.

Для преодоления несовместимости, связанной с нарушениями прорастания пыльцевых трубок и оплодотворения, у ряда двудольных растений используют опыление *in vitro* в сочетании с методами культивирования завязей, семяпочек и изолированных зародышей (Першина, Трубчиева, 2018). Также показано, что слабое облучение пыльцы гамма-лучами способствует снижению барьера презиготической несовместимости у сосен (Kormutak, 1984).

Как и по другим признакам, в проявлениях несовместимости, может обнаруживаться значительная индивидуальная изменчивость, которая выражается в различии силы и направленности реакции отдельных особей на межвидовое опыление. Индивидуальная изменчивость позволяет объяснить расхождения в результатах, полученных разными авторами, поскольку в связи с большой трудоемкостью, число родительских комбинаций, используемых при межвидовой гибридизации обычно ограничено несколькими особями. Отмечают, что отбор родительских особей имеет для получения гибридных семян столь же большое значение, как и комбинация видов. Соответственно, преодоление

несовместимости и повышение выхода гибридных семян может быть получено путем подбора родительских пар, даже у слабо скрещивающихся видов. Но в отношении голосеменных результаты подобных исследований практически не представлены в литературе.

Поиск генотипов, у которых презиготические барьеры несовместимости менее выражены, а также искусственное ослабление этих барьеров, обеспечат возможность преодолеть межвидовую несовместимость и получить новые хозяйственно-ценные гибриды.

Получение сортов лесных видов традиционными методами селекции и семеноводства помимо длительного времени (каждый цикл занимает 20-25 лет) осложняется утратой ряда сортовых качеств в связи с рекомбинацией, имеющей место при половом размножении. В тоже время, принимая во внимание значительную трудоемкость работ по искусственному опылению, становится понятным, что число гибридных семян в каждом варианте скрещивания крайне ограничено. Соответственно, для эффективного размножения ценных генотипов (как естественных, так и полученных в результате контролируемых скрещиваний), необходимо применять качественно новые подходы. Одним из таких подходов, получивших мировое признание, является биотехнология микроклонирования методом соматического эмбриогенеза, которая признается наиболее актуальным решением проблемы получения посадочного материала с заданными свойствами в современном лесном семеноводстве (Egertsdotter, 2019; Rodríguez, 2022).

ГЛАВА 5. ИСКУССТВЕННАЯ РЕПРОДУКЦИЯ *P. sibirica* МЕТОДОМ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА

5.1 Влияние стадии развития зиготических зародышей на инициацию соматического эмбриогенеза у *P. sibirica in vitro*.

Успешность инициации соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* в значительной степени определяется качеством экспланта. Для большинства хвойных, особенно представителей рода *Pinus*, эмбриогенным потенциалом обладают только незрелые зиготические зародыши, причем их эмбриогенная компетентность ограничена очень небольшим промежутком времени. Очевидно, что точная идентификация стадий развития зиготических зародышей, применяемых в качестве эксплантов для введения в культуру *in vitro*, позволит обеспечить максимальную эффективность процесса инициации соматического эмбриогенеза. При этом подходы к периодизации и методы изучения стадий развития зиготических зародышей, использованных в качестве эксплантов, значительно различаются у разных авторов (Pullman, et al., 1999; Klimaszewska, et al., 2001; Kim et al., 2014).

Важно заметить, что наиболее часто применяемая периодизация (Pullman, Webb, 1994;) разработана в начале исследований соматического эмбриогенеза и сфокусирована на развитии основного зародыша, а кливажное расщепление, ранняя полиэмбриония, появление лидирующего и состояние субдоминантных зародышей остались вне рамок наблюдений. При этом в последующем было высказано предположение, что у *Pinaseae* процессы, происходящие в полиэмбриональной массе в коррозионной полости на начальных этапах развития семени, имеют большое значение для индукции соматического эмбриогенеза (Bonga et al., 2008). Соответственно, при разработке периодизации, отвечающей необходимости учета развития не только основного, но и субдоминантных зародышей, при анализе состояния экспланта мы также уделяли внимание изменениям, происходящим в полиэмбриональной массе в целом.

Поскольку у *P. sibirica* пыление и оплодотворение в основном совпадают по времени, то в качестве фенологического критерия для определения точки отсчета периода наблюдений мы принимали дату начала вылета пыльцы. В зависимости от погодных условий вылет пыльцы у *P. sibirica* обычно происходит в конце первой – начале второй декады июня и начинается при достижении значений суммы эффективных в диапазоне 247-351 С°. В год исследования первые признаки вылета пыльцы были отмечены 9 июня.

Развитие эмбриологических структур и морфогенеза зиготических зародышей у *P. sibirica* в период 0 - 30 сутки после опыления проиллюстрированы рисунком 26. В течение 2-10 суток после начала вылета пыльцы мегагаметофиты семязпочек второго года развития находятся на стадии проэмбриогенеза (рисунок 26 а, б). На 7-9 сутки после начала вылета пыльцы в коррозионной полости было можно обнаружить несколько (от 4 до 12) зародышей (рисунок 26 г, д), образовавшихся в результате кливажного расщепления. Кливажная полиэмбриония, наблюдаемая у *P. sibirica*, является характерной чертой раннего эмбриогенеза сосновых (Dogra, 1979). Принято считать, что все зародыши, появившиеся в результате кливажного расщепления генетически идентичны, что особенно важно для использования данного феномена в целях биотехнологии. Первоначально зародыши не различаются размерами, но уже через несколько дней, (примерно на 10-14 сутки после оплодотворения) происходит дифференциация – в эмбриональной массе можно выделить более крупный (лидирующий) и субдоминантные зародыши (рисунок 26 е). Чаще всего лидирующим является зародыш глубже прочих продвинутый в коррозионную полость. Сначала дифференциация проявляется на уровне линейных размеров, но вскоре после установления лидирующего зародыша субординантные останавливаются в развитии. Соответственно, только у лидирующего зародыша происходит закладка инициалей семядолей, что проявляется в изменении формы вершины – она уплощается, в то время как у субдоминантных зародышей вершина продолжает оставаться куполообразной формы (рисунок 26 ж, з).

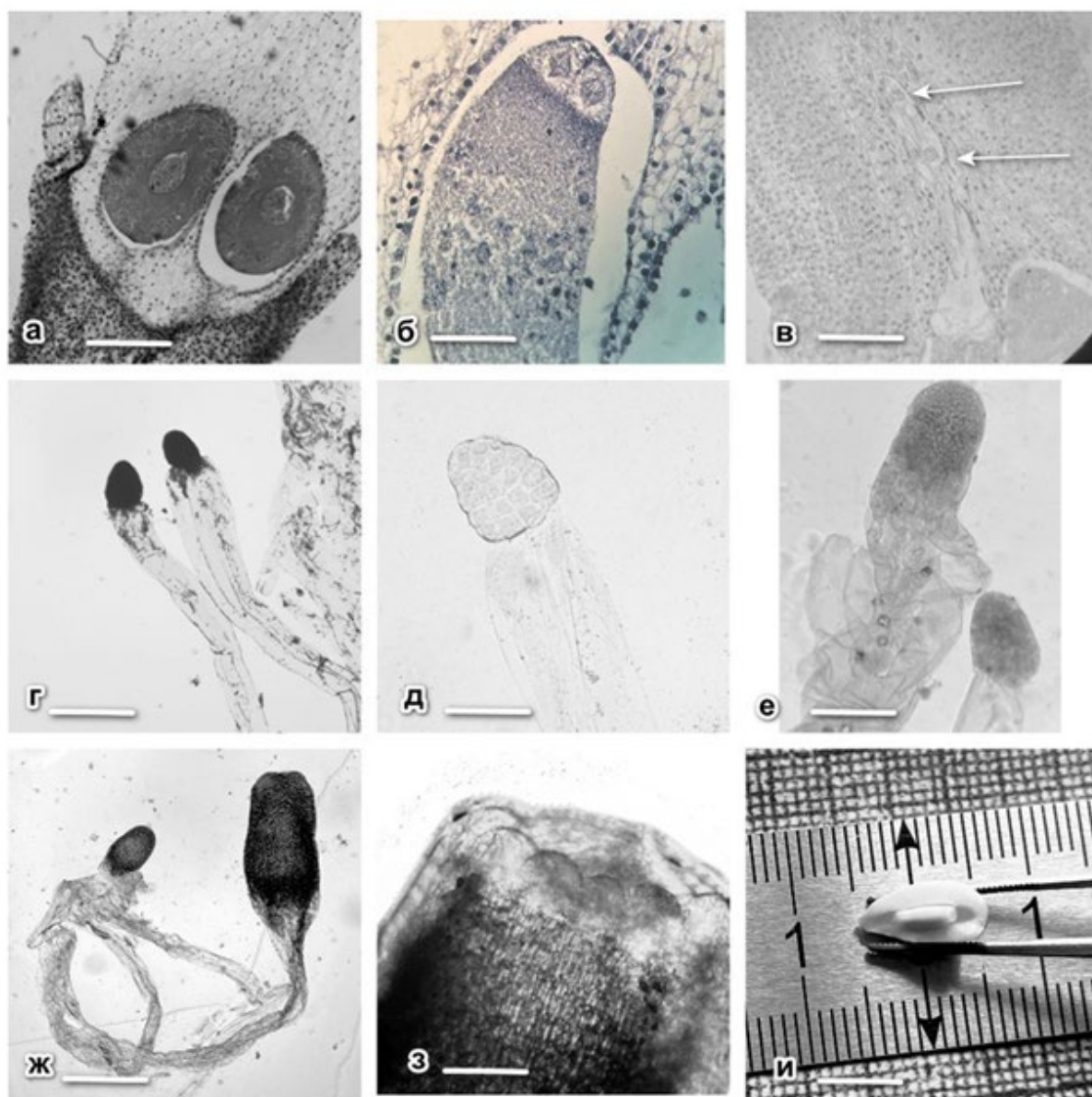


Рисунок 26. - Развитие зиготических зародышей *P. sibirica* при введении в культуру *in vitro*: а- 09.06.2024 зрелые яйцеклетки готовые к оплодотворению (0 стадия). Микропиллярный край расположен внизу снимка; б- 15.06.2024 деление ядер проэмбрио, смещенных в халазальный конец архегония (1 стадия); в- 18.06.2024 выход инициалей проэмбрио из архегония (2 стадия). Стрелками показаны кливажные зародыши; г- 21.06.2024 глобулярные кливажные зародыши, не различающиеся размерами (3 стадия). Суспензор представлен длинными слабоокрашенными клетками, мелкие клетки глобулы хорошо удерживают краситель; д- 21.06.2024 увеличенное изображение глобулярного зародыша (3 стадия); е- 24.06.2024 начало дифференцировки;

лидирующий и субдоминантный зародыши различаются только размерами (4 стадия); ж- 30.06.2024 выраженная качественная дифференцировка лидирующего зародыша (5 стадия). Лидирующий зародыш приобретает внутреннюю структуру и специализированные клетки; з- 30.06.2024 увеличенное изображение доминантного зародыша. Стрелками показаны инициали семядолей; и- 10.07.2024 зародыш в фазе позднего эмбриогенеза (стадия 6). Субординантные зародыши не просматриваются. Масштабная линейка: а- 350 мкм, б- 420мкм, в- 400мкм, г- 150 мкм, д- 250мкм, е- 220мкм, ж,з- 1мм, и- 5мм.

Все последующие процессы гисто- и морфогенеза и созревания характерны только для лидирующего зародыша, субординантные зародыши в течении 2-3 недель сохраняются в коррозионной полости, но в основном полностью элиминируются к началу созревания семени (рисунок 25 и).

Опираясь на полученные данные, в раннем развитии зиготического зародыша *P. sibirica* (в период с 9 по 30 июня), мы выделили шесть стадии, которые представлены в таблице 16. Более поздние этапы развития зиготического зародыша *P. sibirica* приведены в Приложении 3.

Таблица 16. Стадии развития зиготических зародышей – эксплантов при введении в культуру *in vitro*.

№	Описание	Продолжительность, сут.
1	2	3
0	Зрелые яйцеклетки готовые к оплодотворению (рисунки 1а, 26а).	3-7
1	Сингамия и проэмбриогенез (рисунки 1б, 26б).	1-3
2	Кливаж. Расщепление первоначального проэмбрио на четыре субъединицы, растяжение клеток первичного суспензора и выход проэмбрио за пределы архегония в ткань мегагаметофита (рисунки 1д, 3а, 26в)	1-3

Продолжение Таблицы 16

1	2	3
3	Посткливажная полиэмбриония. Все находящиеся в коррозионной полости мегагаметофта зародыши становятся многоклеточными, принимают форму глобул. При этом на данной стадии между зародышами отсутствует разница в размерах, а клетки глобулы не специализированы - отсутствует дифференцировка (рисунки 3б, 26г, д).	3-4
4	Начало дифференцировки. Все зародыши имеют куполообразную форму, но один из зародышей (в большинстве случаев наиболее продвинутый в коррозионную полость), становится явно крупнее прочих (рисунки 3в, 26 е).	3-5
5	Выраженная дифференцировка. Помимо более крупного размера лидирующий зародыш приобретает уплощенную вершину, в связи с формированием семядольного кольца. Субдоминантные зародыши заметно отстают в размерах, не проявляют признаков дифференцировки - остаются глобулярной формы (рисунок 26ж,з)	3-5
6	Формирование семядолей лидирующего зародыша. У лидирующего зародыша появляется внутренняя структура. Субдоминантные зародыши останавливаются в росте (рисунки 3г, 26и).	5-10

В рассмотренной выборке мегагаметофитов выявлено варьирование сроков наступления и продолжительности отдельных стадий эмбриогенеза (рисунок 27).

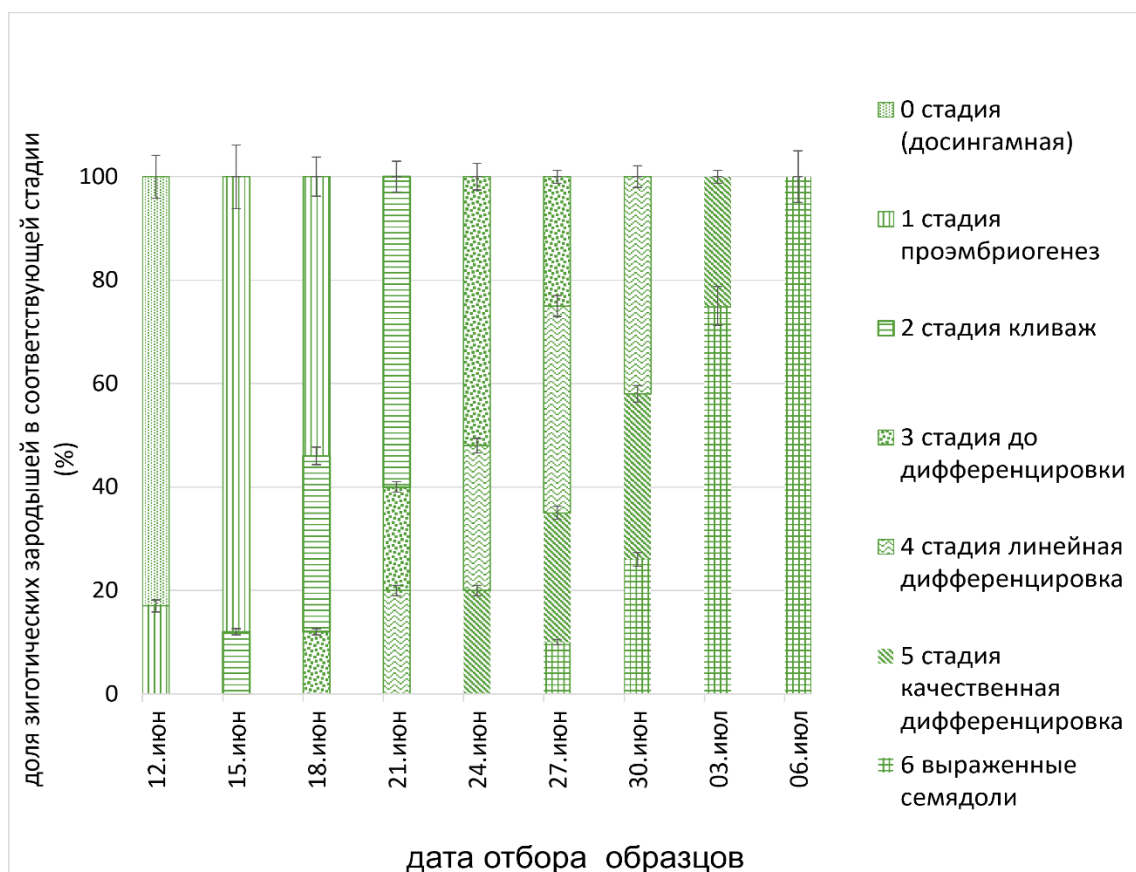


Рисунок 27. - Распределение стадий развития зиготических зародышей *P. sibirica* при инициации соматического эмбриогенеза в 2024.

Варьирование стадий развития зиготических зародышей в семенах различных видов сосен отмечается разными авторами (Singh, 1978; Klimaszewska et al., 2001; Williams, 2008; Hargreaves et al., 2009; Kim, Moon, 2014) и, по-видимому, характерно для рода *Pinus*.

Наши наблюдения показали, что сроки наступления отдельных стадий у *P. sibirica* могут варьировать по годам, в разных частях ареала между популяциями, между особями в популяции, а также в пределах особи. Установленное межгодовое варьирование и варьирование между популяциями, обусловлено погодными условиями, поскольку эмбриогенез тесно связан с суммой эффективных температур (Третьякова, 1990; Ershova et al., 2025). Так по нашим наблюдениям, в 2023 году мегагаметофиты были на более продвинутой стадии развития, чем мегагаметофиты, собранные в 2024 г в те же даты. При этом средняя температура в первой декаде 2023 года была на 10° С

выше, чем в 2024. Межгодовое варьирование дат прохождения стадий развития у мегagamетофитов разных видов *Pinus* отмечается многими исследователями и имеет существенное влияние на эффективность инициации соматического эмбриогенеза (Park et al., 2006; Kim, Moon, 2014). Кроме того, выявленный разброс наступления стадий эмбриогенеза среди деревьев в пределах одной популяции, может объясняться индивидуальной фенологической изменчивостью (Singh, 1978; Васильева и др., 2012), а также и локальными условиями произрастания отдельных особей (Ругузова, Похильченко, 2014).

На ранних этапах эмбриогенеза расхождение стадий развития зародышей наблюдается даже в пределах одного мегастробила, что может быть обусловлено разной скоростью роста и развития мужского гаметофита в тканях женского гаметофита (Breugina et al., 2021; Heine et al., 2022). Также задержку оплодотворения на 2-7 суток по сравнению с контролем отмечали в опытах по межвидовой гибридизации сосен (Krugman, 1970), что в том числе, может подтверждать замедление скорости роста мужского гаметофита в ксеногамных тканях женского гаметофита.

В нашем исследовании максимальный разброс стадий в одну дату сбора отмечали 27 июня, когда в выборке семян одновременно обнаруживали мегagamетофиты с глобулярными зародышами, не имеющими выраженных различий (стадия 3), семена с зародышами, приступившими к дифференцировке (стадии 4 и 5), а также семена заключающие зародыши с выраженными семядолями (стадия 6). Схожие данные имеются и по другим представителям сосновых - например, у *P. radiata* в одну дату отбора проб в пределах выборки размах зрелости зародышей может достигать трех стадий (Hargreaves et al., 2009).

В дальнейшем, при переходе от периода раннего эмбриогенеза к позднему, процессы развития синхронизируются как внутри мегастробилов, так и на более крупных уровнях особи и популяции в целом. Для синхронизации процессов развития зиготических зародышей имеет значение разная временная протяженность отдельных стадий (таблица 16). Так, начальные этапы

эмбриогенеза у *P. sibirica* проходят очень интенсивно и насыщены эмбриологическими событиями, а в дальнейшем продолжительность периодов увеличивается.

Выявленные особенности раннего эмбриогенеза у *P. sibirica* имеют существенное значение для применения соматического эмбриогенеза в качестве технологии искусственной репродукции вида, поскольку продолжительность сенситивной к индукции соматического эмбриогенеза фазы у *P. sibirica* очень небольшая. Это предполагает необходимость проводить предварительные исследования особенностей эмбриогенеза у деревьев-доноров для сбора эксплантов в оптимальные для инициации соматического эмбриогенеза сроки. Кроме того, индивидуальные фенологические различия, по крайней мере частично, могут объяснять изменчивость между особями по способности к индукции соматического эмбриогенеза, обнаруженную многими авторами (Garin et al., 1998; MakKay et al., 2006; Hargreaves et al., 2009) и др.

В 2024 году удалось инициировать соматический эмбриогенез у эксплантов, отобранных в период с 18 по 27 июня. При введении в культуру *in vitro* мегагаметофитов собранных ранее (12 - 15 июня) пролиферирующие клеточные культуры не были получены, экспланты подвергались некрозу в течение 7-12 суток. Введение в культуру эксплантов, собранных после 27 июня приводило к формированию интенсивно растущих клеточных линий (увеличение биомассы на 350-400% за один пассаж), не обладающих эмбриогенным потенциалом. Только у одного дерева-донора эксплантов были получены эмбриогенные клеточные линии из эксплантов, собранных 27 июня. У эксплантов, отобранных 30 июня и позднее инициировать соматический эмбриогенез не удалось. Максимальной компетентностью к инициации характеризуются экспланты, собранные 21 июня – в эту дату клеточные культуры, обладающие эмбриогенным потенциалом получены от всех рассмотренных деревьев – доноров. В тоже время, максимальное значение уровня инициации 15,5 % было получено от эксплантов дерева № 5, собранных 24 июня. Продолжительность периода компетентности (сенситивности) к

инициации соматического эмбриогенеза из мегагаметофитов, заключающих незрелые зародыши по выборке из 5 генотипов составила 8-10 дней (с 18 по 27 июня), при этом для отдельных деревьев-доноров, этот временной промежуток сокращается до 3-6 дней. Таким образом, продолжительность периода компетентности к инициации соматического эмбриогенеза у *P. sibirica* в общем соответствует данным, полученным для других видов сосен (Li et al., 1998; Klimaszewska et al., 2001, Kim et al., 2007; Chen et al., 2021) и др.

Рисунок 28 иллюстрирует значения частоты инициации соматического эмбриогенеза из эксплантов, отобранных в разные даты. Приведены данные по отдельным деревьям-донорам эксплантов. У дерева-донора с максимальной достигнутой частотой инициации (дерево №5 согласно табл. 6) пиковые значения частоты инициации сдвинуты на более позднюю дату, по сравнению с основной выборкой (дерево №2 в таблице 6).

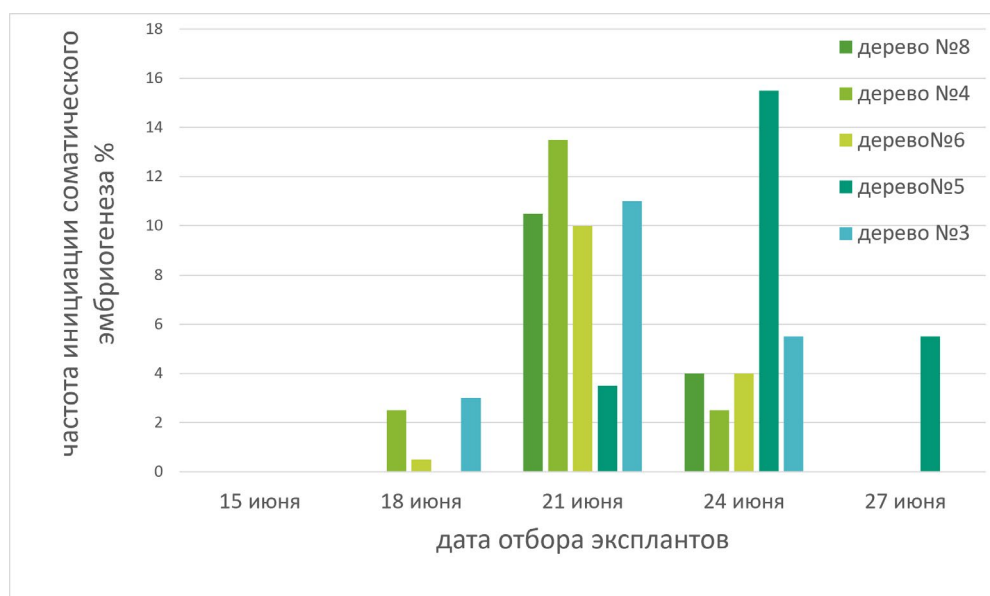


Рисунок 28. - Частота инициации соматического эмбриогенеза из эксплантов, отобранных в разные даты.

Сопоставление данных о развитии зиготического зародыша в эксплантах и частоты инициации соматического эмбриогенеза (рисунки 27 и 28), показывают, что максимальные значения частоты инициации были получены в период, когда у большинства эксплантов не выявлялась дифференцировка

зародышей на лидирующий и субдоминантные, либо дифференцировка выражалась только в частичном увеличении линейных размеров. Значительное снижение частоты инициации (с 9,7 до 6,3%), имеющее место в следующую дату сбора происходит на фоне вдвое увеличивающейся доли эксплантов с проявленными качественными различиями между зародышами, когда начинаются процессы морфогенеза и дифференцировка тканей у лидирующего зародыша. Снижение частоты инициации, имеющее место в последующие даты происходит на фоне появления в выборке эксплантов с ярко выраженной качественной дифференцировкой лидирующего и субдоминантных зародышей. Максимальные достигнутые значения частоты инициации соматического эмбриогенеза для выборки *P. sibirica* (9,8 %) в ряде случаев согласуются с данными, полученными на других видах сосен (Percy et al., 2000; Lelu-walter et al., 2006; Pullman et al., 2002; Montablan et al., 2012; Kousar et al., 2025 и пр.). При этом важно отметить, что большинство авторов указывают на возможность значительного повышения эффективности инициации соматического эмбриогенеза и увеличение выхода эмбриогенных клеточных линий путем оптимизации протоколов.

Статистический анализ верифицирует решающее значение даты отбора эксплантов (и связанной с ней стадией развития зиготических зародышей) *P. sibirica* на успешность инициации соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* (таблица 17).

Таблица 17. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
дата отбора	403,075	5	80,615	8,6388641	0,000172007	2,710889837
дерево-донор	11,4666667	4	2,8666667	0,3071977	0,869727813	2,866081402
Погрешность	186,633333	20	9,331667			
Итого	601,175	29				

Таким образом, в данном исследовании сила действия фактора «дата отбора» составляет 83%, и именно он обеспечивает результативный признак «успешность инициации». На 15% варьирование успешности инициации

объясняется действием неучтенных факторов и только на 2% успешность инициации определяется особенностями дерева-донора эксплантов. Полученные результаты имеют определенные расхождения с доступными литературными данными (Lelu-Walter et al., 2008; Liang et al., 2025), что может быть связано с особенностями выборки в настоящем исследовании.

5.2 Особенности формирования репродуктивных структур при инициации соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* у *P. sibirica*.

Первые изменения в состоянии эксплантов регистрировали на 14-20 сутки после введение в условия *in vitro*, максимальное число откликов отмечали через 20- 28 суток, после 8 недель новых откликов не наблюдали.

Обращает внимание поливариантность отклика эксплантов на введение в условия культуры *in vitro*. Примерно 70-85% мегагаметофитов заметно (в 2-3 раза) увеличивались в размерах в течение первых недель культивирования, иногда формировали поверхностные обрастания типичными паренхимными (каллусными) клетками, но в дальнейшем темнели и некротизировали. Отдельные экспланты продолжали оставаться естественного молочно-белого цвета без признаков некроза и деградации. Последующее вскрытие таких мегагаметофитов показало, что в них продолжались процессы роста и развития зародыша (зиготические зародыши после 10 недель культивирования оказывались на более продвинутой стадии развития, чем во время введения в условия *in vitro*). До 25 % мегагаметофитов образовывали различного типа экстрезии (рисунок 29).

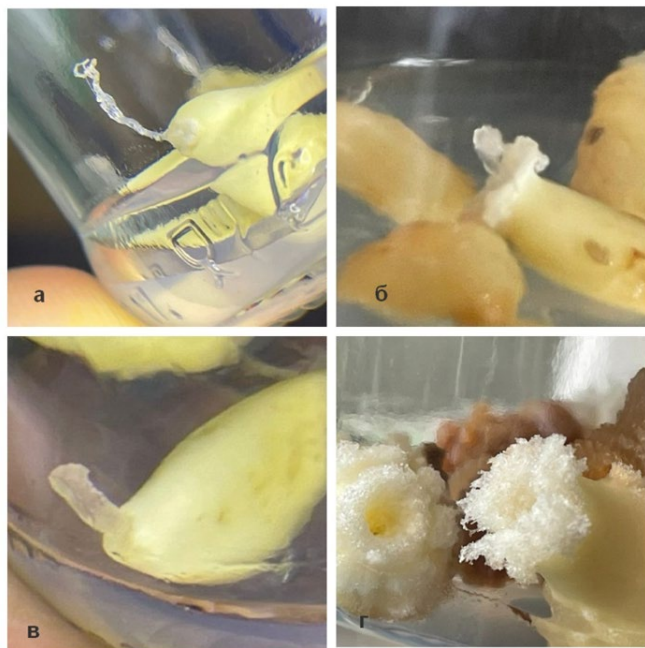


Рисунок 29. - Экструзии клеточных масс из микропилле мегагаметофита на 21-28 сутки после введения в культуру *in vitro*: а, в- экструзии не приводящие к формированию эмбриогенных клеточных линий, б,г – экструзии приводящие к формированию эмбриогенных клеточных линий.

При использовании в качестве эксплантов мегагаметофитов на более поздних стадиях (после появления семядолей у лидирующего зародыша), возможно прорастание зародыша на культуральной среде. При этом после контакта проростков с культуральной средой, дальнейший рост происходил путем каллусообразования и формирования клеточных культур, не обладающих эмбриогенными свойствами.

В течение 14 - 20 дней после регистрации отклика осуществляли цитологический контроль полученных клеточных масс.

Микроскопический анализ временных препаратов позволил выделить два варианта клеточных культур, имеющих ярко выраженные цитологические и морфологические различия, которые иллюстрирует рисунок 30.

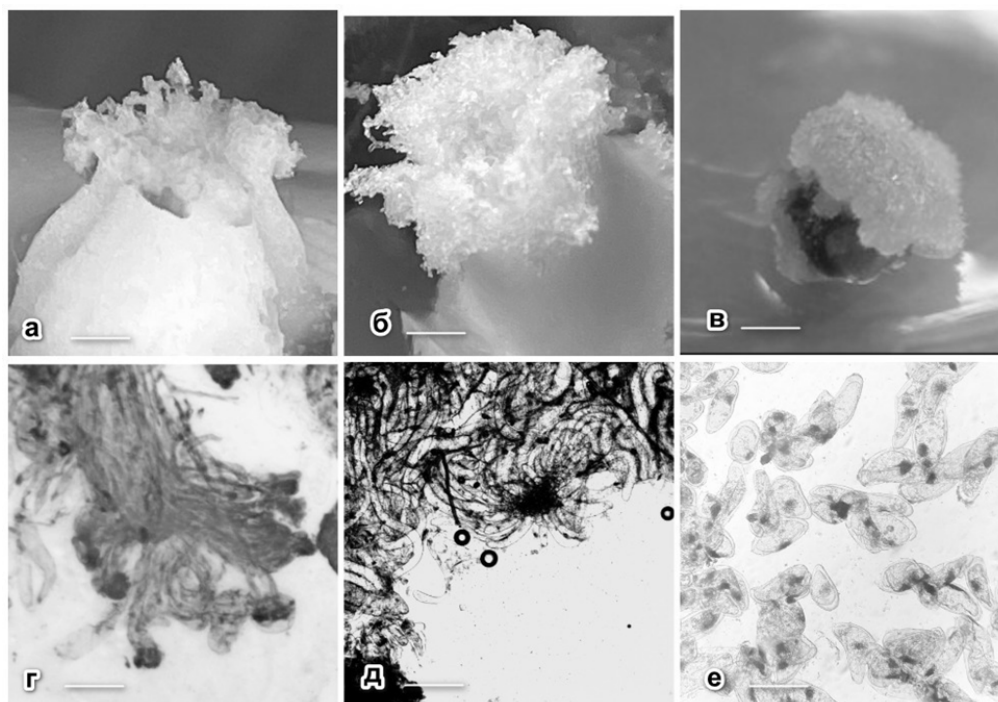


Рисунок 30. - Инициация соматического эмбриогенеза *P. sibirica* и морфология полученных клеточных культур: эмбрионально-суспензорная масса (а,б,г,д) и неэмбриогенный каллус (в,е).

Один вариант клеточных линий характеризовался присутствием двух типов клеток: мелких, округлых, ярко окрашенных обладающих крупным ядром, занимающим большую часть объема клетки и примыкающих к ним прозрачных (не удерживающих краситель) удлинённых клеток - трубок (рисунок 30 г, д). В англоязычной научной литературе для такого типа клеточных культур применяют термин проэмбриональная масса (РЕМ), в отечественных источниках широкое распространение имеет термин эмбрионально-суспензорная масса (ЭСМ). Общеизвестно, что наличие подобных структур позволяет считать представленные ими клеточные культуры обладающими эмбриогенной компетентностью, т. е. способностью продуцировать соматические эмбриониды, которая может быть реализована при дальнейших манипуляциях (Cairney, Pulman, 2007; Klimaszewska et al., 2009; Peng et al., 2020; Peng et al., 2022).

Другой вариант клеточных культур представлен однородными изодиаметричными клетками, не обладающими свойством полярности

(преимущественным ростом в одном направлении) и является каллусом (рисунок 30 в, е). Считается, что каллусные клеточные линии неспособны непосредственно продуцировать соматические зародыши, при этом ряд исследователей отмечают возможность индукции непрямого соматического эмбриогенеза, являющегося проявлением тотипотентности растительных клеток (Bozhkov et al., 1997; Zhao et al., 2024).

Эмбриогенные и неэмбриогенные клеточные культуры значительно различаются не только цитологическими характеристиками, но и внешнему виду (рисунок 30 а-в). Неэмбриогенный каллус имеет гладкую блестящую поверхность, он плотный, непрозрачный, белого или зеленоватого цвета по большей части имеет происхождение из поверхностных слоев экспланта. Эмбриогенные клеточные массы полупрозрачные - белые или светло-желтые, очень пористые, неплотные, легко фрагментируются, имеют зернистую поверхность, которая сформирована многочисленными микровыростами

Из полученных клеточных линий, обладающих эмбриогенным потенциалом, были отобраны по 1-2 линии от каждого дерева, которые были перенесены на пролиферационную среду (рисунок 31).



Рисунок 31. - Эмбриогенные клеточные линии на пролиферационной среде: линия PS 5 /24 (а), линия PS 8/24 (б,в)

Субкультивирование производится на 14-21сутки и сопровождается микроскопированием для подтверждения сохранности эмбриогенного потенциала клеточных линий.

На 14-15 сутки культивирования в эмбрионных клеточных культурах происходит обособление отдельных зародышей (рисунок 32), в которых выделяется эмбриональная глобула, насчитывающая 12-16 мелких округлых клеток и суспензор. Строение зародышей соответствует периоду раннего эмбриогенеза: первой стадии согласно периодизации Пульмана (Pullman et al., 1999), рисунок 6 или третьей стадии в соответствии с нашей периодизацией рисунок 25 г.



Рисунок 32. - Соматические зародыши в эмбрионных клеточных линиях: одиночные (а,б), собранные в «розетку» (в). Стрелками показаны эмбриональные глобулы.

Механизм формирования эмбрионных клеточных линий имеет существенное значение для понимания оптимизации условий получения и размножения культур. В ранних экспериментах мы отмечали, что ряд событий, происходящих при инициации соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro*: приобретение полярности, неравномерное клеточное деление и дифференциация образовавшихся клеток, имеет значительное сходство с событиями, имеющими место в фазе проэмбриогенеза зиготического эмбриогенеза представителей сем. *Pinus* (Singh, 1978;). В некоторых случаях на 5-7 сутки культивирования среди поляризованных клеток первичного каллуса отмечали появление таких, в которых деление ядра не сопровождалось цитокинезом, приводя к образованию ценоцитов, заключающих несколько ядер. Проявлением полярности является неравномерность распределения структур вдоль оси – смещение ядер к одному из полюсов клетки. При

дальнейшем культивировании на дистальном конце вытянутых клеток возможно обособление мелких клеток первичных эмбриональных инициалей, при этом прилегающие к ним в базальной части клетки вытягиваются, формируя эмбриональные трубки (Третьякова и др., 2013). Тем не менее, частота наступления подобных событий (не более 0,1%) не позволяет рассматривать данный способ приемлемым для получения стабильно пролиферирующих и стабильно поддерживающих эмбриогенный потенциал клеточных культур.

В настоящем эксперименте инициация соматического эмбриогенеза происходила путем получения экструзий эмбрионально-суспензорных масс. Механизмом образования экструзий, как и пролиферации эмбриогенных клеточных линий является многократное повторение кливажных процессов, что соответствует современным представлениям о способах получения и поддержания эмбриогенно компетентных клеточных культур (Fehér et al., 2016). Доказательством поддержания эмбриогенной компетентности пролиферирующих клеточных линий путем повторения кливажных процессов является присутствие в культуре множества эмбриональных «розеток», структур возникающих при делении первичных глобул (рисунок 32 в).

Подтверждением формирования экструзий эмбрионально-суспензорных масс путем кливажа является короткий временной интервал компетентности эксплантов *P. sibirica*, который совпадает по времени с периодом в развитии между кливажным расщеплением и проявлением доминантного зародыша. В нашем исследовании критическим событием для инициации соматического эмбриогенеза является дифференцировка лидирующего зародыша, после чего формирования эмбриогенных клеточных линий не наблюдали. Продолжительность периода компетентности отдельных деревьев *P. sibirica* к инициации соматического эмбриогенеза составляет не более 3-7 дней, а для пиковых значений характерны еще более короткие временные промежутки. После обособления лидирующего зародыша большинство субдоминантных эмбрио прекращают свое развитие и подвергаются деструкции в течение

нескольких недель. Механизмы супрессии субдоминантных зародышей продолжают оставаться предметом исследований (Filonova et al., 2001; Vuosku, et al., 2009), не исключено, что понимание природы этих явлений обеспечит расширение границ периода сенситивности.

Таким образом, время сенситивности, «окно возможности», в течение которого возможна индукция соматического эмбриогенеза в значительной степени определяется продолжительностью посткливажной стадии (от кливажа до начала появления доминантного зародыша), в таком случае различия между видами по способности к индукции могут быть связаны неодинаковой скоростью развития и прохождения соответствующей фазы. Например, у кипариса продолжительность периода от кливажа до формирования доминантного зародыша составляет 5 месяцев (Sallandrouze et al., 2002).

Анализ литературных источников показывает, что в большинстве исследований при инициации соматического эмбриогенеза период между отбором эксплантов составляет одну неделю. Однако у *P. sibirica* ранние этапы эмбриогенеза характеризуются большой интенсивностью процессов, в течении 7 суток происходят значительные изменения, и при периодичности отбора образцов в 5-7 дней, многие важные эмбриологические события остаются вне поля зрения исследователей. Трехдневная периодичность сбора проб повышает вероятность отбора эксплантов в необходимом физиологическом состоянии, обеспечивающем максимальную эффективность процесса индукции соматического эмбриогенеза. Возможно, что отмеченное разными авторами варьирование эффективности инициации соматического эмбриогенеза по годам (Klimaszewska et al., 2001) в значительной мере связаны с разной скоростью прохождения процессов развития зиготических зародышей обусловленной текущими погодными условиями. В таком случае, точная привязка наблюдений к процессу оплодотворения позволяет определить сроки отбора эксплантов для введения в культуру *in vitro* обеспечивающие максимально эффективную инициацию соматического эмбриогенеза.

Таким образом, в ходе проведенного исследования установлено, что инициация соматического эмбриогенеза и получение стабильно пролиферирующих эмбриогенных клеточных линий для искусственной репродукции *P. sibirica*, принципиально возможно, при этом необходимо изучение индивидуальных особенностей эмбриогенеза деревьев - доноров с целью отбора эксплантов в период максимальной компетентности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение репродукции древесных видов, в том числе *P. sibirica* продолжает оставаться фундаментальной задачей лесоводства, решение которой напрямую определяет возможности сохранения устойчивых лесных экосистем, повышения эффективности лесовосстановления и обеспечения непрерывности лесопользования.

Проведенные исследования позволили выявить у *P. sibirica* ряд специфических особенностей развития репродуктивных структур, имеющих большой потенциал как для решения теоретических вопросов (эволюция голосеменных, механизмы несовместимости и пр.), так и для совершенствования генетико-селекционной работы и получения новых форм с хозяйственно-полезными признаками.

Установлено, что у особей с однолетним развитием мегагастробилов причина незавершенности полового процесса заключается в ускоренном развитии женских репродуктивных структур, которая обусловлена отсутствием периода глубокого покоя семян, в результате чего значительно сокращается продолжительность свободнойядерной стадии женского гаметофита. Кроме того, обнаружены факты деления неоплодотворенных яйцеклеток по типу партеногенеза.

Совокупность полученных данных свидетельствует в пользу гипотезы об эволюционной продвинутойности вида *P. sibirica* в системе рода *Pinus*, и тем самым имеет значение для разработки проблемы эволюции и филогении, формо- и видообразования сем *Pinaceae* в целом.

Следует подчеркнуть, что для окончательной оценки эволюционного статуса особей с однолетним развитием мегагастробилов необходимо решение ряда таких проблем, как: частота встречаемости данного явления в природе, факторы, оказывающие влияние на проявление признака ускоренного развития, и сила их действия, роль и необходимость опыления для стимуляции процессов деления неоплодотворенных яйцеклеток и ряд других. Значительный прогресс в понимании явления может быть связан с исследованиями клонового (прививки) и

гибридного (полученного в результате контролируемого искусственного опыления) потомства аномальных особей.

Селекционное значение исследованных особей определяется возможностью передачи признака ускоренного развития и массового размножения методом соматического эмбриогенеза.

Изучение цитоэмбриологических особенностей протекания полового процесса при контролируемом межвидовом опылении позволило установить ряд общих и специфических проявлений во взаимодействии мужского и женского гаметофитов. Показано, что, как и в случае особей с акселерацией репродуктивного цикла, развитие женских генеративных органов в значительной степени предопределено и происходит относительно независимо от развития мужского гаметофита. При межвидовом опылении несовместимость у *P. sibirica* может проявляться в остановке развития микрогаметофита, в то время как развитие мегагаметофита продолжается вплоть до формирования архегониев и яйцеклеток. Автономное созревание яйцеклеток у *P. sibirica* является предпосылкой, обеспечивающей возможность вступления семязачек на путь апомиктического развития.

Продолжение исследований в этой области, в частности определение механизмов взаимодействия мужского и женского гаметофитов послужит толчком к преодолению нескрещиваемости и получению гибридного потомства. Репродуктивный, адаптивный и соматический гетерозис гибридных растений может способствовать решению ряда проблем, стоящих перед генетиками и селекционерами и лесоводами (получению новых высокоурожайных, быстрорастущих, устойчивых к болезням и вредителям форм и переходу к сортовому лесовыращиванию).

В связи с задачей массового тиражирования уникальных генотипов лесных хвойных видов, особое значение имеют исследования, обеспечивающие разработку и совершенствование технологии микроклонального размножения, особенно метода соматического эмбриогенеза. Соматический эмбриогенез

является перспективным направлением биотехнологии хвойных, позволяющим значительно ускорить генетико-селекционную работу.

Полученные нами результаты говорят о том, что для повышения эффективности биотехнологических процессов в культуре клеток *in vitro* необходим комплексный подход с привлечением данных многих смежных дисциплин, таких как фенология, экология, биология развития, физиология растений молекулярная генетика и т.д.

Таким образом, помимо общетеоретического, проделанная работа имеет практическое значение, способствуя поиску эффективных путей воздействия на репродуктивные процессы, в частности эмбриогенез *in vitro*, что позволит совершенствовать имеющиеся и разрабатывать новые биотехнологические приемы для сохранения и селекционного улучшения генофонда *P. sibirica*, разработки научных основ и методов повышения продуктивности лесов и создания высокопродуктивных древостоев оптимальной структуры.

ВЫВОДЫ

1. Акселерация развития женских репродуктивных структур у особей *P. sibirica* с однолетним развитием мегастробилов обусловлена сокращением продолжительности свободоядерной стадии мегагаметофита.
2. Развитие мегагаметофита у *P. sibirica* в значительной степени детерминировано - мегаспорогенез проходит все стадии развития вплоть до зрелой яйцеклетки и образования коррозионной полости независимо от развития мужского гаметофита.
3. Гаметная несовместимость у особей *P. sibirica* при искусственном межвидовом опылении проявляется в асинхронности развития женского и мужского гаметофитов, что приводит к отсутствию оплодотворения и формированию беззародышевых семян.
4. В результате межвидового опыления *P. sibirica* × *P. cembra* происходит формирование жизнеспособного гибридного зародыша.
5. Максимальная частота инициации соматического эмбриогенеза у *P. sibirica* достигается при использовании мегагаметофитов с зиготическими зародышами на посткливажной стадии развития.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авров, Ф. Д. Самоопыление, перекрестное скрещивание и свободное опыление кедров сибирского в припоселковом кедровнике / Ф. Д. Авров // Проблемы кедров. - 1990. - вып.4. - С. 4-13.
2. Андропова, М. М. Биометрические особенности шишек кедров сибирского в связи с изменчивостью по форме апофиза в условиях интродукции / М. М. Андропова, М. С. Хамитов // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2016. - № 7 (141). – С.65-68.
3. Анисимова, Г. М. Влияние условий загрязнения окружающей среды на репродукцию растений / Г. М. Анисимова, И. В. Лянгузова, И. И. Шамров // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3. Системы репродукции. – СПб.: "Мир и семья", 2000. – С. 532-535.
4. Баранцева, Л. М. Цитофизиологический анализ развития архегония *Pinus sibirica* Du Tour.: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.12 / Лидия Михайловна Баранцева. М., 1982. - 21 с.
5. Барыкина, Р. П. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. / Р. П. Барыкина, Т. Д. Веселова, А. Г. Девятков, Х. Х. Джалилова, Г.М. Ильина, Н. В. Чубатова. – М.: МГУ, 2004. – 312 с.
6. Батыгина, Т. Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей / Т. Б. Батыгина // Физиология растений. – 1999. – Т.46, №6. – С.834-898.
7. Батыгина, Т. Б. Эмбриогенез–новый тип вегетативного размножения / Т. Б. Батыгина // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т.3: Системы репродукции (ред. Т. Б. Батыгина). – СПб.: Мир и семья, 2000. – С. 334-349.
8. Батыгина, Т. Б. Феномен полиэмбрионии. Генетическая гетерогенность семян / Т. Б. Батыгина, Г. Ю. Виноградова // Онтогенез. - 2007. - Т. 38, № 3. - С. 166–191.

9. Белоконь, М. М. Генетическая дифференциация сосен секции *Strobus*: данные изоферментного анализа / М. М. Белоконь // Доклады РАН. - 1998. –Т.358, № 5.- С. 699-702.
10. Белостоцкая, С. Х. Особенности развития мужского и женского гаметофитов сосны обыкновенной при внутри- и межвидовой гибридизации / С. Х. Белостоцкая // Лесоведение. - 1979. - №5. – С.62-71.
11. Бех, И. А. Сосна кедровая сибирская / И. А. Бех // Томск: Томский государственный университет. - 2004. – 160 с.
12. Бобринев, В. П. Актуальные проблемы использования, сохранности и воспроизводства кедровых лесов Забайкальского края / В. П. Бобринев, Л. Н. Пак // Известия Самарского НЦ РАН. – 2009. - №1, т. 11. - с.360-362.
13. Бобров, Е. Г. О межродовой гибридизации в семействе *Pinaceae* / Е. Г. Бобров // Ботанический журнал -1983.- т. 68. - С. 857-865.
14. Бобров, А. В. Филогения и история расселения хвойных (Coniferales) по данным строения женских репродуктивных органов: автореф. дис.... д-ра биол. наук: 03.00.05 .- С-Петербург, 2003. - 32 с.
15. Бородинцева, Л. И. Продуктивность и качество семян кедра сибирского на лесосеменных объектах в республике Алтай / Л. И. Бородинцева, В. В. Тараканов, Т. В. Гончарова // Сибирский лесной журнал. - 2023. - № 4.- С. 52–57.
16. Бутенко, Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений // М: Наука. -1994. - 224с.
17. Васильева, Г. В. Фенология цветения кедра сибирского *Pinus sibirica* Du Tour и кедрового стланика *Pinus pumila* и гибридов между ними / Г. В. Васильева, Е. А. Жук, А. Г. Попов // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2012. – С. 62 - 67.
18. Велисевич, С. Н. Возрастная динамика генеративной структуры кроны кедра сибирского (*Pinus sibirica* Du Tour). автореф. дисс. канд. биол. наук: 06.03.01 / Велисевич Светлана Николаевна – Красноярск, 1998. – 24с.

19. Велисевич, С. Н. Структура урожая кедров сибирского на южной границе ареала в западной Сибири / С. Н. Велисевич // Лесоведение. -2013.- № 2. - С. 45–52.
20. Велисевич С. Н. Качество пыльцы высокогорных популяций *Pinus sibirica* Du Tour (*Pinaceae*) в аридных и гумидных районах Алтая / С. Н. Велисевич // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. - 2017. - 10 (3). - С.35 – 42.
21. Велисевич, С. Н. Качество урожая кедров сибирского на северном пределе распространения / С. Н. Велисевич // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. –2017. - № 12 (158). - С.70-74.
22. Вишнякова, М. А. Структурные и функциональные основы несовместимости растений: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.05.- С-Петербург, 1994. - 41 с.
23. Воробьев, В. Н. Особенности плодоношения кедров сибирского в горных условиях / В. Н. Воробьев // Биология семенного размножения хвойных в Западной Сибири. – Новосибирск: Наука, 1974. – С. 15-70.
24. Гланц, С. Медико-биологическая статистика. / С. Гланц /М.: Практика, 1998. — 459 с.
25. Горошкевич, С. Н. Селекция кедров сибирского как орехоплодной породы: актуальность, состояние и перспективы / С. Н. Горошкевич // Лесное хозяйство - 2000. - № 4. - С. 25–27.
26. Горошкевич, С. Н. Структура и развитие элементарного побега кедров сибирского / С. Н. Горошкевич // Вестник Томского государственного университета. Биология. - 2014.- № 4. - С. 37–55.
27. Горошкевич, С. Н. О наличии естественных гибридов у пятихвойных сосен северной и восточной Азии / С. Н. Горошкевич, Г. В. Васильева, А. Г. Попов // Растения в муссонном климате. Материалы IV Международной конференции / ред. С.Б. Гончарова. - Владивосток, 2007. - С. 199-204.

28. Горошкевич. С. Н. Внутрипопуляционное разнообразие шишек и семян *Pinus sibirica* Du Tour: уровень и характер изменчивости признаков / С.Н. Горошкевич, О.В. Хуторной // Растительные ресурсы. -1996. - Т.32 (3). – С.1 -13.
29. Горошкевич, С. Н. Межвидовая гибридизация как фактор сетчатой эволюции 5-хвойных сосен северной и восточной Азии / С. Н. Горошкевич, Е. А Петрова, Г. В. Васильева и др. // Хвойные бореальной зоны. – 2010. – т. XXVII, № 1. – С. 50-57.
30. Дьячук, Т. И. Микроспоровый эмбриогенез *in vitro* – роль стрессов / Т. И. Дьячук, О. В. Хомякова, В. Н. Акинина, И. А. Кибалко, А. В. Поминов // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. - Т. 23.- №3. – С.86-94.
31. Ермаков, И. П. Содержание ДНК в яйцеклетке *Pinus sibirica* Du Tour на разных стадиях ее развития / И. П. Ермаков, Н. П. Матвеева, Л. М. Баранцева // Докл. АН СССР. - 1980. - Т. 251. - № 1. - С. 254–256.
32. Ершова, М. А Оптимизация условий стерилизации и культивирования эксплантов *Pinus silvestris* (Pinaceae) / М. А. Ершова, Р. В. Игнатенко, Е. В. Новичонок, О. В. Чирва, Н. А. Галибина // Растительные ресурсы. – 2022. - Т. 58 (4). - С. 431–446.
33. Жилина, Т. Н. Малый ледниковый период как одно из колебаний климата в голоцене и его последствия в Западной Сибири. / Т. Н. Жилина // Вестник ТГУ. - 2010.- № 340. - С. 206–211.
34. Жук, Е. А. Эколого-географическая дифференциация кедра сибирского: опыт исследования *ex situ*: автореф. дис....канд. биол. наук: 03.02.01. / Жук Евгения Анатольевна. - Томск, 2011. - 24с.
35. Жук, Е. А. Внутривидовая изменчивость репродуктивной фенологии *Pinus sibirica* *ex situ* / Е. А. Жук // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. - 2023. – Т. 22, № 1. - С.150-153.
36. Жук, Е. А. Семеношение у географических экотипов кедра сибирского *ex situ* / Е. А. Жук // Сибирский лесной журнал. - 2025. - № 4. - С. 40–47.

37. Земляной, А. И. Влияние метеорологических факторов на характер пыльцевого режима кедров сибирского/ А. И. Земляной // Плодоношение лесных пород в Сибири. – Новосибирск: Наука, 1982. – С. 90-97.
38. Земляной, А. И. О полиэмбрионии семян кедров сибирского в горных условиях / А. И. Земляной // Половая репродукция хвойных. - Новосибирск: Наука, 1973.- Т.1. - С.96-99.
39. Земляной, А. И. Межклоновая изменчивость кедров сибирского по элементам семенной продуктивности: перспективы отбора / А. И. Земляной, Ю. Н. Ильичев, В. В. Тараканов // Хвойные бореальной зоны. – 2010. – Т. XXVII. – № 1-2. – С. 77-82.
40. Земляной, А. И. Роль селекции в решении проблем кедров сибирского (*Pinus sibirica* Du Tour) // Сборник статей по материалам международного научного конгресса «Интерэкспо Гео-Сибирь». - Красноярск, 2013. – С. 121-123.
41. Иванов, В. Б. Активные красители в биологии / В. Б. Иванов, Москва: Наука, 1982. - 214 с.
42. Ирошников, А. И. Полиморфизм популяций кедров сибирского / А. И. Ирошников // Изменчивость древесных растений Сибири. - Красноярск: Наука, 1974.- С.77-103.
43. Кашин, А. С. Половое размножение, агамоспермия и видообразование у цветковых / А.С. Кашин // Журнал общей биологии. - 1998. - №2. – С.171-191.
44. Кашин, А. С. Гаметофитный апомиксис: анализ причин и последствий реализации у цветковых (На примере популяций некоторых видов *Asteraceae*): автореф. дис... д-ра биол. наук: 03.00.05/ Кашин, Александр Степанович. - Саратов, 2004. - 44 с.
45. Козубов, Г. М. Электронная микроскопия в цитоэмбриологии хвойных/ Козубов Г. М. // Половая репродукция хвойных. Материалы 1-го Всесоюзного симпозиума Новосибирск, 16-20 апреля 1973. - Новосибирск: Наука. 1973. - С.60-66.

46. Козубов, Г. М. Биология плодоношения хвойных на Севере / Козубов Г.М., Ленинград: Наука, 1974. - 133 с.
47. Козубов, Г. М. Репродуктивные структуры голосеменных (сравнительное описание) / Г. М. Козубов, В. В. Тренин, М. А Тихова, В. П. Кондратьева - Ленинград: Наука, 1982 - 104 с.
48. Козубов, Г. М. Современные голосеменные (морфолого-систематический обзор и кариология) / Козубов, Г. М., Муратова Е. Н. — Ленинград: Наука, 1986.— 193с.
49. Коропачинский, И. Ю. Естественная гибридизация древесных растений /И. Ю. Коропачинский, Л. И. Милютин, Новосибирск: ГЕО". - 2006.- 223 с.
50. Крутовский, К. В. Межвидовая генетическая дифференциация кедровых сосен Евразии по изоферментным локусам / К. В. Крутовский, Д. В. Политов, Ю. П. Алтухов // Генетика. - 1990.- Т. 26. - № 4.- С. 694–707.
51. Круглова, Н. Н. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений / Н. Н. Круглова, О. В. Егорова, О. А. Сельдимирова. - Уфа: Гилем, 2013. - 125 с.
52. Кузнецова, Н. Ф. Развитие мужского гаметофита сосны обыкновенной при самоопылении и свободном опылении / Н. Ф. Кузнецова // Лесоведение. - 1991. - № 3. - С. 27–33.
53. Кузнецова, Г. В. Семеношение и качество семян плюсовых клонов кедра сибирского разного происхождения на плантациях в Красноярской лесостепи / Г. В. Кузнецова // Лесоведение. - 2003. - № 6. - С. 42-48.
54. Кузнецова, Г. В. Вегетативное и семенное потомство редких форм сосны сибирской в Красноярской лесостепи / Кузнецова Г. В. // Сибирский лесной журнал. - 2024. - № 4. - С. 3-10.
55. Куприянова, Л. А. Группа *Cembrae* рода *Pinus*, ее объем и связи по палинологическим данным / Л. А. Куприянова, М. В. Литвинцева // Ботанический журнал – 1974. –Т. 59. – № 5. – С. 630-644.

56. Матвеева, Р. Н. Проявления изменчивости кедр сибирского на разных этапах онтогенеза / Р. Н. Матвеева, О. Ф. Буторова, Н. П. Братилова // Современные проблемы науки и образования. – 2006. – № 2 – С. 52-53.
57. Минина, Е. Г. Определение пола и природные регуляторы роста у некоторых хвойных лесных пород / Е. Г. Минина // Половая репродукция хвойных. - Новосибирск: Наука, 1973. - С.146-156.
58. Минина, Е. Г. Геотропизм и пол у хвойных / Е. Г. Минина, И. Н. Третьякова // М: Наука, 1983. - 200с.
59. Минина, Е. Г. Физиологические вопросы возможного апомиксиса у хвойных/ Е. Г. Минина, Н. А. Ларионова // Физиология растений. - 1979. - Т.26. - С. 130 – 135.
60. Митрофанова, И. В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения растений / И. В. Митрофанова // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. - Т.41. - №6. - С.496-509.
61. Мошкович, А. М. Эмбриология хвойных: (*Pinales, Cupressales, Taxales*) / А. М. Мошкович / - Кишинев: Штиинца, 1992. - 250 с.
62. Мудрик, Е. А. Генетическая изменчивость и доля перекрестного опыления *Pinus cembra* L. в украинских Карпатах и австрийских Альпах по аллозимным и микросателлитным локусам / Е. А. Мудрик, М. М. Белоконь, Ю. С. Белоконь // Лесной вестник. - 2012. - №1. - С. -112-117.
63. Муратова, Е. Н. Кариология и филогения р. *Pinus* / Е. Н. Муратова // Успехи современной биологии. – 1983. – Т.96. – С.163-179.
64. Наумова, Т. Н. Апо- и амфимиксис у цветковых растений / Т. Н. Наумова // Цитология и генетика. – 2008. - №3. - С.51-63.
65. Некрасова, Т. П. Биологические основы семеношения кедр сибирского / Т. П. Некрасова // – Новосибирск: Наука, 1972. – 272с.
66. Некрасова, Т. П. Пыльца и пыльцевой режим хвойных в Сибири / Т. П. Некрасова // – Новосибирск: Наука, 1983. – 169 с.
67. Николаева, А. Н. Жизнеспособность пыльцы кедр сибирского Западного Саяна / А. Н. Николаева // Лесоведение. – 1974. - №3. – С.59-63.

68. Новичонок, Н. В. Соматический эмбриогенез сосны обыкновенной: современное состояние вопроса, перспективы применения в лесном хозяйстве / Н. В. Новичонок, Н. А. Галибина, Б. В. Раевский, М. А. Ершова // Труды Карельского научного центра РАН. - 2019. - № 12. - С. 5–18.
69. Носкова, Н. Е. Влияние стресса на репродуктивные способности сосны обыкновенной / Н. Е. Носкова, И. Н. Третьякова // Хвойные бореальной зоны. – 2006. – №3. – С. 54 – 63.
70. Носов, А. М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений / А. М. Носов // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. - Москва: Бином, 2011. - С.386-402.
71. Першина, Л. А. Межвидовая несовместимость при отдаленной гибридизации растений и возможности ее преодоления / Л. А. Першина, Н. В. Трубачеева // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т.20. - №4. – С. 416-425.
72. Петров, Д. Ф. Апомиксис и некоторые возможности его для закрепления гетерозиса / Д. Ф. Петров // Апомиктическое размножение и гетерозис. - Новосибирск: Наука, 1974. - С. 3-11.
73. Петрова, Е. А. Полиморфизм и изменчивость кедра сибирского (*Pinus sibirica* Du Tour) в северо-восточном Алтае: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.05 / Елена Анатольевна Петрова. – Томск, 2002. - 178 с.
74. Пожидаева, М. М. Цитогенетика женскостерильных форм сосны обыкновенной / М. М. Пожидаева, Ю. Н. Исаков // Лесоведение. – 1982.- № 6. - С. 84–89.
75. Политов, Д. В. Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых (сем. *Pinaceae*) Северной Евразии: автореф. дисс.... д-ра биол. наук :03.00.15 / Политов Дитрий Владиславович. - Москва, 2007. - 47 с.

76. Политов, Д. В. Характеристика генофондов популяций кедровых сосен по совокупности изоферментных локусов / Д. В. Политов, К. В. Крутовский, Ю. П. Алтухов // Генетика. - 1992. – Т.28, №1. - С.93-114.
77. Попов, А. В. Погодные условия, способствующие заложению шишек у сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) / А. В. Попов, С. Н. Велисевич // Лесной вестник. - 2023. - Т. 27. - № 5. - С. 149–159.
78. Потенко, В. В. Полиморфизм изоферментов и филогенетические взаимоотношения хвойных видов Дальнего Востока России: автореферат дисс.... д-ра биол.наук :03.00.15 / Владимир Викторович Потенко. - Владивосток, 2004. - 38 с.
79. Путенихина, К. В. Количественные показатели шишек и семян кедров сибирского при интродукции / К. В. Путенихина, З. Х. Шигапов, М. А. Мкртчян, В. П. Путенихин // Хвойные бореальной зоны. - 2014. - XXXII, № 5 – 6.– С.59-64.
80. Райт, Д. В. Введение в лесную генетику / Д. В. Райт //- Москва: Лесная промышленность. - 1978. - 470 с.
81. Романовский, М. Г. Гаметофитная смертность семян сосны обыкновенной / М. Г. Романовский // Генетика. -1989.- Т.25. - №1.- С.99-108.
82. Романовский, М. Г. Наследование уровня черешечности у сосны обыкновенной / М. Г. Романовский, С. М. Рябоконь, В. В. Митроченко // Генетика. - 1991. – Т. 27. - №9. - С.1668-1671.
83. Романовский, М. Г. Совместимость тканей в эмбриогенезе сосны / М. Г. Романовский, Л. В. Хромова // Лесоведение. - 2013. - №2. - С.53-63.
84. Ругузова, А. И. Эмбриологические аспекты формирования семян *Pinus sibirica* Du Tour в условиях Киева. / А. И. Ругузова, О. П. Похильченко // Plant Introduction. - 2014. - № 2. – С.10-17.
85. Савельев, С. С. Репродуктивный потенциал клоновой плантации сосны сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) на юге Красноярского края: автореф.

- дисс.... канд. биол. наук: 00.03.05/ Савельев Станислав Сергеевич. - Красноярск, 2011. - 21с.
86. Свинцова, В. С. Цитоэмбриологические особенности ускоренного репродуктивного цикла *Pinus sibirica* (Pinaceae) в условиях интродукции в зоне хвойно-широколиственных лесов / В. С. Свинцова, И. Н. Третьякова // Ботанический журнал. - 2014.- Т. 99. - № 12. - С. 1353–1363.
 87. Соколов, В. А. Импринтинг у растений / В. А. Соколов // Генетика. - 2006. - Т.42. - №9. - С.1250–1260.
 88. Соколов, В. А. Существует ли гаметофитный апомиксис у цветковых растений? / В. А. Соколов, П. А. Панихин, Т. К. Тараканова // Вавиловский журнал генетики и селекции. –2011. – Т.15. - №1.- С.80 – 101.
 89. Сорокина, З. П. Рост и межтканевые взаимодействия в интактных и культивируемых семяпочках и семенах кедра сибирского: автореф. дисс.... канд. биол. наук: 00.03.05/ Сорокина Зинаида Петровна. - Иркутск, 1980. – 21с.
 90. Суриков, И. М. Несовместимость и эмбриональная стерильность у растений. М: Агропромиздат, 1991. – 220 с.
 91. Сурсо, М. В. Эмбриологические процессы у сосны обыкновенной при использовании пыльцы после разных режимов хранения автореф. дисс....канд. биол. наук: 03.00.05 / Сурсо Михаил Вольдемарович. - Москва, 1989. - 19с.
 92. Сурсо, М. В. Фенология репродуктивных циклов и качество семян хвойных (*Pinaceae*, *Cupressaceae*) в северной тайге / М. В. Сурсо // Arctic Environmental Research. - 2017. - Т. 17. - № 4. - С. 355–367.
 93. Тараканов, В. В. Лесная селекция в России: достижения, проблемы, приоритеты (обзор) / В. В. Тараканов, М. М. Паленова, О. В. Паркина, Р. В. Роговцев, Р. А. Третьякова // Лесохозяйственная информация. - 2021. - № 1. - С. 100–143.

94. Тарбаева, В. М. Сравнительная морфология и анатомия семян голосеменных / В. М. Тарбаева. - Сыктывкар, 1995. - 244 с.
95. Тахтаджян, А. Л. Грани эволюции / А. Л. Тахтаджян. - Санкт-Петербург: Наука, 2007. - 326 с.
96. Титов, Е. В. Влияние биолого-экологических факторов при гибридизации кедра сибирского / Е. В. Титов // Тезисы докладов Всесоюзного совещания по лесной генетике, селекции и семеноводству. - Петрозаводск: Институт Леса КФ АН СССР, 1983. - С.136-137.
97. Титов, Е. В. Развитие мегастробиллов у кедра сибирского / Е. В. Титов // Лесная геоботаника древесных растений. - 1982. - № 18. - С. 136–140.
98. Титов, Е. В. Межвидовая гибридизация кедровых сосен / Е. В. Титов // Гибридизация лесных древесных пород: сборник научных трудов ЦНИИ лесной генетики и селекции (ред. А. П. Царев). - Воронеж: ЦНИИЛГиС, 1988. – С. 76-83.
99. Тренин, В. В. Введение в цитозембриологию хвойных / В. В. Тренин.- Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР, 1988.- 152 с.
100. Третьякова, И. Н. Эмбриология хвойных: физиологические аспекты. / И. Н. Третьякова - Новосибирск: Наука, 1990. - 157с.
101. Третьякова, И. Н. Образование каллуса и индукция соматических зародышей в культуре *in vitro* у *Pinus sibirica* Du Tour / Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В. и др. // Журнал Сибирского Федерального Университета (Биология). - 2013. - Т.1. - № 6. - С. 44-60.
102. Третьякова, И. Н. Особенности эмбрионального развития у сосны сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) с однолетним циклом развития женской шишки в горах Западного Саяна / И. Н. Третьякова, Н. В. Новоселова, Ю. А. Череповский // Физиология растений. - 2004.- Т. 51.- № 1. - С. 134–141.
103. Третьякова, И. Н. Репродуктивный потенциал хвойных, соматический эмбриогенез и апомиксис / И. Н. Третьякова, В. В. Минеев // Онтогенез. - 2021. –Т. 52. - № 2. - С. 94–107.

104. Тырнов, В. С. Взаимоотношения зародыша и эндосперма при апомиксисе / В. С. Тырнов // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т.3: Системы репродукции (Ред. Т.Б. Батыгина). – Санкт-Петербург: Мир и семья, 2000. – С.180–186.
105. Унгурияну, Т. Н. Краткие рекомендации по описанию, статистическому анализу и представлению данных в научных публикациях / Т. Н. Унгурияну, А. М. Гржибовский // Экология человека. – 2011. - №5. – С.55-60.
106. Френкель, Р. Механизмы опыления, размножения и селекции растений / Р. Френкель, Э. Галун. - Москва: Колос, 1982. - 384 с.
107. Хагман, М. Барьеры при межвидовой гибридизации в роде *Pinus* / М. Хагман // Доклады международного симпозиума по селекции, генетике и лесному семеноводству хвойных пород. – Москва: Пушкино, 1972. – С.12-13.
108. Хазова, И. И. Цитоэмбриологические барьеры несовместимости при межвидовой гибридизации сосен / И. И. Хазова // Гибридизация лесных древесных пород: сборник научных трудов ЦНИИ лесной генетики и селекции (ред. А. П. Царев). - Воронеж: ЦНИИЛГиС, 1988. – С. 93-101.
109. Хамитов, Р. С. Закономерности изменчивости массы семян кедра сибирского при его интродукции в леса Вологодской области / Р. С. Хамитов, С. М. Хамитова // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. - 2013. - № 4. - С. 131–133.
110. Хамитов, Р. С. Изменчивость биометрических параметров шишек кедра сибирского / Р. С. Хамитов, С. М. Хамитова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2013. - № 6. - С. 22–25.
111. Хамитов, Р. С. Особенности изменчивости параметров шишек кедра сибирского при его интродукции / Р. С. Хамитов, С. М. Хамитова // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. - 2013. - № 11.- С. 40–43.

112. Хохлов, С. С. Эволюционно-генетические проблемы апомиксиса / С. С. Хохлов // Апомиксис и селекция. Москва: Наука. - 1970. - С. 5–21.
113. Хромова, Л. В. Эмбриологические процессы в неопыленных семяпочках сосны и аномалии при ксеногамии / Л. В. Хромова // Лесоведение. - 1985. - №2. – С.47 – 52.
114. Хуторной, О. В. Структура урожая кедра сибирского: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 00.03.05/ Олег Викторович Хуторной - Красноярск, 1998. - 21с.
115. Царев, А. П. Государственная регистрация лесных селекционных достижений в России / А. П. Царев // Лесной вестник. - 2016. - №5. - С. 184-190.
116. Шимаков, М. Полиэмбриональные семена в арктических областях / М. Шимаков // Половая репродукция хвойных. Новосибирск: Наука, 1973. - С.84-86.
117. Шишкинская, Н. А. Классификация апомиксиса / Н. А. Шишкинская, О. И. Юдакова // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т.3: Системы репродукции (ред. Т. Б. Батыгина). – Санкт-Петербург: Мир и семья, 2000. – С. 168-180.
118. Шишкинская, Н. А. Апомиксис и эволюция растений / Н. А. Шишкинская, О. И. Юдакова // Известия Саратовского университета. - 2009. – Т.9. -№. 1. - С.55- 60.
119. Ямбуров, М. С. «Ведьмины метлы» мутационного типа у некоторых видов семейства Pinaceae: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 00.03.05 / Ямбуров Михаил Сергеевич. - Томск, 2010. – 21с.
120. Ярославцев, Г. Д. Фенологические наблюдения за хвойными (методические указания) / Г. Д. Ярославцев, Н. Е. Булыгин, С. И. Кузнецов– Ялта, 1973. – 48с.
121. Abrahamsson, M Patterning during embryo development in *Pinus*. / M. Abrahamsson // Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. - 2016.- p. 48.

122. Anders, C. Accelerating wood domestication in forest trees through genome editing: advances and prospects. / C. Anders, L. Hoengenaert, W. Boerjan // Current opinion in plant biology. - 2023. – Vol.71.-P.13-27
123. Aronen, T. From lab to forest: overcoming barriers to *in vitro* propagation of forest trees. / Aronen, T., Sota, V., Cvjetković, B. et al. // J. For. Res. -2025 – Vol.36. - A 120.
124. Arya, S. Induction of somatic embryogenesis in *Pinus roxburghii* Sarg. / S. Arya, R. K. Kalia, I. D. Arya // Plant Cell Rep. - 2000. - Vol.19. – P. 775-780.
125. Attree, S. M. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers / S. M. Attree, L. S. Fowke // Plant Cell Tiss Org Cult. - 1993. - Vol.35. – P.1-35.
126. Baskin, C. C. The rudimentary embryo: an early angiosperm invention that contributed to their dominance over gymnosperms. / Baskin C.C, Baskin J.M. // Seed Science Research. - 2023.- P.1–12.
127. Becwar, M. R. Development and characterization of *in vitro* embryogenic systems in conifers. / Becwar, M. R., Wann, S.R., Johnson, M.A. // Somatic cell genetics of woody plants. Forestry Sciences, Vol. 30. Springer, 1988. - P.1-18.
128. Becwar, M. R. Multiple parental genotypes in embryogenic tissue derived from individual immature loblolly pine seeds / M. R. Becwar, T. D. Blush, D.W. Blush, T. D. Brown // Plant Cell Tissue Organ Culture. - 1991. – Vol. 26. – P. 37 – 44.
129. Becwar, M. R. Reciprocal parental effect on somatic embryogenesis induction from immature zygotic embryos of *Pinus taeda* L. / M. R. Becwar, E. E.Chesic// Abstracts VIIIth international congress of plant tissue and cell culture. - Florence, 1994. - P. 199.
130. Bell, P. R. Apomictic features revealed in a conifer / P. R. Bell // Int. J. Plant. Sci. – 1994. – Vol. 155. – P. 621-622.
131. Bicknell, R. A. Understanding apomixis: Recent advances and remaining conundrums / R. A. Bicknell, A. M. Koltunow // Plant Cell. – 2004. - Vol.16. – P. 228-245.

132. Blada, I Interspecific hybridization of Swiss stone pine (*Pinus cembra* L.) // *Silvae Genetica*. - 1994. - Vol.43. - №1. - P.14-20.
133. Bonga, J. M. Cloning of conifers, with emphasis on mature trees / J.M. Bonga, J.E. MacDonald, P. von Aderkas // *Advances in Plant Biotechnology*. - New Dehli: Studium Press LLC, 2008. - P. 475-490.
134. Bonga, J. M. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers / J. M. Bonga, K. K. Klimaszewska, P. von Aderkas // *Plant Cell Tiss Organ Cult*. - 2010. - Vol.100. – P. 241–254.
135. Bozhkov, P. V. Programmed cell death in plant embryogenesis / P. V. Bozhkov, L. H. Filonova, M. F. Suarez Curr. Top. Dev. Biol. – 2005. –Vol.67. – P.135-79.
136. Bozhkov, P. V. Two alternative pathways of somatic embryo origin from polyembryonic mature store seeds of *Pinus koraiensis* Sieb. Et Zucc. / P.V. Bozhkov, I. S. Ahn, Y. G. Park // *Can. J. Bot.* -1997. – Vol.75. – P. 509-512.
137. Breygina, M. Pollen germinationand pollen tube growth in gymnosperms. / M. Breygina, E Klimenko, O. Schekaleva // *Plants*. - 2021. - N.10. – A.1301.
138. Budimir, S. Developmental histology of organogenic and embryogenic tissue in *P. omorika* culture / S. Budimir // *Biol. Plant*. - 2004.- Vol. 47. – P. 467-470.
139. Buchholz, J. T. Origin of cleavage polyembryony in conifers / J. T. Buchholz // *Botanical Gazette*. – 1926. - 81. – P.55-71.
140. Cairney, J. Transcript profiling; a tool to assess the development of conifer embryos / J. Cairney, N. Xu, J. Mackay, G. Pullman // *In vitro cellular and developmental biology – Plant*. - 2000. - Vol. 36.- P.155–162.
141. Cairney, J. Natural and somatic embryo development in loblolly pine: Gene expression studies using differential display and DNA arrays / J. Cairney, N. Xu, G. S. Pullman et al. // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. - 1999. – Vol. 77. - P. 5–17.
142. Cairney, J. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis / J. Cairney, G. S. Pullman // *New Phytologist*. - 2007. – Vol. 176. – P. 511-536.

143. Castander-Olarieta, A. Stress modulation in *Pinus* spp. somatic embryogenesis as model for climate change mitigation: stress is not always a problem. / Castander-Olarieta, A., Pereira, C., Montalbán, I.A., In: Chong, P., Newman, D., Steinmacher, D. // Agricultural, forestry and bioindustry biotechnology and biodiscovery. - Springer, 2020. - P. 320-343.
144. Castander-Olarieta, A. Somatic embryogenesis in Pines. / A. Castander-Olarieta, P. Moncaleán, I. A. Montalbán Marco A. Rami´rez-Mosqueda // Somatic embryogenesis: methods and protocols - 2022 - Vol. 2527 - P. 41-56.
145. Campbell, M. M. Forestry's fertile crescent: the application of biotechnology to forest trees/ M. M. Campbell, M. A. Brunner, M. H. Jones, H. S. Strauss // Plant Biotechnology Journal. – 2003. - Vol.1. – P. 141-154.
146. Carneros, E. Plant regeneration in Stonepine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis / E. Carneros, C. Celestino, K. Klimaszewska, et al. // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2009. - Vol. 98. – P. 165-178.
147. Chen, S. G. Study on somatic embryogenesis induction from immature seeds of five family lines of *Pinus koraiensis*. / S.G. Chen, C.Y. Qin, C.H.Wang, // For. Eng. – 2021.- Vol. 37. - P. 13–17.
148. Chenglin, L. Forest tree breeding under the global environmental change: challenges and opportunities. / L. Chenglin, L. Baochen, Z. Wenxuan, J. Jiebei, T. Jieshi. // Forests and People. - 2025. – Vol.20. – A.100867.
149. Christenhusz, J. M. A new classification and linear sequence of extant gymnosperms / J. M. Christenhusz, J. L. Reveal, A. Farjon, M. F. Gardner, R. R. Mill & M / W. Chase // Phytotaxa. – 2011.- Vol.19. - P. 55–70.
150. Critchfield, W. B. Interspecific hybridization in *Pinus*: a summary review. // Sympon interspecific hybridization in forest trees. - 1975. - P. II. - P. 99-105.
151. Critchfield, W. B. Hybridization and classification of the white pines (*Pinus* section *Strobus*) / W. B. Critchfield // Taxon. – 1986. – Vol.35. (N 4). – P. 647-656.
152. Denchev, P. Somatic embryogenesis for conifer seedling production. / P. Denchev, C. S. Grossnickle // Reforesta. - 2019. – Vol.7. - P. 109-137.

153. Dogra, P. D. Seed sterility and disturbances in embryogeny in conifers with particular reference to seed testing and tree breeding in *Pinaceae* / P. D. Dogra // Stud.for Sueci. -1967. - Vol. 45. – P. 1–92.
154. Dogra, P. D. Morphology, development and nomenclature of conifer embryo / P. D. Dogra // Phytomorphology. – 1979. -Vol. 28. – P. 307-322.
155. Doyle, J. Proembryogeny in *Pinus* in relation to that in other conifers: a survey / J. Doyle // Proc. Roy. Dublin Soc. Sect. Biol.- 1963. - Vol. 62. -P. 161–216.
156. Durzan, D. J. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures / D. J. Durzan, P. K. Gupta // Plant Science. - 1987.- Vol. 52. - P. 229-235.
157. Durzan, D. J. Latent diploid parthenogenesis and parthenote cleavage in egg-equivalents of Norway spruce/ D. J. Durzan, K. Jokinen, M.P. Guerra, et al.// Int. J. Plant. Sci.- 1994. - Vol. 155. – P. 677-688.
158. Durzan, D. J. Monozygotic cleavage polyembryogenesis and conifer tree improvement / D. J. Durzan // Cytology and Genetics. - 2008. - Vol. 42,– P. 159-173.
159. Eckhardt, N. A. Pattern of gene expression in apomixes / N. A. Eckhardt // Plant Cell. – 2003. - Vol. 15. – P. 1499-1501.
160. Egertsdotter, U. Plant physiological and genetical aspects of the somatic embryogenesis process in conifers / U. Egertsdotter // Scand. J. For. Res.- 2018.- Vol. 34. – P. 360– 369.
161. Egertsdotter, U. Automation and scale up of somatic embryogenesis for commercial plant production, with emphasis on conifers. / U. Egertsdotter, I. Ahmad, D. Clapham // Front. Plant Sci. - 2019.- Vol.10. -A.109.
162. Elhiti, M. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis *in vitro* / M. Elhiti, C. Stasolla // Cell. Dev. Biol.- Plant. – 2013. - Vol. 49. -P. 631–642.
163. Ershova, M. A., The state of the explant as a key factor influencing the initiation of *Pinus sylvestris* L. somatic embryogenesis / M. A. Ershova, R. V. Ignatenko, O. V. Chirva // Plant Biotechnol. Rep.- 2025. - Vol.19. - P. 29–41.

164. d'Erfurth, I. Turning meiosis into mitosis / I. d'Erfurth, S. Jolivet, N. Froger // PLoS Biol. - 2009. - Vol. 7. – P.100-124.
165. Estrada-Luna, A. A. Beyond promiscuity: from sexuality to apomixes in flowering plants / A. A. Estrada-Luna, W. Huanga-Mamani, G. Acosta-Garcia et al. // In Vitro Cell. Dev.Biol. Plant. – 2002. - Vol.38. – P.146-151.
166. Fehér, A. Somatic embryogenesis — stress-induced remodeling of plant cell fate. Biochim. et Biophys. Acta (BBA)—Gene Regul. Mech. – 2015.- Vol.1849. - P. 385–402.
167. Feher, A. The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't / A. Feher // Acta.Biol. Szeged. - 2008. - Vol. 52. – P. 53-56.
168. Feher, A. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state / A. Feher, T. P. Pasternak, D. Dudits // Plant. Cell. Tissue Organ. Cult. - 2003. - Vol. 74. – P. 201-228.
169. Fei, Q. Somatic embryogenesis of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.): initiation, maturation, germination and mycorrhization of regenerated plantlets. / Q. Fei, Y. M. Chen, X. Ke // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). - 2024.- Vol.157. - A.65
170. Fernando, D. D. Sexual reproduction and crossing barriers in white pines: the case between *Pinus lambertiana* (sugar pine) and *P. monticola* (western white pine). / D. D. Fernando, S. M. Long, R. A. Snieszko // Tree Genet. Genomes. – 2005. - Vol.1. – P.143–150.
171. Filonova, L. H. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in gymnosperm, Norway spruce/ L. H. Filonova, V. P. Bozhkov, V. B. Brukhin et al. // Journal of Cell Science. – 2000. - Vol. 113. – P. 4399 - 4411.
172. Fraga, H. F. Somatic embryogenesis in conifers: one clade to rule them all? / H. F. Fraga, P.E.C. Moraes, L.d.N. Vieira, M. P. Guerra // Plants. – 2023.- Vol.12. – A. 2648.

173. Gao, F. Key techniques for somatic embryogenesis and plant regeneration of *Pinus koraiensis*. / F. Gao, C. X. Peng, H. Wang, I. N. Tretyakova, A. M. Nosov, H. L. Shen // Forests. - 2020.- Vol.11. - A. 912.
174. Gao, F. Optimization of culture conditions and selection of suitable explants for callus induction from mature embryo of *Pinus koraiensis*. / Gao, F., H. L. Shen, C. P. Liu, et al. // Nanjing. Forestry. Univ. - 2017. –Vol. 60. - A. 43.
175. Garin, E. Screening of large numbers of seed families of *Pinus strobus* L. for somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos / E. Garin, N. Isabel, A. Plourde // Plant. Cell. Rep. - 1998. - Vol. 18. - P. 37–43.
176. Garcia-Mendiguren, O. Environmental conditions at the initial stages of *Pinus radiata* somatic embryogenesis affect the production of somatic embryos // O. Garcia-Mendiguren, I. A. Montalban, T. Goicoa et al., // Trees. - 2016. - Vol. 30. - P. 949–958.
177. Geri, C. Genome plasticity during of embryogenic competence / C. Geri, A. Turrini, L. Giorgetti et al. // Genome. – 1999. - Vol. 42. –P. 1134-1143.
178. Gernandt, D. Phylogeny and classification of *Pinus* / D. Gernandt, G. López, G. Sol // Taxon. - 2005. - Vol. 54. – P. 456-470.
179. Goldberg, R. B. Plant embryogenesis: zygote to seed / R. B. Goldberg, G. Paiva, R. Yadegari // Science. - 1994. - Vol. 266. – P. 605-614.
180. Gonsalves, S. Identification of differentially expressed genes during embryogenesis in Maritime Pine (*Pinus pinaster*) / S. Gonsalves, J. Cairney, M. Olivera, C. Miguel // Silva Lusitana. – 2005. - Vol.13. - P. 203-216.
181. Goroshkevich, S. 30-year cone production dynamics in Siberian stone pine (*Pinus sibirica*) in the southern boreal zone: a causal interpretation / S. Goroshkevich, S. Velisevich, A. Popov, O. Khutornoy, G. Vasilyeva // Plant ecology and evolution. - 2021. - Vol.154(3). - P. 321–331.
182. Gupta, P. K. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. / P. K. Gupta, D. J. Durzan. // Biotechnology. - 1987.- Vol.5. - P. 147–151.

183. Jimenes, V. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis / V. Jimenes, C. Thomas // Somatic Embryogenesis: Plant Cell - 2005. - Vol. 2. - P. 103-118.
184. Jin, W.-T. Phylogenomic and ecological analyses reveal the spatiotemporal evolution of global pines. / W.-T. Jin, D. S. Gernandt, C. Wehenkeld, et al., // PNAS. - 2021. - Vol. 118. - N. 20.
185. Harada, J. J....response: Embryos without sex / J. J. Harada, T. Lotan, R. L. Fischer, R. B. Gold // Trends in Plant Science. - 1998. - Vol.3(12). - P. 452-453.
186. Harfouche, A. Accelerating the domestication of forest trees in a changing world / A. Harfouche, R. Meilan, M. Kirst et al. // Trends in Plant Science. – 2012. - Vol.17. – P. 57-122.
187. Hagman, M. Observation on cross-, self- and interspecific pollination in *Pinus peuce* / M. Hagman, L. Mikkola // Silvae genetica. - 1963. - Vol.12. - P. 73-79.
188. Haggman, H. Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction / H. Haggman, A. Jokela // Journal of Experimental Botany. - 1999. - Vol. 50(№34). - P. 1769-1778.
189. Hao, Z. Z. Molecular phylogenetics and evolutionary history of sect. *Quinquefoliae* (*Pinus*): implications for northern hemisphere biogeography / Z. Hao, Y. Y. Liu, M. Nazaire, et al., // Molecular phylogenetics and evolution. – 2015. - Vol. 87. – P. 65–79.
190. Hargreaves, C. Improving initiation, genotype capture, and family representation in somatic embryogenesis of *Pinus radiata* by a combination of zygotic embryo maturity, media, and explant preparation. / C. Hargreaves, C. B. Reeves, J. I. Find // Can. J. Res. -2009.- Vol. 39 (8). – P. 1566–1574.
191. Hargreaves, C. Nurse tissue for embryo rescue: testing new conifer somatic embryogenesis methods in a F1 hybrid pine. / C. Hargreaves, C. Reeves, K. Gough et al. –Trees. – 2017. –Vol. 31. – P. 273–283.
192. Harvengt, L. Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year –old Norway spruce through somatic embryogenesis / L. Harvengt, J. F. Trontin, I. Reymond et al. // Planta. – 2001. - Vol. 213. – P. 828-832.

193. Harvengt, L. Influence of the embryonal – suspensor mass (ESM) sampling on development and proliferation of maritime pine somatic embryos / L. Harvengt, A. Bouvet, R. Calvayrac // Plant Sci. – 2001. - Vol.160. – P. 473-479.
194. Heine, A. J. Pollination bag type affects ovule development and seed yields in *Pinus taeda* L. / A. J. Heine, T. D. Walker, B. J. Jackson et al. // Forest Science. - 2022. - Vol. XX. – P. 1–13.
195. Hiratsuka, R. Pollen tube reuses intracellular components of nucellar cells undergoing programmed cell death in *Pinus densiflora*. / R. Hiratsuka, O. Terasaka // Protoplasma. – 2011. - №248 (2). – P. 339-351.
196. Hou, H. Method for genetic transformation using embryonic callus of *Pinus koraiensis*. / H. Hou, Y. Wu, L. Yang et al. // Forests. – 2024. - Vol.15.- A. 2058.
197. Ignatenko, R. V. Some problems arising during the initiation of somatic embryogenesis in *Pinus sylvestris* L. / R. V. Ignatenko, O. V. Chirva, M. A. Ershova, N. A. Galibina // Environ. Sci. Proc. – 2022. - Vol.22. - A.48.
198. Igasaki, T. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of *Cryptomeria japonica* D. Don. / T. Igasaki, T. Sato, N. Akashi, et al. // Plant Cell. Rep. – 2003 - Vol. 22. – P. 239–243.
199. Kim, Y. W. Relationship between initiation of embryogenic suspensor mass (ESM) and zygotic embryo development in *Pinus densiflora*. / Y. W. Kim, H. K. Moon // For. Sci. Technol. - 2014. – Vol.10 (3). – P. 166–171.
200. Kim, Y. W. Regeneration of plant by somatic embryogenesis in *Pinus rigida* x *P. taeda* / Y. W. Kim, H. K. Moon // In Vitro Cell. Dev. Biol – Plant. – 2007. - Vol.43. – P. 335 – 342.
201. Klimaszewska, K. Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gelan gum / K. Klimaszewska, C. Smith // Physiol Plant. – 1997. - Vol. 100. – P. 949-957.
202. Klimaszewska, K. Conifer somatic embryogenesis: I. Development / K. Klimaszewska, D. R. Cyr // Dendrobiology. - 2002.- Vol.48.- P. 31-39.

203. Klimaszewska, K. Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus*. L / K. Klimaszewska, I-S. Park, C. Overton et al. // In Vitro Cell. Dev. Biol- Plant. – 2001. - Vol.37. – P. 392-399.
204. Klimaszewska, K. Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobus* and in somatic embryos from different maturation treatments / K. Klimaszewska, F. Morency, C. Overton // Physiol Plant – 2004.- Vol.121. – P. 682-690.
205. Klimaszewska, K. Rejuvenation of 7-years old *Picea glauca* somatic trees from shoot bud explants and expression dynamic of several transcription factors during culture / K. Klimaszewska, C. Overton, D. Stewart // Abstract of the Tree Biotechnology Conference IUFRO. – Whistler. -2009. – P. 452.
206. Klimaszewska, K. Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.) / K.Klimaszewska, C. Noceda, G. Pelletier et al. // In vitro Cell Dev Biol. - Plant. - 2009. - Vol.45. – P. 20-33.
207. Klimaszewska, K. Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. / K. Klimaszewska, K. Hargreaves, M.A. Lelu-Walter, J.F. Trontin. In: In vitro embryogenesis in higher plants; Germana, M.A., Lambardi, M., Eds.; Humana Press: New York. – 2016.- P. 131–165.
208. Koski, V. Embryonic lethals of *Picea abies* and *Pinus silvestris* / V. Koski // Communic. Inst. For. Fenn. – 1972. - Vol. 75. – P. 4-30.
209. Kriebel, H. B. Embryo development and hybridity barriers in the white Pines (section *Strobus*) // Silvae Genetica. - 1972. - Vol. 21(1-2). - P. 39–44.
210. Krugman, S. L Incompatibility and inviability systems among some western north American pines. Proceedings of IUFRO Working group on sexual reproduction of forest trees. - 1970. – S.22.- 13 p.
211. Kormuták, A. Some cytological and biochemical aspects of interspecific incompatibility in pines (*Pinus* spp.) / A. Kormuták // Acta Dendrobiologica. - 1984. -Vol.7. - 93p.

212. Kousar, F. An improved and simplified somatic embryogenesis protocol in Chir pine (*Pinus roxburghii*). / F. Kousar, U. Egertsdotter, F. Aftab // Sci. Rep. – 2025. -Vol.15. –A. 37560. -DOI: 10.1038/s41598-025-20364-4
213. Lelu, M. A. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus silvestris* on medium with and without growth regulators / M. A. Lelu, S. Bastien, A. Drugeault et al. // Physiol. Plant. – 1999. - Vol.105. – P. 719-728.
214. Lelu-Walter, M. A. Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait) / M. A. Lelu-Walter, M. Bernier-Cardou, K. Klimaszewska // Plant Cell Rep. - 2006. - Vol.25.- P. 767–776.
215. Lelu-Walter, M. A. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus silvestris* (L.) through somatic embryogenesis / M. A. Lelu-Walter, M. Bernier-Cardou, K. Klimaszewska // Plant Cell. Tiss.Organ Culture. – 2008. –Vol.92. – P.31 - 45.
216. Li, Y. Genetic transformation of forest trees and its research advances in stress tolerance. // Y. Li, Y. Yuan, Z. Hu, et al. // Forests. - 2024. – Vol. 15. – A. 441.- DOI: 10.3390/f15030441
217. Liang, Y. Genotype-dependent induction of embryogenic callus and programmed cell death in Korean pine // Y. Liang, L. Jianghe, X. Xin // BMC Plant Biology. - 2025. – V. 25. -A.741.- DOI: 10.1186/s12870-025-06787-1
218. Li, X. Y. Effect of basal medium, growth regulators and phytigel concentration on initiation of embryonic culture from immature zygotic embryos of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) / X.Y. Li, F.H. Huang, E.E. Gbur / Plant. Cell. Rep. -1998. - V.17. – P. 298-301.
219. Little, E. L. Botanical descriptions of forty artificial pine hybrids. / E. L Little, F. I. Richter U.S. Department of Agriculture. - 1965. – 47 p.
220. Little, S. Pollen-ovule interactions in gymnosperms / S. Little, N Prior, C. Pirone, P. von Aderkas // Reproductive biology of plants. - 2014.- P. 97-117.
221. Litvae, J. D. Influence of Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot

- (*Dausus carota* L.) / J. D. Litvae, D. S. Verma, M. A. Johnson // Plant Cell Reports. - 1985.- Vol.4.- P. 325-328.
222. Mahdavi-Darvari, F. Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis / F. Mahdavi-Darvari, N. M. Noor, I. Ismanizan // Plant Cell Tissue Organ Cult. - 2015. - Vol. 120. – P. 407-422.
223. Malabadi, B. R. Cryopreservation and plant regeneration via somatic embryogenesis using shoot apical domes of mature *Pinus Roxburghii* trees / B. R. Malabadi // In vitro Cell.Dev.Biol-Plant. – 2006. - V. 42. – P.152-159.
224. McWilliam, J. R. Interspecific Incompatibility in Pinus. / J. R. McWilliam// American Journal of Botany. - 1959.- Vol.46.-P. 425–433.
225. MakKay, J. J. Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implication for breeding / J. J. MakKay, M. R. Becwar, Y-S. Park // Tree Genetic and genomics. - 2006. - Vol. 2. - P. 1-9.
226. Maruyama, T. E. Protocol for somatic embryogenesis in Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl.) and Japanese red pine (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.). / T. E. Maruyama, Hosoi, Y. // In Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants; Jain, S.M., Gupta, P.,Eds.; Forestry Sciences, Springer: Cham, Switzerland, 2018.- P. 56-62.
227. Maruyama, E. Somatic enbryogenesis and plant regeneration in *Pinus armandii* Franch. var. amamiana (Koidz) Hatusima, an endemic and endangered species in Japan / E. Maruyama, Y. Hosoi, K. Ishii // In vitro Cell Dev. Biol. – Plant. - 2007. - Vol.43. – P. 28-34.
228. Mathieu, M. Germin-like genes are expressed during somatic embryogenesis and early development of conifers / M. Mathieu, M. A. Lelu-Walter, A. Blervacq et al. // Plant Mol. Biol. - 2006. - Vol. 61. – P. 615–627.
229. Merkle, S. A. Forest tree biotechnology. / S. A. Merkle, J. F. Dean // Curr. Opin. Biotechnol. – 2000. – N.11. – P. 298–302.
230. Miguel, C. Somatic embryogenesis from 20 open-pollinated families of Portuguese plus trees of maritime pine / C. Miguel, S. Gonçalves, S. Tereso et

- al. // Plant Cell. Tissue and Organ Culture. - 2004. – N.76. – P. 121–130. -DOI: 10.1023/B:TICU.00000007253.91771.e3
231. Mogie, M. Evolution of asexual reproduction in plants /M. Mogie /Springer: Netherlands, 1992. – 276 p.
232. Montalbán, I. A. Enhancing initiation and proliferation in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) somatic embryogenesis through seed family screening, zygotic embryo staging and media adjustments. / I. A. Montalbán, N. D. Diego, P. Moncaleán // Acta Physiologiae Plantarum. - 2012. - Vol.34. - P. 451–460.
233. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. - 1962. - Vol.15. - №4. - P. 473-497.
234. Nagmani, R. Somatic embryogenesis in *Pinus palustris*. / R. Nagmani, A. M. Diner, G. C. Sharma // Can. J. For. Res. - 1993. - Vol. 23. - P. 873–876.
235. Nagmani, R. Anatomical comparison of somatic and zygotic embryogeny in conifers / R. Nagmani, A. M. Diner, S. Garton // Somatic embryogenesis in woody plants. -1995. -Vol. 1. - P. 23–48.
236. Nie S. Effects of a new plant growth regulator on callus induction from immature embryo explants of *Pinus koraiensis* / S. Nie, Y. Wang, Y. Yan // Forests. – 2023. – N.14. – A. 2413. - DOI: 10.3390/ f14122413
237. Nataraja, K. Epibrassinolide inducesomatic embryogenesis in *P. wallichiana* A. B. Jacks / K. Nataraja // J. Plant Sci. – 2007. - Vol. 2. – P. 171-178.
238. Niskanen A. M. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus silvestris*). / A. M. Niskanen, J. Lu, S. Seitz et al. // Tree Physiology. – 2004. - Vol.24. – P. 1259-1265.
239. Nunes, S. Somatic embryogenesis of hybrid *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *P. caribaea* var. *hondurensis* and ploidy assessment of somatic plants. / Nunes S, Marum L, Farinha N et al. // Plant Cell Tiss Organ Cult. - 2018.- N. 132.-A.71. - DOI: 10.1007/s11240-017-1311-7

240. Owens, J. K. Sexual reproduction of *Pinus contorta*. II. Postdormancy ovule, embryo end seed development. / J. K. Owens, S. J. Simpson, M. Molder // Canadian Journal of Botany. - 1982. - Vol.60. – P. 2071-2083.
241. Paciorek, T. The secret to life is being different: asymmetric divisions in plant development / T. Paciorek, D. C. Bergmann // Current Opinion in Plant Biology. – 2010. - Vol. 13(6). - P. 661–669.
242. Patel, J. Biotechnology tools for the improvement of forestry: a review / J. Patel, A. Chaudhari // European Journal of biotechnology and bioscience. – 2021. -Vol.9. – I.3. - P. 35 – 40.
243. Park, Y. S. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster* and *P. silvestris* at three laboratories in Canada and France / Y. S. Park, M.A. Lelu-Walter, L. Harvenget et al. // Plant Cell Tiss Organ Cult. - 2006. - Vol.86. – P. 87-101.
244. Park, S-Y. Lodgepole pine: the first evidence of seed-based somatic embryogenesis and the expression of embryogenesis marker genes in shoot bud cultures of adult trees. / S-Y. Park, K. Klimaszewska, S. D. Mansfield // Tree Physiol. – 2010. - Vol. 30. – P. 1469–1478.
245. Percy, R. E. Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of western white pine / R. E. Percy, K. Klimaszewska, D.R. Cyr // Can. J. For. Res. - 2000. - Vol.30. – P. 1867-1876.
246. Peng, C. X. Physiological and biochemical traits in Korean pine somatic embryogenesis. / C. X. Peng, F. Gao, H. Wang et al. // Forests. – 2020. – N. 11. –A. 577. - DOI:10.3390/f11050577
247. Peng, C. Morphological and physiological indicators for screening cell lines with high potential for somatic embryo maturation at an early stage of somatic embryogenesis in *Pinus koraiensis*. / C. X. Peng, F. Gao, H. Wang et al. // Plants. – 2022. – N. 11. –A.1 867. -DOI: 10.3390/plants11141867
248. Pereira, C. *Pinus halepensis* somatic embryogenesis is affected by the physical and chemical conditions at the initial stages of the process. / C. Pereira, I. A.

- Montalbán, O. García-Mendiguren et al. // J. For. Res. -2016. -V.21. -P.143–150. <https://doi.org/10.1007/s10310-016-0524-7>
249. Pichot, C. Cypress surrogate mother produces haploid progeny from alien pollen / C. Pichot, B. Liens // Genetics. - 2008. - Vol.178.- P.379–383.
250. Plitman, U. Agamospermy is much more common than conceived: a hypothesis // Ist. J. Plant Sci. – 2002. - Vol.50. - P. 111-117.
251. Prehn, D. Regeneration of whole plants from apical meristems of *Pinus radiata* / D. Prehn, C. Serrano, A. Mercado et al. // Plant Cell Tiss Organ Cult. - 2003. - Vol.73. – P. 91-94.
252. Price, R. A. Phylogeny and systematic of Pinus / R. A. Price, A. Liston, S. H. Strauss // Ecology and biogeography of Pinus. - Cambridge University Press, 1998. - P. 49-68.
253. Pullman, G. S. Natural and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) / G. S. Pullman, J. Cairney, N. Xu et al. //Applied Biochemistry and Biotechnology. - 1999. - Vol. 37. - P. 77-79.
254. Pullman, G. S. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation rates / G. S. Pullman, S. Jonson // Ann. For. Sci. – 2002. - Vol.59. – P. 663-668.
255. Pullman, G. S. Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination and gene expression / G.S. Pullman, S. Jonson, G. Peter, et al. // Plant Cell Rep. - 2003. - Vol.21. - P. 747 – 758.
256. Pullman, G. S. Brassinolide improves embryogenetic tissue initiation in conifers and rice / G. S. Pullman, Y. Zhang, B. N. Phan // Plant Cell Rep.- 2003. -Vol.22. - P. 96 – 104.
257. Pullman, G. S. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.): improving culture initiation with MES, pH buffer, biotin, and folic acid / G.S. Pullman, S. Jonson, S. Van Tassel // Plant Cell Tissue Organ Cult. - 2005. -Vol.80. - P. 91-103.

258. Pullman, G. S. Conifer embryogenic tissue initiation: improvements by supplementation of medium with D-xylose and D-*chiro*-inositol / G.S. Pullman, K.-M. Chase, A. Skryabina // Tree Physiology. – 2009. - Vol. 29. – P.147-156.
259. Pullman, G. S An embryo staging system for comparison of zygotic and somatic embryo development / G. S. Pullman, D. T. Webb // Division Biological Sciences Symposium TAPPI. - Minneapolis, 1994. - P. 31–34.
260. Ramarosandratana, A. Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum on embryonal-suspensor mass proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos / A. Ramarosandratana, L. Harvengt, A. Bouvet et al. // In Vitro cell. Dev.Biol. Plant. - 2001. - Vol.37. - P. 29-34.
261. Ravindra, B. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula* / B. Ravindra, B. R. Malabadi, J. Staden // Tree physiology. - 2005. - Vol.25. - P. 11-16.
262. Riesberg, L. N. Plant hybridization / L. N. Riesberg, S. E. Carney // New Phytologist. - 1998. - Vol.140. – P. 599– 624.
263. Rodríguez, S. M. Conifer biotechnology: an overview. / S. M. Rodríguez, R. Ordás, J. M. Alvarez // Forests. – 2022. - Vol.13. - A.1061. -DOI: 10.3390/f13071061
264. Ruaud, J. N. First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies* / J. N. Ruaud, J. Bercetch, M. Paques // Plant Cell Rep. – 1992. - Vol.11. – P. 563-566.
265. Salaj, T.; Klubíková, K.; Matusova, R.; Salaj, J. Somatic embryogenesis in selected conifer trees *Pinus nigra* Arn. and *Abies* hybrids. // Front. Plant Sci. – 2019.-Vol. 10. -A. 13.
266. Salajova, T. Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* / T. Salajova, J. Salaj // Arn. Plant Sci. - 2001. - Vol.145. - P. 33-40.
267. Sallandrouze, A. Characterization of the developmental stages of cypress zygotic embryos by two-dimensional electrophoresis and by cytochemistry. / A.

- Sallandrouze, M. Faurobert, E. M. Maâtaoui. // *Physiol Plant.* - 2002. – N.114(4). – P. 608-618. - DOI: 10.1034/j.1399-3054.2002.1140415.
268. Sarvas, R. Investigations on the flowering and seed crop of *Pinus silvestris* / R. Sarvas // *Commun. Inst. Forest. Fenn.* - 1962. - Vol.54.- № 4. - P.43-54.
269. Senjo, M. Extensive mitochondrial introgression from *Pinus pumila* to *P. parviflora* var. *pentaphylla* (*Pinaceae*) / M. Senjo, K. Kimura, Y. Watano, et al. // *Journal of Plant Research.* - 1999. – Vol.112. – P. 97–105.
270. Shuvaev, D. N. Late quaternary history of Siberian stone pine as revealed by genetic and paleoecological data / D. N. Shuvaev, V. L. Semerikov, G.V. Kuznetsova, et al. // *Tree Genetics & Genomes*/ - 2023.- Vol.19.-A.16 DOI: 10.1007/s11295-023-01592-z
271. Singh, H. Embryology of gymnosperms / H. Singh / - Berlin – Stuttgart: Borntraeger, 1978. – 302 p.
272. Skinner D. R. Ovule and embryo development, seed production and germination in orchard grown control pollinated loblolly pine (*Pinus taeda* L.) from coastal South Carolina. / D. R. Skinner. - Department of Biology, Victoria, BC, University of Victoria, 1992. - 88 pp.
273. Sorensen, F. C. The role of polyembryony and embryo viability in the genetic system of conifers. / F. C. Sorensen // *Evolution.* - 1982. – N. 36. - P.725-733.
274. Stasolla, C. Somatic embryogenesis in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology / C. Stasolla, L. Kong, E. C. Yeung // *In vitro Cell Dev.Biol.-Plant.* – 2002. - Vol.38. - P. 93-105.
275. Stasolla, C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality / C. Stasolla, C. Y. Edvard // *Plant cell. Tissue and organ Culture.* - 2003. - Vol.74. – P. 15-35.
276. Stasolla, C. Variation in transcript abundance during somatic embryogenesis in gymnosperms / C. Stasolla, P. V. Bozhov, T. M. Chu et al. // *Tree Physiol.* - 2004. - Vol.24. – P.1073-1085.
277. Steiner, N. Toward establishing a morphological and ultrastructural characterization of proembryogenic masses and early somatic embryos of

- Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. / N. Steiner, F. L. Farias-Soares, É. C. Schmidt et al. // *Protoplasma*. – 2016. - № 253(2). - P. 487-501. - DOI: 10.1007/s00709-015-0827-0.
278. Ten Hove, C. A. Who beget whom? Plant cell fate determination by asymmetric cell division / C. A. Ten Hove, R. Heidstra // *Current Opinion in Plant Biology*. - 2008. - Vol.11. - P. 34-41.
279. Tereso, S. Zygotic and somatic embryogenesis in *Pinus pinaster*: comparative histological and histochemical study / S. Tereso, K. Zoglauer, A. Milhinos et al. // *Tree physiology*. - 2007. - Vol. 27.- P. 661-669.
280. Timmis, R. Bioprocessing for tree production in the forest industry: conifer somatic embryogenesis / R. Timmis // *Biotechnol. Prog.* - 1998. - Vol.14. - P. 156-166.
281. Tret'yakova, I. N. Callusogenesis and somatic embryogenesis induction in hybrid embryos from the seeds of *Pinus sibirica*. / I. N. Tret'yakova, E. V. Voroshilova, D. N. Shuvaev // *Russ. J. Plant. Physiol.*- 2014.- Vol. 61. – P. 274–280. -DOI: /10.1134/S1021443714020162
282. Yermstad, D. K. Comparative mapping in *Pinus*: *P. lambertiana* (Dougl) and *P. taeda* L / D. K. Yermstad, J. A. Eckert, L.W. Jill, et al. // *Trees Genetics and Genomes*. – 2011. -Vol. 7. – P.457–468.
283. Uddenberg, D. Embryogenic potential and expression of embryogenesis-related genes in conifers are affected by treatment with a histone deacetylase inhibitor / D. Uddenberg, S. Valladares, A. Abrahamsson, J.F. Sundström, A. Sundas-Larsson, S.von Arnold // *Planta*. –2011. -Vol. 234. –P. 527–539.
284. van Dijk, P. Apomixis technology and the paradox of sex / van Dijk P., J. van Damme // *Trend Plant Sci*. - 2000. - Vol.5. - P. 81-84.
285. Vasilyeva, G. Artificial crosses and hybridization frequency in five-needle pines / G. Vasilyeva, S. Goroshkevich // *Dendrobiology*. - 2018. - Vol. 80. – P. 123–130.

286. Vasilyeva, G. Light microscopic structure of needle in *Pinus sibirica*, *P. pumila* and their hybrids / G. Vasilyeva // Flora – 2021. – Vol. 285. - A. 151964 DOI:10.1016/j.flora.2021.151964
287. Velisevich, S. Climate warming disturbances periodicity of Siberian stone pine seed production (*Pinus sibirica* Du Tour) / S. Velisevich, A. Popov // BIO Web of Conferences. – 2024. – Vol. 130, - A. 01018. - DOI: 10.1051/bioconf/202413001018 BFT-2024
288. von Anderkas, P. Influencing micropropagation end somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment / P. von Anderkas, J. M. Bonga // Tree Physiology. - 2000. -Vol.20. - P. 921-928.
289. von Anderkas, P. Comparison of larch embryogeny *in vivo* and *in vitro* / P. von Anderkas, J. M. Bonga, K. Klimaszewska // Woody plant biotechnology. - New York: Plenum press, 1991. - P. 139-155.
290. von Arnold, S. Developmental pathways of somatic embryogenesis / S.von Arnold, I. Salaba, P. Bozhkov et al. // Plant Cell Tissue Organ Cult. - 2002. - Vol.69. - P. 233-249.
291. von Arnold, S. Embryology in conifers. / S. von Arnold, D. Clapham, M. Abrahamsson // Advances in botanical research. – 2019. -Vol 15. - P. 157–184.
292. Vuosku, J. One tissue, two fates: different roles of megagametophyte cells during Scots pine embryogenesis / J. Vuosku, T. Sarjala, A. Jokela et al. // Journal of experimental Botany. - 2009. - Vol. 60. - №4. - P. 1375-1386. (a)
293. Vuosku, J. Pine embryogenesis many licences to kill for a new life // J. Vuosku, S. Sutela, E. Tillman-Sutela. et al. // Plant signaling and behavior. – 2009.-Vol. 4. (10). –P. 928-932. (b)
294. Wang, X.- Q. Evolution and biogeography of gymnosperms. / X.-Q. Wang, J.-H. Ran // Mol. Phylogenetics Evol. - 2014. – Vol. 75. - P. 24–40.
295. Williams, C. G. Conifer reproductive biology. / C. G. Williams. Springer, Dordrecht. - 2009. - 153 p.
296. Xia, X. R. Somatic embryogenesis of masson pine (*Pinus massoniana*): initiation, maturation and genetic stability analysis at SSR loci. / X. R.Xia,

- F.Yang, X. Ke et al. // Plant.Cell.Tiss.Organ.Cult. – 2021.- Vol.145. - P. 667–677. -DOI:10.1007/s11240-021-02036-z
297. Xu, S. Natural hybridization within seed sources of shortleaf pine (*Pinus echinata* Mill.) and loblolly pine (*Pinus taeda* L.) / S. Xu, C.G. Tauer, C.D. Nelson // Tree Genetics and Genomes. - 2008. -Vol.4. – I.4. –P. 849–858.
298. Yang, Y. Recent advances on phylogenomics of gymnosperms and a new classification. / Y. Yang, D. K. Ferguson, B. Liu et al., // Plant. Diversity. – 2022. – Vol. 44. - P. 340–350.
299. Yildirim, T. Induction of embryogenic tissue and maturation of somatic embryos in *Pinus brutia* TEN. / T. Yildirim, Z. Kaya, K. Işık // Plant Cell Tiss Organ Cult. - 2006. – Vol.87. – P. 67–76.- DOI: 10.1007/s11240-006-9137-8
300. Yin, Y. Advances and perspectives of transgenic technology and biotechnological application in forest trees. / Y. Yin, C. Wang, D. Xiao et al. // Front. Plant Sci. – 2021. – Vol.12. -A. 786328.
301. Zavada, M. S. The role of self-incompatibility and sexual selection in the gymnosperm-angiosperm transition: hypothesis / M. S. Zavada, T. N. Taylor // The American naturalist. - 1986. - Vol.128.-№4. - P.538-550.
302. Zavattieri, M. A. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions / M. A. Zavattieri, A. M. Frederico, M. Lima et al. // Electronic Journal of Biotechnology. – 2010. - Vol.13.- №1. - P. 12-13.
303. Zhao, H. Genetic transformation in conifers: current status and future prospects. / H. Zhao, J. Zhang, J. Zhao, S. Niu // Forestry Research. - 2024. – Vol .4. – DOI: 10.48130/forres-0024-000

Приложение 1.

Список вариантов межвидовых опылений осуществленных в Институте лесных исследований провинции Онтарио. (приводится по Genetics, Breeding, Improvement and Conservation of *Pinus strobus* in Canada G. Daoust J. Beaulieu In: Sniezko, Richard A.; Samman, Safiya; Schlarbaum, Scott E.; Kriebel, Howard B., eds. 2004. Breeding and genetic resources of five-needle pines: growth, adaptability and pest resistance; 2001 July 23–27; Medford, OR, USA. IUFRO Working Party 2.02.15. Proceedings RMRS-P-32. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station

armandii x albicaulis	monticola x strobus	peuce x wallichiana
ayacahuite x strobus	parviflora (glaucous*)	peuce x (monticola x parviflora)
cembra x armandii	parviflora (glaucous*) x (strobus x parviflora)	peuce x parviflora
cembra x albicaulis	parviflora glauca	peuce x pentaphylla
cembra x strobus	parviflora glauca x strobus	peuce x (peuce x strobus)
flexilis x wallichiana	parviflora x albicaulis	peuce x strobus
koraiensis x albicaulis	parviflora x wallichiana	(peuce x strobus (wind*) x (peuce x strobus))
koraiensis x lambertiana	parviflora x strobus	(peuce x strobus (wind*) x strobus)
lambertiana x koraiensis	parviflora x (strobus x parviflora)	peuce x (strobus x wallichiana)
monticola x ayacahuite	(parviflora x strobus) x strobus	(peuce x strobus) x (flexilis x wallichiana)
monticola x (wallichiana** x strobus (P. Schwerinii))	parviflora x (strobus x parviflora)	peuce x (strobus x peuce)
monticola x parviflora	pentaphylla x peuce	(peuce x strobus) x (peuce x strobus)
(monticola x parviflora) x strobus	pentaphylla x (strobus x parviflora)	pumila x strobus
(monticola x parviflora) x pentaphylla	peuce x (flexilis x wallichiana)	pumila x (wallichiana x strobus)
monticola x pentaphylla	peuce x (wallichiana x strobus)	strobus x albicaulis
monticola x peuce	peuce x flexilis	strobus x (flexilis x wallichiana)
(monticola x peuce) x (wallichiana x strobus)		

(strobilus x wallichiana) x (wallichiana x strobilus)	wallichiana x (wallichiana x parviflora)
(strobilus x wallichiana) x (wallichiana x strobilus) (P. Schwerinii)	wallichiana x lambertiana wallichiana x (wallichiana x strobilus)
strobilus x (wallichiana x strobilus)	wallichiana x (wallichiana x strobilus) (P. Schwerinii)
strobilus x wallichiana	wallichiana x strobilus
strobilus x monticola	wallichiana x koraiensis
strobilus x parviflora	wallichiana x parviflora
(strobilus x parviflora) x peuce	(wallichiana x parviflora) x (wallichiana x parviflora)
(strobilus x parviflora) x strobilus	wallichiana x pentaphylla
(strobilus x parviflora) x (strobilus x parviflora)	wallichiana x peuce
strobilus x pentaphylla	wallichiana x strobilus (P. Schwerinii) x wallichiana
strobilus x peuce	wallichiana x strobilus (P. Schwerinii) x (wallichiana x strobilus)
(strobilus x peuce) x wallichiana	wallichiana x strobilus (P. Schwerinii) x peuce
(strobilus x peuce) x peuce	(wallichiana x strobilus) x (wallichiana x parviflora)
(strobilus x peuce) x monticola	(wallichiana x strobilus) x (wallichiana x strobilus)
(strobilus x peuce) x (peuce x strobilus)	(wallichiana x strobilus) x (wallichiana x strobilus) (P. Schwerinii)
strobilus x (peuce x strobilus)	(wallichiana x strobilus) x pentaphylla
strobilus x (strobilus x parviflora)	(wallichiana x strobilus) x strobilus
wallichiana x albicaulis	wallichiana x strobilus (P. Schwerinii)
wallichiana x ayacahuite (P. Holfordiana) x parviflora	

Приложение 2.

Варианты сред, используемых для инициации соматического эмбриогенеза у представителей рода *Pinus*.

Компоненты среды	Концентрация элемента в среде, мг/л					
1	2	3	4	5	6	7
Макроэлементы	DCR	½ LV	MS	WPM	АИ	SH
NH ₄ NO ₃	400	825	1650	400	-	-
KNO ₃	340	950	1900	-	1060	2500
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170	150	-
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	556	-	-	556	-	-
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	85	11	440	96	-	200
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	975	370	370	570	400
K ₂ SO ₄	-	-	-	990	-	-
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	-	-	-	300
CaCl ₂ безводный	-	-	-	-	158	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	450	-
Микроэлементы						
KI	0.83	4.15	0.83	0.83	1,2	1.0
H ₃ BO ₃	6.2	31	6.2	6.2	8,69	5.0
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	21	22.3	22.3	-	10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	43	8.6	8.6	13,05	0.1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	1.25	0.25	0.25	0,375	0.1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25	0.50	0.025	0.025	0,160	0.2
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.125	0.025	0.025	0,0515	0.1
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	-	-	-	-	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	15

Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3	20
----------------------	------	------	------	------	------	----

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7
MnSO ₄ ×H ₂ O	-	-	-	-	13,60	-
Витамины/аминокислоты						
Тиамин	1.0	0.1	0.1	1.0	1.0	5.0
Пиридоксин	0.5	0.1	0.5	0.5	0,5	0.5
Никотиновая кислота	0.5	0.5	0.5	0.5	0,5	5.0
Миоинозит	200	100	100	100	1000	1000
Глицин	2.0	-	2.0	2.0	-	-
Казеин	500	1000	-	-	1000	1000
Аскорбиновая кислота	300	300		1.0	400	
Глутамин	500	1000		20	500	500
Аденин	-	-	-	20	-	-
Лизин	-	-	-	100	-	-
Сахароза	30000	30000	30000	20000	30000	30000
Регуляторы роста						
2.4-D	2.0 мл			-		
БАП	1.0/0.5			0,5		
Гибберелловая к-та				0,2		
Агар	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

Приложение 3.

Этапы эмбриогенеза и сроки их наступления у *P. sibirica* в окрестностях г. Красноярска по данным наблюдений (2004-2024).

Событие	Описание	Сроки наблюдения
1	2	3
Ценоцитная стадия	Мембрана мегаспоры окружает цитоплазму с многочисленными (до 2000) ядрами	Июль-май
Переход к целлюлярной стадии	Ядра гаметофита располагаются одним слоем по мембранной оболочке мегаспоры, образуют собственные клеточные стенки и формируют женский гаметофит	12-23 мая
Образование архегония	В микропиллярной части мегагаметофита выделяется от одной до четырех инициальных клеток архегония. Центральная клетка формирует оболочку архегония	19-30 мая
Прорастание пыльцевых трубок	Пыльцевые трубки возобновляют рост в толще нуцеллуса, достигают границы мегагаметофита	15-30 мая
Рост женского гаметофита	Первичная шейковая клетка делится. Центральная клетка значительно увеличивается в объеме, ее ядро располагается в непосредственной близости к шейковым клеткам.	25 мая-7 июня
Оплодотворение	Шейковые клетки раздвигаются, и пыльцевая трубка проникает в архегоний	7-15 июня
Зигота	Слияние ядер, образование зиготы, первое митотическое деление	7-15 июня
Свободная ядерная проэмбрио	Второе митотическое деление приводит к формированию четырех ядер, которые мигрируют в халазальный отдел архегония	10-15 июня
Клеточная проэмбрио	В результате формирования клеточных стенок образуется два слоя клеток	12-16 июня
Образование суспензора	Вытягивание нижнего клеточного слоя приводит к формированию суспензора	12-19 июня
Кливаж	Продольное расщепление первичного проэмбрио приводит к формированию четырех отдельных эмбриональных инициалей	13-19 июня
Ранний эмбриогенез	Растяжение клеток суспензора, разрыв оболочки архегония и выход эмбриональной массы в коррозионную полость мегагаметофита	13-19 июня
Кливажная полиэмбриония	В коррозионной полости присутствует 4-16 зародышей, не различающихся своими размерами. Эмбриональная масса занимает ¼ часть коррозионной полости	14-25 июня
Определение доминирующего зародыша	В эмбриональной массе выявляется один более крупный зародыш, глубже остальных продвинутый в коррозионную полость. Эмбриональная масса занимает половину коррозионной полости	18-26 июня

Продолжение таблицы

1	2	3
Начало дифференцировки	У доминантного зародыша формируются примордии семядолей. Доминантный зародыш становится более плотным, различим невооруженным глазом, длина 0,5-0,8 мм. Субординантные зародыши останавливаются в росте, располагаются в микропиллярной зоне мегагаметофита.	22 июня-1 июля
Дифференцировка	Доминирующий зародыш плотный, белого цвета, его продольные размеры превышают поперечные, завершается куполообразной вершиной, сформировано предсемядольное кольцо.	24 июня – 2 июля
Формирование семядолей	Доминирующий зародыш длиной 1,5-2,0 мм, располагается глубоко в коррозионной полости, сформированы семядоли. Субдоминантные глобулярные зародыши располагаются в микропиллярной зоне.	25 июня-10 июля
Дифференцировка зародышевого корешка	Доминирующий зародыш занимает $\frac{1}{2}$ зародышевого канала, развитые семядоли, дифференцируется зародышевый корешок. Снижается число субдоминантных зародышей.	28 июня-12 июля
Семядоли закрывают апекс побега	Дифференцированный зародыш длиной 3,5 – 4,0 мм занимает $\frac{2}{3}$ зародышевого канала. Семядоли удлиняются, апекс побега становится не видимым. Субдоминантные зародыши можно обнаружить не более чем у 25% семян.	1 июля-15 июля
Рост зародыша	Доминантный зародыш полностью дифференцирован, занимает $\frac{3}{4}$ коррозионной полости. Кливажные зародыши в основном отсутствуют.	5 июля-20 июля
Накопление питательных веществ	Длина зародыша 5-6 мм. В зародышах можно обнаружить крахмальные зерна.	10 -31 июля
Созревание зародыша	Зародыш длиной 6 - 7 мм. Субдоминантные зародыши не просматриваются.	15 июля-20 августа
Спелость	В коррозионной полости мегагаметофита присутствует один зародыш длиной 7-8 мм. Начинается опадение зрелых шишек.	20 августа- 10 сентября