

ЛЕСОВОССТАНОВЛЕНИЕ ХВОЙНЫХ С ОДНОЛЕТНИМ И ДВУХЛЕТНИМ РЕПРОДУКТИВНЫМ ЦИКЛОМ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИНОВАЦИОННОЙ ТЕХНОЛОГИИ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

И.Н. Третьякова, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник,
М.Э. Пак, научный сотрудник,
А.В. Лукина, младший научный сотрудник,
Н.С. Помыткин, аспирант,
М.А. Носкова, аспирант,

лаборатория лесной генетики и селекции,
Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук
обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН (ИЛ СО РАН),
г. Красноярск, Россия

Аннотация

Проведено введение в культуру *in vitro* эксплантов *Larix sibirica* и *Pinus sibirica*. Выявлено, что технология получения эмбрионной ткани и соматического эмбриогенеза у данных видов различается. У *Larix sibirica* эмбрионным потенциалом обладают зиготические зародыши на предсемядольной и более поздних стадиях развития, при помещении их на среду АИ с добавлением регуляторов роста 2,4-Д и 6-БАП в концентрации 2:1 мг/л. При этом происходит образование эмбрионально-суспензорной массы, успешное созревание (среда АИ с добавлением АБК) и прорастание соматических зародышей, а также получение клонов деревьев. У *Pinus sibirica* образование эмбрионной ткани происходило при использовании в качестве эксплантов мегагаметофитов с зародышами на кливажной и посткливажной стадии развития, которые помещались на среды DCR и ½LV. Совершенствование протоколов получения соматических зародышей, отбор генетически стабильных клеточных линий является перспективным направлением для создания высокопродуктивных, устойчивым к энтомовамителям лесных насаждений.

Ключевые слова: *Larix sibirica*, *Pinus sibirica*, соматический эмбриогенез, клоны.

REFORESTATION OF CONIFER WITH ONE- AND TWO-YEAR REPRODUCTIVE CYCLES USING INNOVATIVE SOMATIC EMBRYOGENESIS TECHNOLOGY IN *IN VITRO* CULTURE

I.N. Tretyakova, Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Researcher,
M.E. Park, Researcher,
A.V. Lukina, Junior Researcher,
N.S. Pomytkin, Postgraduate Student,
M.A. Noskova, Postgraduate Student,

Sukachev Institute of Forest of the Siberian Branch of the RAS - Division of Federal Research Center «Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the RAS»,
Krasnoyarsk, Russia

Abstract. *Larix sibirica* and *Pinus sibirica* explants were introduced into *in vitro* culture. It was found that the technology for obtaining embryogenic tissue and somatic embryogenesis differs between these species. In *Larix sibirica*, embryogenic potential is exhibited by zygotic embryos at the pre-cotyledonary and later developmental stages when placed on AI medium supplemented with growth regulators 2,4-D and 6-BAP at a concentration ratio of 2:1 mg/L. This leads to the formation of an embryonal-suspensor mass, successful maturation (on AI medium supplemented with ABA), germination of somatic embryos, and generation of clonal trees. In *Pinus sibirica*, embryogenic tissue was formed using megagametophytes containing embryos at the cleavage and post-cleavage stages, cultured on DCR and ½LV media. Improvement of protocols for somatic embryo production and selection of genetically stable cell lines is a promising direction for creating high-yielding forest plantations resistant to insect pests.

Keywords: *Larix sibirica*, *Pinus sibirica*, somatic embryogenesis, clones.

За последние годы произошло резкое снижение репродуктивного потенциала основных лесообразующих хвойных видов в Сибири. Для воспроизводства лесов, наряду с традиционными методами размножения, необходимо использовать и современные технологии. Наиболее перспективной из них является технология соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro*. Соматический эмбриогенез – способ бесполого размножения был применен для селекционно-генетического улучшения клонируемых деревьев (программа Multi-Varietal Forestry, MVF [7]). В настоящее время крупномасштабное производство ряда видов хвойных (*Pinus radiata*, *Pinus taeda*, *Picea abies*) реализуется в лабораториях мирового класса Maritime Innovation Limited в Сассексе, штат Северная Каролина (Канада) в сотрудничестве с Scientist Emeritus, Natural Resources Canada – Canadian Wood Fibre Centre, Fredericton, Sussex New Brunswick, Canada и другими.

Соматический эмбриогенез является ценной экспериментальной системой для изучения регуляторных механизмов, участвующих в развитии растений. Активно проводятся морфофизиологические и молекулярно-генетические исследования соматического эмбриогенеза и регенерации из эмбрионов растений [4,6–10]. Однако, имеются четыре технические проблемы, которые в настоящее время препятствуют масштабированию технологии соматического эмбриогенеза большинства видов хвойных:

- (1) низкая частота возникновения и ограниченные источники эксплантов (генотипы деревьев);
- (2) потеря эмбриогенного потенциала при длительном культивировании;
- (3) низкий уровень созревания и высокая частота аномального развития эмбрионов;
- (4) низкий уровень прорастания соматических зародышей.

В настоящей статье будут показаны особенности соматического эмбриогенеза у видов с однолетним (*Larix sibirica* Ledeb.) и двухлетним (*Pinus sibirica* Du Tour) репродуктивными циклами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов *Larix sibirica* были взяты деревья, произрастающие в Дендрарии Института Леса СО РАН (Красноярск) и в естественном древостое Республики Хакасия (вблизи ОЭП «Черное озеро» ИЛ СО РАН). Возраст деревьев составлял 50–70 лет. Из 200 деревьев лиственницы, экспланты (зиготические зародыши) только четыре дерева–донора формировали эмбрионные культуры. Эти деревья–доноры устойчивы к лиственничной почковой галлице.

У *Pinus sibirica* объектами исследования служили деревья, произрастающие в естественном древостое Западного Саяна и в насаждениях на территории Караульного участкового лесничества СибГУ им. М. Ф. Решетнева (г. Красноярск). Возраст исследованных деревьев – 50–150 лет.

Введение в культуру in vitro

У *Larix sibirica* в качестве эксплантов служили зиготические зародыши на стадии инициации заложения семядолей. Зародыши вводили на агаризированную базовую среду АИ [14]. Уровень регуляторов роста составил: 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) – 2 мг/л (Sigma-Aldrich, США) и 6-бензоаминопурина (6-БАП) – 0,5–1 мг/л (Sigma-Aldrich, США).

Пролиферацию, полученной эмбриональной-суспензорной массы (ЭСМ), проводили на среде АИ, содержащей 2,4-Д (2 мг/л) или НУК (2 мг/л), 6-БАП (0,5–1 мг/л) и сахарозу (20 г/л).

Для созревания соматических зародышей кусочки ЭСМ помещали на среду АИ, содержащую сахарозу (40 г/л), абсцизовую кислоту (АБК) (32 мг/л), индолилмасляную кислоту (ИМК) (0,2 мг/л) и полиэтиленгликоль (ПЭГ 8000) (10%). В качестве желирующего агента использовали Gelrite (4 г/л). Прорастание соматических зародышей проводили на базовой среде АИ, свободной от регуляторов роста.

У *Pinus sibirica* материалом для исследования служили зиготические зародыши и мегагаметофиты. Для введения в культуру использовали питательную среду DCR [3] и ½ LV [8]. В качестве гормонов использовали 2,4-Д в концентрации 2 мг/л и 6БАП – 1 мг/л. Среда дополняли сахарозой (30г/л), глутамином (0,5 г/л), гидролизатом казеина (0,5 г/л), мезоинозитом (0,1 г/л) и аскорбиновой кислотой (300 мг/л). В качестве желирующего компонента использовали агар в концентрации 7 г/л. Перед автоклавированием pH среды доводили до 5,7. После автоклавирования через бактерицидный фильтр добавляли глутамин и аскорбиновую кислоту.

Культивирование осуществляли в темноте, при температуре 24 ± 1 °С. Регистрацию отклика на введение в условия культуры проводили еженедельно.

Цитологический анализ

Для цитологического анализа подготавливали временные препараты с использованием 0,1% раствора сафранина. При наличии изодиаметрических клеток полученную культуру относили к каллусу. Микроскопирование препаратов проводили на микроскопе «МИКРОМЕД-6» ЛОМО, при увеличении $\times 40$, $\times 100$ и $\times 400$. Измерения клеток и эмбриональных структур проводили при помощи системы Scope Photo, с последующим переводом полученных единиц в микрометры. Фотографии препаратов выполняли при помощи встроенной камеры DCM 510 и фотокамеры Olympus FE-370. При наличии в культуре эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ), клеточную линию считали эмбриогенной.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали при помощи пакета программ Microsoft Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСЛЕДОВАНИЯ

Larix sibirica

Инициация эмбриогенной культуры (ЭК) у *Larix sibirica* на среде АИ начинается с поляризации и удлинения соматических клеток, а также локализации ИУК на одном конце удлиненной клетки. Удлиненные клетки ассиметрично делятся с образованием маленькой эмбриональной клетки и удлиненной клетки – клетки трубки. Из эмбриональной клетки формируется глобула соматического зародыша. Из базальных клеток глобулы образуются клетки трубки – суспензор. Глобулярные зародыши всегда имели четкую поляризацию: глобула занимала апикальный конец, суспензор примыкал к базальной части глобулы [11]. Далее, формируется хорошо развитая эмбриогенная ткань – эмбрионально-суспензорная масса, состоящая из глобулярных зародышей и суспензоров. В глобулярных зародышах идет четкое распределение гормонов – ИУК, цитокинины и АБК локализуются в клетках глобулы и полностью отсутствуют в клетках эмбриональных трубок суспензора. Морфологическими маркерами эмбриогенных КЛ является молочный цвет и рыхлая структура (рис. 1а). Активная пролиферация ЭСМ начинается с трехмесячного возраста КЛ и сохраняется до 15 лет и более.

За годы исследования (2008–2024) была создана коллекция, состоящая из 54 пролиферирующих эмбриогенных клеточных линий (КЛ), полученных из эксплантов лиственницы сибирской в результате свободного и контролируемого опыления.

У большинства пролиферирующих КЛ образование глобулярных соматических зародышей активно идет в течение 1–3 лет (32 КЛ из 54 КЛ). Затем интенсивность пролиферации замедлялась и клеточные линии перерождались в обычные каллусные культуры или отмирали. В то же время ряд клеточных линий КЛ4, КЛ6, КЛ5 и КЛ12 активно пролиферировали в течение 15, 11, 9 и 5 лет соответственно. Мультипликация соматических зародышей шла через кливаж.

Пролиферирующие КЛ лиственницы характеризуются высоким гормональным балансом. Данные иммуноферментного анализа ЭСМ показали, что пролиферирующие КЛ содержат большое количество ИУК более низкое содержание цитокининов и АБК [12]. В длительно пролиферирующих КЛ (11–15 лет) повышается уровень ИУК и, особенно АБК, что, вероятно, приводит к снижению регенерационной способности культур.



Рисунок 1. Микроклональное размножение лиственницы сибирской: а – эмбрионные культуры на стадии пролиферации, б – регенеранты, в – 12-ти летние клоны, произрастающие в условиях лесопитомника в экспериментальном хозяйстве “Погорельский бор” Института леса СО РАН

Молекулярно-генетические исследования показали, что молодые пролиферирующие КЛ генетически стабильны до 1 года и кариотип их состоял из диплоидного числа хромосом ($2n=24$). При длительном культивировании (более трех лет) у пролиферирующих КЛ было выявлено изменение числа хромосом ($2n=25$; $2n=26$). Наиболее распространенным типом геномных нарушений в длительно пролиферирующих эмбрионных культурах лиственницы сибирской является анеуплоидия, а именно трисомия по одной или нескольким парам хромосом. Однако у отдельных клеточных линий (КЛ 4 и КЛ 6) в течение 11 лет культивирования остаются генетически стабильными и содержат диплоидное число хромосом [13]. При этом КЛ характеризуется высокой эмбриональной продуктивностью ЭСМ и большим количеством созревших на среде с АБК соматических зародышей. Число зрелых зародышей колебалось от 9 на 1 г ЭСМ (КЛ16.19, самоопыление) до 1221, эмбрионов на 1 г ЭСМ (КЛ4), которые активно прорастали (рис. 1б). Из КЛ6 были получены клоны деревьев, которые в течение 12 лет активно растут в почве лесопитомника (рис. 1в). Клоны

характеризуются быстрым ростом. В возрасте 7 лет у них формировались генеративные органы. Генотипирование по девяти микросателлитным локусам из хвои клонированных деревьев лиственницы показало, что все были полностью идентичны КЛ6 из которой они были получены. Клоны, полученные от этой клеточной линии, оказались гомозиготами с одним аллелем, идентичным материнскому генотипу № А4 [15].

Pinus sibirica

Технология получения соматических зародышей у *Pinus sibirica* значительно отличается от *Larix sibirica*, а также других видов с однолетним генеративным циклом *Picea abies* [2], *Abies cephalonica* [5]. Во-первых, культивирование видов с однолетним циклом происходит на других средах. Так, *Pinus sibirica* нуждается в более бедных по составу микро- и макроэлементами средах – DCR и ½ LV. Во-вторых, у *Pinus sibirica* при введении в культуру *in vitro* зиготических зародышей на стадии инициации семядолей на среде DCR и LV происходило, как правило, формирование каллусных культур. Образование эмбриогенной ткани наблюдалось только при введении в культуру мегагаметофитов с зародышами на ранних стадиях развития. Максимальный уровень инициации (до 10,2%) был получен от эксплантов, собранных через две недели после оплодотворения, когда зиготические зародыши находились на посткливжной стадии развития. Инициация соматического эмбриогенеза начиналась через 2-4 недели, после введения эксплантов в условия *in vitro* и происходила путем экстружии – выдавливания клеточных масс из микропиллярного отверстия мегагаметофита. Полученные в результате экстружии клеточные линии представляли собой эмбрионально-суспензорную массу (рис. 2а,б,в). Продолжительность периода компетентности к образованию ЭСМ составляет 7–10 дней, в течение которых в эксплантах происходит дифференцировка лидирующего зародыша.

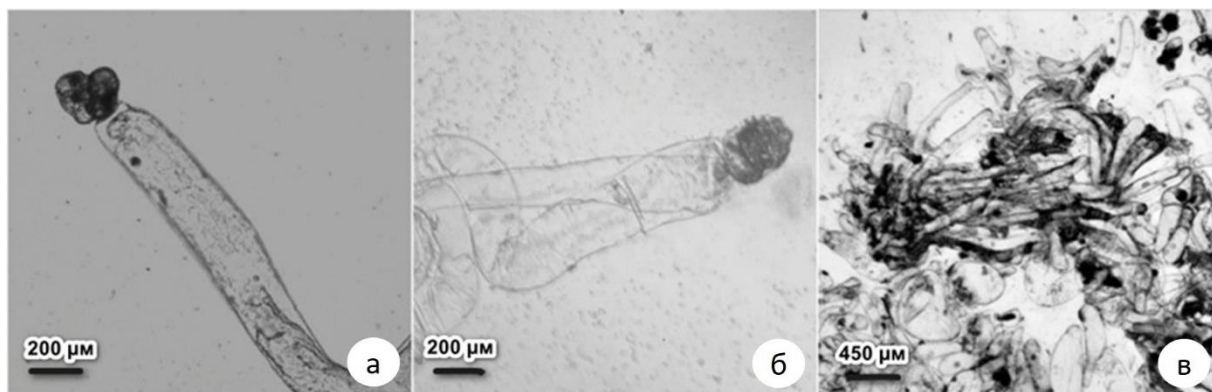


Рисунок 2. Инициация соматического эмбриогенеза у *P. sibirica*. Временные препараты:
а, б – зародышеподобные структуры, состоящие из округлых клеток (глобул соматического зародыша) и вытянутых (суспензора); в – общий вид эмбрионально-суспензорной массы

Инициация соматического эмбриогенеза из мегагаметофитов с незрелыми зародышами ла описана у многих видов рода *Pinus* [1]. Ряд видов (*P. hanksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, *P. sylvestris*) были отнесены к неподатливым «recalcitrance» к соматическому эмбриогенезу. У видов, относящихся к «recalcitrance» при введении в культуру *in vitro* мегагаметофитов с зародышами на стадии раннего эмбриогенеза удалось иницировать соматический эмбриогенез [7]. К таким непокорным видам относится и *Pinus sibirica*. Необходимо отметить особенности эмбриогенеза видов рода *Pinus*. Прежде всего, представители данного рода характеризуются двухлетним репродуктивным циклом и наличием кливажа в раннем эмбриогенезе. По-видимому, при введении в культуру у эксплантов на стадии кливажа *P. sibirica* сохраняется «кливажная память», происходит активное расщепление образовавшихся

соматических зародышей, и наблюдается экструзия эмбрионально-супензорной массы через микропилярную часть мегагаметофита.

Заключение

Эмбриогенная компетентность эксплантов при вводе их в культуру *in vitro* у хвойных с однолетним и двухлетним репродуктивным циклом отличается. У *Larix sibirica* эмбриогенным потенциалом обладают зиготические зародыши на предсемядольной и более поздних стадиях развития. У *Pinus sibirica* образование эмбрионально-супензорной массы происходит из кливажных зародышей, находящихся в мегагаметофитах. Эмбриогенная компетентность ограничена очень небольшим промежутком времени (около 7 дней).

Таким образом, совершенствование протоколов получения соматических зародышей, отбор генетически стабильных клеточных линий лиственницы является перспективным направлением для создания высокопродуктивных, устойчивым к энтомовам вредителям лесных насаждений.

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

Список литературы

1. Bonga, J.M., Klimaszewska, K.K., von Aderkas, P. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2010. Vol. 100. P. 241–254.
2. Filonova, L.H., Bozhkov, P.V., von Arnold, S. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking // Journal of Experimental Botany. 2000. Vol. 51. P. 249–264.
3. Gupta, P.K., Durzan, D.J. Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*) // Plant Cell Reports. 1985. Vol. 4, № 4. P. 177–179.
4. Klimaszewska, K., Hargreaves, C., Lelu-Walter, M.A., Trontin, J.F. Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000 // In: *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants* / Eds. M. Germana, M. Lambardi. New York: Springer, 2016. P. 131–161. (Methods in Molecular Biology; vol. 1359).
5. Krajňáková, J., Sutela, S., Aronen, T., Gömöry, D., Vianello, A., Häggman, H. Long-term cryopreservation of Greek fir embryogenic cell lines: recovery, maturation and genetic fidelity // Cryobiology. 2011. Vol. 63. P. 17–25.
6. Lelu-Walter, M.A., Pâques, L.E. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix × eurolepis* and *Larix × marschlinsii*): perspectives for breeding // Annals of Forest Science. 2009. Vol. 66. Article 104. DOI: 10.1051/forest/2008074.
7. Park, Y.S., Beaulieu, J., Bousquet, J. Multi-varietal forestry integrating genomic selection and somatic embryogenesis // In: *Vegetative Propagation of Forest Trees* / Eds. Y.S. Park, J.M. Bonga, H.K. Moon. Suwon: National Institute of Forest Science, 2016. P. 302–322.
8. Park, Y.S., Lelu-Walter, M.A., Harvengt, L., Trontin, J.F., Klimaszewska, K., Bonga, J.M. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster* and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2006. Vol. 86. P. 87–101.
9. Peng, C., Gao, F., Wang, H., Shen, H., Yang, L. Physiological and biochemical traits in Korean pine somatic embryogenesis // Forests. 2020. Vol. 11. Article 577. DOI: 10.3390/f11050577.
10. Pullman, G.S. Embryogenic tissue initiation in Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) // In: Jain, S.M., Gupta, P. (Eds.) *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*. Vol. 1. Cham: Springer, 2018. P. 13–31.

11. Tretyakova, I.N., Park, M.E. Collectible cell lines of *Larix sibirica* obtained by somatic embryogenesis and their ability to regenerate // Forests. 2023. Vol. 14, № 9. Article 1920. DOI: 10.3390/f14091920.
12. Tretyakova, I. N., Shuklina, A. S., Park, M. E., Yang, L., Akhiyarova, G. R., Kudoyarova, G. R. The role of phytohormones in the induction of somatic embryogenesis in *Pinus sibirica* and *Larix sibirica* // Cytologia. 2021. Vol. 86. № 1. P. 55-60.
13. Пак, М.Э., Горячкина, О.В., Третьякова, И.Н., Муратова, Е.Н. Цитогенетическая характеристика разновозрастных эмбриогенных клеточных линий, полученных через соматический эмбриогенез у *Larix sibirica* Ledeb. // Сибирский экологический журнал. 2023. Т. 30. № 5. С. 715–723.
14. Третьякова, И. Н. Способ микрклонального размножения лиственницы сибирской в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез на среде АИ для плантационного лесовыращивания / Пат. РФ RU 2456344 С2. М.: Федеральная служба по интеллектуальной собственности, 2012. URL: <http://www.freepatent.ru/images/patents/5/2456344/patent-2456344.pdf>
15. Третьякова, И.Н., Пак, М.Э., Орешкова, Н.В., Падутов, В.Е. Регенерационная способность клеточных линий лиственницы сибирской в культуре *in vitro* // Биология растения. 2022. Т. 49, № 6. С. 585–596.

References

1. Bonga, J.M., Klimaszewska, K.K., von Aderkas, P. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2010. Vol. 100. P. 241–254.
2. Filonova, L.H., Bozhkov, P.V., von Arnold, S. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking // Journal of Experimental Botany. 2000. Vol. 51. P. 249–264.
3. Gupta, P.K., Durzan, D.J. Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*) // Plant Cell Reports. 1985. Vol. 4, № 4. P. 177–179.
4. Klimaszewska, K., Hargreaves, C., Lelu-Walter, M.A., Trontin, J.F. Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000 // In: *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants* / Eds. M. Germana, M. Lambardi. New York: Springer, 2016. P. 131–161. (Methods in Molecular Biology; vol. 1359).
5. Krajňáková, J., Sutela, S., Aronen, T., Gömöry, D., Vianello, A., Häggman, H. Long-term cryopreservation of Greek fir embryogenic cell lines: recovery, maturation and genetic fidelity // Cryobiology. 2011. Vol. 63. P. 17–25.
6. Lelu-Walter, M.A., Pâques, L.E. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix* × *eurolepis* and *Larix* × *marschlinsii*): perspectives for breeding // Annals of Forest Science. 2009. Vol. 66. Article 104. DOI: 10.1051/forest/2008074.
7. Park, Y.S., Beaulieu, J., Bousquet, J. Multi-varietal forestry integrating genomic selection and somatic embryogenesis // In: *Vegetative Propagation of Forest Trees* / Eds. Y.S. Park, J.M. Bonga, H.K. Moon. Suwon: National Institute of Forest Science, 2016. P. 302–322.
8. Park, Y.S., Lelu-Walter, M.A., Harvengt, L., Trontin, J.F., Klimaszewska, K., Bonga, J.M. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster* and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2006. Vol. 86. P. 87–101.
9. Peng, C., Gao, F., Wang, H., Shen, H., Yang, L. Physiological and biochemical traits in Korean pine somatic embryogenesis // Forests. 2020. Vol. 11. Article 577. DOI: 10.3390/f11050577.
10. Pullman, G.S. Embryogenic tissue initiation in Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) // In: Jain, S.M., Gupta, P. (Eds.) *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*. Vol. 1. Cham: Springer, 2018. P. 13–31.

11. Tretyakova, I.N., Park, M.E. Collectible cell lines of *Larix sibirica* obtained by somatic embryogenesis and their ability to regenerate // *Forests*. 2023. Vol. 14, № 9. Article 1920. DOI: 10.3390/f14091920.
12. Tretyakova, I. N., Shuklina, A. S., Park, M. E., Yang, L., Akhiyarova, G. R., Kudoyarova, G. R. The role of phytohormones in the induction of somatic embryogenesis in *Pinus sibirica* and *Larix sibirica* // *Cytologia*. 2021. Vol. 86. № 1. P. 55-60.
13. Park, M.E., Goryachkina, O. V., Tretyakova, I. N., Muratova, E. N. Cytogenetic characteristics of embryogenic cell lines of different ages obtained by somatic embryogenesis in *Larix sibirica* Ledeb // *Contemporary Problems of Ecology*. 2023. Vol. 16. №. 5. P. 665–671.
14. Tretyakova, I.N. Method of microclonal propagation of Siberian larch in *in vitro* culture via somatic embryogenesis for plantation growing: patent RU 2456344 C2. 2012. (In Russ.). URL: <http://www.freepatent.ru/images/patents/5/2456344/patent-2456344.pdf>
15. Tretyakova, I.N., Park, M.E., Oreshkova, N.V., Padutov, V.E. The regenerative capacity of Siberian larch cell lines *in vitro* // *Biology Bulletin*. 2022. Vol. 49, № 6. P. 609–619. DOI: 10.1134/S1062359022050193