

УДК 630\*165+630\*181.5:58.085

## РАЗМНОЖЕНИЕ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕХНОЛОГИИ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА<sup>1</sup>

© 2023 г. И. Н. Третьякова<sup>а</sup>, \*, \*\*, М. Э. Пак<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Академгородок, д. 50/28, Красноярск, 660036 Россия

\*E-mail: culture@ksc.krasn.ru

\*\*E-mail: mtavi@bk.ru

Поступила в редакцию 15.06.2022 г.

После доработки 07.10.2022 г.

Принята к публикации 21.02.2023 г.

Биотехнология соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* в сочетании с геномной селекцией и криоконсервацией применяется для создания сортовых генетически тестированных быстрорастущих плантаций (программа Multi-Varietal Forestry MVF, Park, 2014, 2016, 2018). В институте леса им. Сукачева СО РАН в 2008 г. впервые была разработана биотехнология соматического эмбриогенеза для лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и получены 42 пролиферирующие клеточные линии, состоящие из эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ). Возраст клеточных линий достигает 13 лет. Между клеточными линиями наблюдалась значительная изменчивость по числу и размеру глобулярных зародышей в пролиферирующих эмбрионных культурах, способности соматических зародышей созревать и прорасти. У разных клеточных линий на 1 г ЭСМ число глобулярных соматических зародышей колеблется от 2040 до 1103, созревает от 10 до 1220 зародышей. Регенеранты прорастают в ростовой камере, и клоны отдельных клеточных линий успешно растут в теплице и далее в почве лесопитомника на стационаре “Погорельский бор” ИЛ СО РАН. Генотипирование клонов по микросателлитным локусам показало полную их генетическую идентичность клеточной линии, из которой они были получены. У клонированных деревьев лиственницы сибирской в семилетнем возрасте произошла закладка генеративных органов. Таким образом, в настоящее время возможно оперативное внедрение программы MVF для плантационного лесовыращивания в России.

*Ключевые слова:* соматический эмбриогенез, клоны, лиственница, сортовое плантационное лесовыращивание.

DOI: 10.31857/S002411482305011X, EDN: MXZMJS

В коммерческом лесоразведении за рубежом в начале XXI в. было создано новое перспективное направление – сортовое плантационное лесовыращивание на основе программы Multi-Varietal Forestry (MVF) (Park, 2014). Эта программа основана на применении биотехнологии соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro*. Соматический эмбриогенез (СЭ) – это перепрограммирование развития вегетативных клеток в направлении пути эмбриогенеза, который является уникальным феноменом в развитии голосеменных растений. Этот процесс является наглядным примером тотипотентности растительных клеток и может быть проконтролирован в лабораторных условиях. В основе методов лежит уникальная способность растительных клеток реализовывать при определенных условиях имеющуюся у них генетическую информацию и давать неограниченное количе-

ство высокопродуктивных, устойчивых к патогенам клонированных семян. Применение данной технологии в сочетании с криоконсервацией создает базу для получения хозяйственно ценных генетически тестированных клонов и элитных генотипов, а также позволяет сохранить генетические ресурсы видов хвойных на долгие годы (Klimaszewska, Cyr, 2002; Lelu-Walter et al., 2008; Lelu-Walter, Pâques, 2009; Taniguchi et al., 2020; Peng et al., 2021).

За последние десятилетия, наряду с методами соматического эмбриогенеза и криоконсервации, успешно используется технология геномной селекции (Park et al., 2016; Ding et al., 2018; Lebedev et al., 2020). Данная технология на основе совокупности картирования локусов количественных признаков позволяет прогнозировать фенотип отдельного индивида (Goddard, Hayes, 2007). Таким образом, геномная селекция позволяет идентифицировать элитные генотипы на очень ранней стадии развития без фенотипирования через по-

<sup>1</sup> Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-20008 (<https://rscf.ru/project/22-14-20008/>) и Красноярского краевого фонда науки.

левые испытания и тем самым значительно сократить сроки сортоиспытания в рамках программ лесоразведения (Park et al., 2016; Wu, 2019; Lebedev et al., 2020). Применение биотехнологии соматического эмбриогенеза позволит получить массовый выход клонов растений с желаемыми селекционными признаками – высокопродуктивных, устойчивых к абиотическим и биотическим стрессам, в том числе к патогенам и вредителям.

Производители посадочного материала хвойных растений, работающие по биотехнологии соматического эмбриогенеза, представлены только зарубежными компаниями (Ding et al., 2018; Park et al., 2018). Пионером в области выращивания хвойных деревьев, интегрировавшим в начале 1990-х гг. соматический эмбриогенез в свою программу селекции ели – ели сизой (*Picea glauca* [Moench] Voss) и ели европейской (*Picea abies* (L.) H. Karst.) и разработавшим стратегию MVF, является компания JD Irving Limited (JDI) в Сассексе (Канада, штат Северная Каролина) в сотрудничестве с Канадским центром древесного волокна – подразделением Министерства природных ресурсов Канады. Лаборатория мирового класса Maritime Innovation Limited (подразделение JDI) производит в год порядка 600 тысяч сортовых деревьев посредством СЭ для использования в MVF (Park et al., 2018).

В 2011 году португальская компания KLÓN (Innovative Technologies from Cloning) в ответ на современные экономические вызовы, а также из-за необходимости поддержания биоразнообразия запустила исследовательский проект, направленный на восстановление, улучшение и сохранение элитных генотипов тропической сосны (*Pinus tropicalis*), отобранных по признакам быстрого роста и продуктивности. При этом для сельскохозяйственного сектора были разработаны методики микроразмножения для клонирования генотипов плодовых видов сливы (*Prunus* spp.), маслины (*Olea* spp.), фисташки (*Pistacia* spp.) и ореха (*Juglans* spp.), отобранных по их признакам устойчивости/толерантности к биотическим и/или абиотическим факторам (Pereira et al., 2018).

В том же 2011 г. на базе Института природных ресурсов Финляндии (LUKE) в сотрудничестве с Агентством безопасности продовольствия Evira был запущен проект по внедрению биотехнологии соматического эмбриогенеза ели европейской. Первая партия материала СЭ была зарегистрирована в качестве материала для лесовосстановления в 2017 г. и разрешена к промышленному производству (Aronen et al., 2018).

Холдинговая компания SweTree Technologies (Швеция) занимается селекцией, биотехнологиями размножения через соматический эмбриогенез и клонированием тополей элитных сортов (Hertzberg, 2011).

Компания ArborGen Inc., сотрудничающая со Scion, базируется в США, Австралии, Бразилии и Новой Зеландии. Эта компания имеет 14 коммерческих питомников, выращивающих усовершенствованные с помощью передовых технологий генетически тестированные саженцы деревьев с улучшенными темпами роста, урожайностью, стрессоустойчивостью, устойчивостью к болезням и качественной древесиной сосны ладанной (*Pinus taeda*), сосны лучистой (*Pinus radiata*) и лиственных видов (Ding et al., 2018; Merkle, 2018).

Компания Forest Genetics Ltd, используя биотехнологию соматического эмбриогенеза, поставляет лучшие сорта высокого генетического качества сосны лучистой для лесных плантаций Новой Зеландии и Австралии. Forest Genetics Ltd и ArborGen New Zealand ежегодно производят около 50000 соматических саженцев сосны лучистой (Bonga, 2015). Деревья обладают высокими показателями роста, качества древесины и устойчивости к болезням. Образцы тканей тестируемых сортов криоконсервируют (жидкий азот).

Способы микрклонального размножения отдельных видов хвойных через соматический эмбриогенез начали широко использоваться в других странах мира, в первую очередь во Франции, Германии, Великобритании, Ирландии, странах Латинской Америки и Скандинавии, Китае (Klimaszewska et al., 2016).

В России в начале XXI в. в Институте леса им. В.Н. Сукачева СО РАН были начаты экспериментальные работы по культивированию хвойных в культуре *in vitro*. В 2008 г. впервые были получены эмбриогенные культуры лиственницы сибирской, которые стабильно продуцировали соматические зародыши (Tretyakova, Barsukova, 2012). В настоящее время коллекция Института леса включает 42 длительно пролиферирующие эмбриогенные клеточные линии лиственницы сибирской, которые в течение тринадцати лет массово продуцируют соматические зародыши (до 11 103 глобулярных зародышей на 1 г сырого веса эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ)) (Tretyakova, Park, 2018), 4 клеточных линии сосны стланиковой (*Pinus pumila*) (Tretyakova, Shuvaev, 2018), 3 клеточных линии ели сибирской (Tretyakova et al., 2021). Изучено влияние пептидов растительного происхождения и грибов рода *Trichoderma* на инициацию и рост эмбриогенных культур (Tretyakova et al., 2018, 2020).

В данной статье приводятся результаты исследований, выполненных по технологии соматического эмбриогенеза лиственницы сибирской в Институте леса с 2008 по 2022 г. Рассматривается возможность использования разработанной технологии для плантационного выращивания лиственных лесов в России.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКА

В качестве объектов были взяты деревья лиственницы сибирской, произрастающие в дендрарии Института Леса СО РАН (Красноярск, 55°59'09" N 92°45'53" E) и естественном древостое Республики Хакасии (вблизи ОЭП “Черное озеро” ИЛ СО РАН, 54°68'67" N, 89°42'78" E). Коллекция пролиферирующих эмбриогенных культур (ЭК) лиственницы сибирской состоит из 42 клеточных линий (КЛ), полученных нами в разные годы (2008–2019) от трех генотипов №№ А4, 10 и 1(35) в результате свободного и контролируемого опыления. Деревья-доноры №№ А4 и 1(35) не имели внешних признаков повреждения (галлов) их лиственничной почковой галлицей (Третьякова и др., 2006; Tretiakova, 2013).

### *Индукция эмбрионально-суспензорной массы*

Для инициации соматического эмбриогенеза из зиготических зародышей лиственницы сибирской использована базовая среда АИ (патент РФ № 2456344, Третьякова, 2012). Среда дополняла мезоинозитом – 100 мг/л (Sigma-Aldrich, США), гидролизатом казеина – 1000 мг/л (Sigma-Aldrich, США), сахарозой 30 г/л (ЗАО “Омскреактив”, Россия) и агаром – 7 г/л (Sigma-Aldrich, США). Уровень регуляторов роста составил: 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) – 2 мг/л (Sigma-Aldrich, США) и 6-бензоаминопурин (6-БАП) – 0,5–1 мг/л (Sigma-Aldrich, США). Полученные культуры субкультивировали на свежие питательные среды для пролиферации через 30 суток.

### *Пролиферация эмбрионально-суспензорной массы*

Для пролиферации ЭСМ была применена базовая среда АИ (рН 5,8 до автоклавирования), содержащая 2,4-Д (2 мг/л), 6-БАП (0,5 мг/л) и сахарозу (20 г/л). Режим автоклавирования питательных сред: 121°C в течение 20 мин (Gupta, Durzan, 1985; MacKay et al., 2006; Gamborg, Phillips, 1995). В охлажденные питательные среды после автоклавирования добавляли L-глутамин в концентрации 300–500 мг/л (Sigma-Aldrich, США) и в качестве антиоксиданта аскорбиновую кислоту – 300–400 мг/л (Sigma-Aldrich, США) методом холодной стерилизации с использованием бактериальных фильтров (ТРР, Швейцария, размер пор 0,22 мкм). Условия культивирования: темнота, температура 24 ± 1°C. Субкультивирование на свежие питательные среды осуществляли каждые 14 сут.

### *Созревание соматических зародышей*

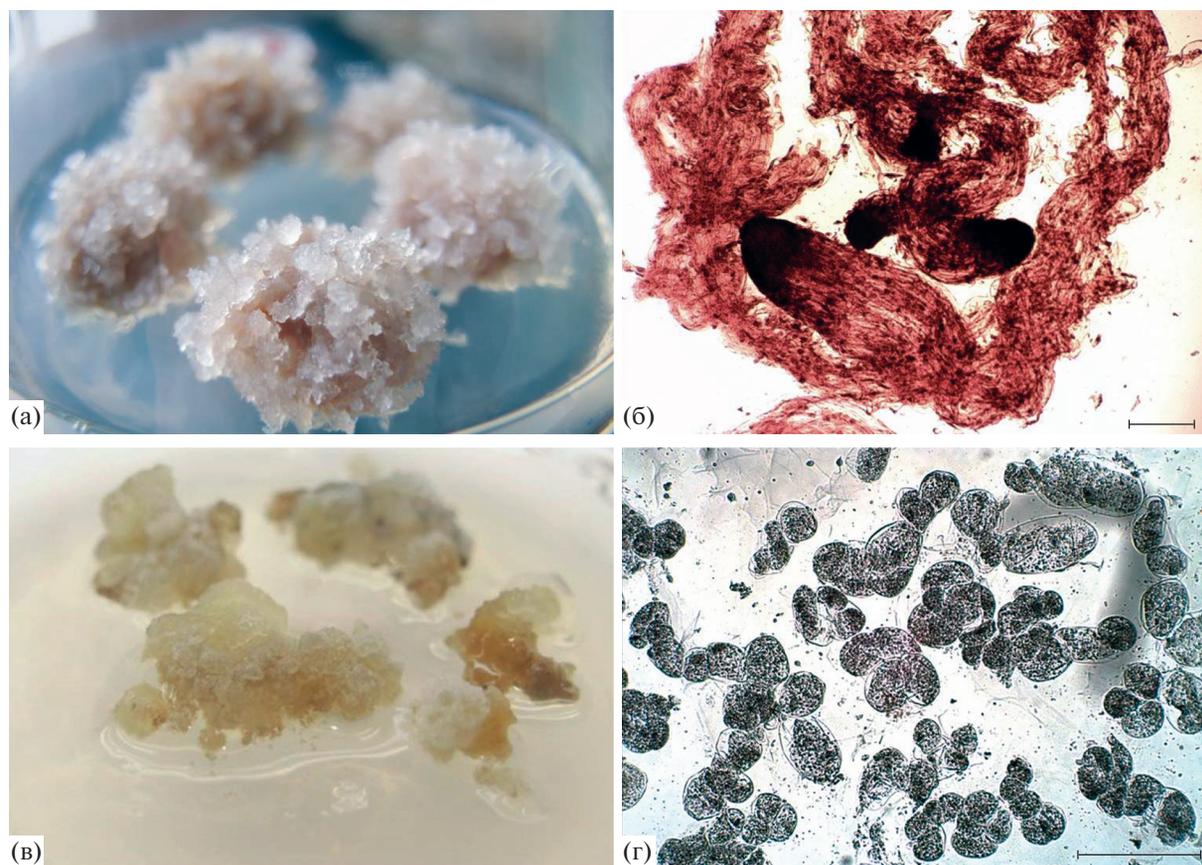
Эксперименты по созреванию соматических зародышей проводили на клеточных линиях, полученных от материнского дерева № А4, произ-

растающего в дендрарии Института леса. Дифференцировка и созревание соматических зародышей происходит в два этапа. Для предсозревания соматических зародышей ЭСМ субкультивировали на питательную среду АИ без гормонов, дополненную мезоинозитом – 100 мг/л, сахарозой – 30 г/л, активированным углем 10 г/л. Далее для созревания соматических зародышей кусочки ЭСМ переносили 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). В охлажденную питательную среду после автоклавирования добавляли регуляторы роста (АБК и ИМК), а также L-глутамин (500 мг/л) и аскорбиновую кислоту (400 мг/л) методом холодной стерилизации с использованием бактериальных фильтров (ТРР, Швейцария, размер пор 0,22 мкм). Культивирование на этапах предсозревания и созревания осуществляли в темноте при температуре 24 ± 1°C.

### *Проращивание и адаптация регенерантов*

Созревшие соматические зародыши для проращивания переносили на базовую среду ½АИ, дополненную активированным углем (2 г/л), свободную от растительных регуляторов роста, в которой в 2 раза снижали концентрацию микро-, макроэлементов и железа, исключали источники органического азота и витаминов, а также уменьшали содержание сахарозы до 10 г/л. Содержание желирующего агента Gellan gum (Sigma-Aldrich, США) – 4 г/л. Проращивание происходило при низкой световой интенсивности (20 mmol m<sup>-2</sup> з-1) и при температуре 24 ± 1°C в течение 5–8 недель до достижения корнем длины 1–2 см. Затем регенеранты переносили в стерильные почвенные условия: песок/торф/вермикулит (1/1/1). При укоренении регенерантов для полива использовали минеральную базу среды АИ (макро- и микроэлементы), разбавленную вчетверо. Адаптацию к условиям пониженной влажности и нестерильным условиям проводили в условиях климатокamеры, приоткрывая сосуды, увеличивая постепенно время. Адаптированные растения-регенеранты высаживали в условия теплицы экспериментального хозяйства “Погорельский бор” Института леса СО РАН. Ежегодно по окончании вегетации проводили измерения высоты клонов.

Анализ иммуногистохимической локализации гормонов в клетках и количественного содержания эндогенных гормонов подробно описаны нами в статьях Tretiakova et al., 2019, 2021. Микросателлитный анализ эмбриогенных культур по девяти локусам изложен в статье Tretiakova et al., 2016, цитогенетический анализ – в статье Goryachkina et al., 2018.



**Рис. 1.** Клеточные культуры лиственницы сибирской: (а) эмбрионально-суспензорная масса; (б) глобулярные соматические зародыши; (в) неэмбриогенный каллус, (г) гистология неэмбриогенного каллуса.

### Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием стандартных методик (Сиделев, 2012) с помощью Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и Statistica 6.0 (Tulsa Scientific, США). Для каждого среднего арифметического значения определяли стандартную ошибку ( $\pm mM$ ) на уровне значимости 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Биотехнология соматического эмбриогенеза

Биотехнология в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез хвойных включает пять этапов развития: инициацию, пролиферацию, созревание, прорастание и стадии тепличной культуры с различной степенью успеха на каждом этапе.

Первым признаком инициации эмбриогенной культуры (ЭК) у лиственницы является удлинение, поляризация и неравномерное деление соматических клеток, а также локализация ИУК на одном конце удлиненной клетки. Далее формируется хорошо развитая эмбриогенная ткань, представленная ЭСМ, в которой идет активное образование глобулярных соматических зароды-

шей через кливаж, почкообразование суспензора и расщепление клеток суспензора (Tretyakova, Park, 2018). В противоположность ЭК (рис. 1а, 1б), неэмбриогенные каллусы (НЭК) состоят из изодиаметрических, активно делящихся клеток (рис. 1в, 1г).

Исследования регенерационной способности клеточных линий лиственницы сибирской показали значительную вариабельность по реализации их репродуктивного потенциала. Ранее нами было отмечено (Tretyakova et al., 2016), что между клеточными линиями наблюдалась значительная изменчивость по числу и размеру глобулярных зародышей в пролиферирующих эмбриогенных культурах, способности соматических зародышей созревать и прорасти. У пролиферирующих эмбриогенных культур число глобулярных соматических зародышей колебалось от 2180 до 11 103 на 1 г сырого веса ЭСМ, размеры глобул зародыша от 90 мкм до 282 мкм у разных клеточных линий (Tretyakova et al., 2016).

Созревание и прорастание соматических зародышей происходило у отдельных эмбриогенных клеточных линий (табл. 1). В этих линиях развивались крупные глобулярные зародыши, которые были стабильными по продуктивности ЭСМ,

**Таблица 1.** Продуктивность эмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской, полученных от дерева-донора А4

Клеточная линия	Год получения	Число зрелых соматических зародышей на 1 г сырого веса ЭСМ, шт
КЛ4	2009	1221 ± 138 <sup>в</sup>
КЛ5	2009	0 <sup>а</sup>
КЛ6	2011	13 ± 3 <sup>б</sup>
КЛ107	2013	10 ± 2 <sup>б</sup>
КЛ12	2015	120 ± 12 <sup>г</sup>
КЛ16.28	2016	Единичные зародыши
КЛ17.7	2017	110 ± 55 <sup>г</sup>
КЛ18.3	2018	Единичные зародыши

\* Описание клеточных линий приведено в статье Третьяковой и др., 2016.

\*\* Средние значения в столбце, отмеченные разными буквами, достоверно различаются при  $p < 0.05$ .

плоидности, имели слабую изменчивость по микросателлитным локусам (Tret'yakova et al., 2016). На стадии созревания зародыши завершали эмбриогенез и далее прорастали.

Приготовление лабораторного образца растенной-регенерантов лиственницы сибирской из ЭСМ, готовых для высадки в теплицу, занимает 4–9 мес.: 1 этап – инициация эмбрионных каллусов продолжается 30–45 сут (среда АИ с 2.4-Д и 6-БАП); 2 – этап пролиферации идет от 1–2 мес., у отдельных клеточных линий способность к пролиферации сохраняется уже 14 и более лет при регулярном субкультивировании (среда АИ с 2.4-Д и 6-БАП) (рис. 1а); 3 этап – созревание соматических зародышей в течение 20–60 дней (среда АИ с АБК и ИМК) (рис. 2а), 4 этап – прорастание соматических зародышей занимает 5–8 недель (среда ½АИ без гормонов и витаминов) (рис. 2б), 5 этап – адаптация проростков в стерильной почве в условиях ростовой камеры в течение 3 мес. (рис. 2в, 2г).

Растения-регенеранты, растущие в горшочках и достигшие высоты 2–3 см, имеющие хорошо развитый корень и семядоли, готовы для высадки в теплицу. В теплице клоны выдерживают 1 год, подвергают регулярному уходу (полив и борьба с сорняками), после чего высаживают в почву лесопитомника (рис. 2д).

Трехлетние клоны были высажены в почву лесопитомника э/х “Погорельский бор” (Красноярский край). Генотипирование по девяти микросателлитным локусам дерева-донора, КЛ6 и пятнадцати клонированных деревьев показало, что только два локуса bcLK235 и UAKL1y6 были гетерозиготными у материнского дерева № А4, в то время как КЛ6 и клоны, полученные от этой кле-

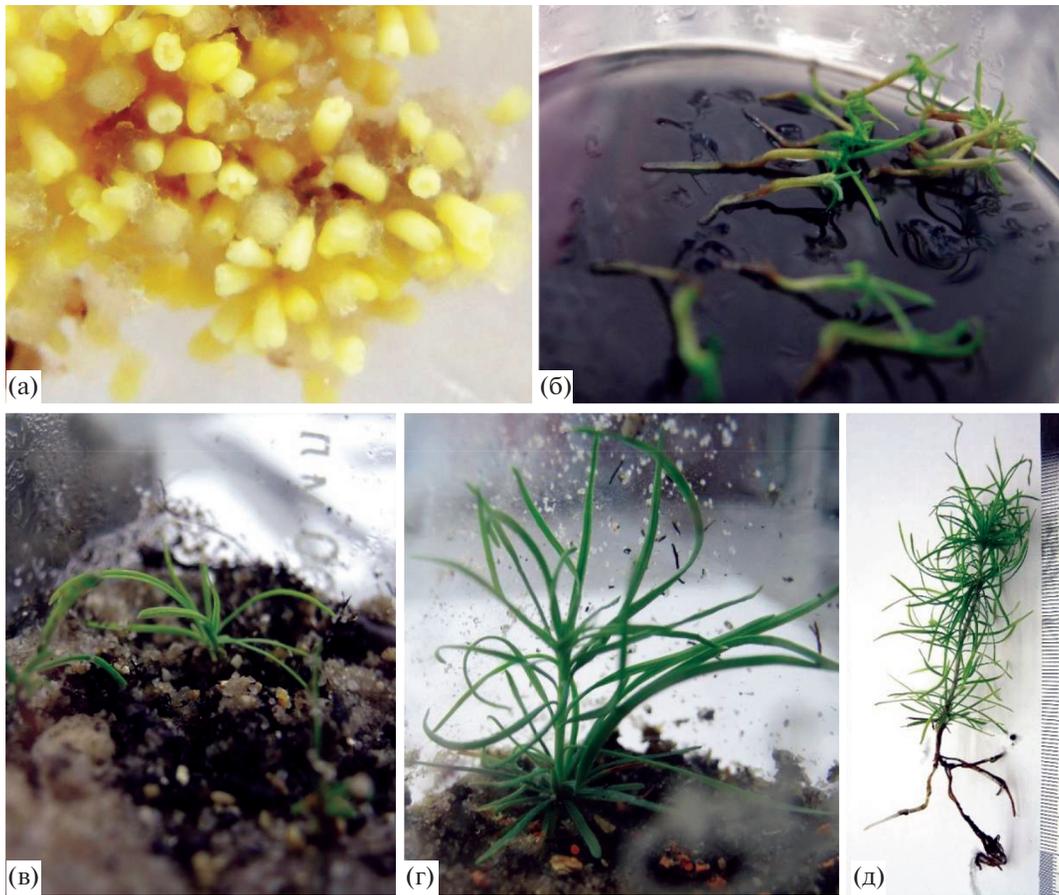
точной линии, оказались гомозиготами с одним аллелем, идентичным материнскому генотипу. По локусам bcLK056, bcLK066, bcLK224, bcLK232, bcLK260, UBCLXtet\_1-22 у клонов и КЛ6 наблюдалась полная идентичность генотипу дерева-донора № А4 (Третьякова и др., 2022). При этом клоны полностью идентичны КЛ6, из которой они были получены. Клоны лиственницы сибирской характеризуются интенсивным ростом, высота семилетних клонов достигла 200 ± 16 см (рис. 3, 4а). Показатели их роста превышали в 1.4 раза деревья, полученные из семян (рис. 3). Деревья не имели внешних признаков повреждения лиственничной почковой галлицей. В семилетнем возрасте у клонированных деревьев появились генеративные органы (микро- и мегастробилы) (рис. 4б, 4в), которые развились в последующий весенне-летний период (рис. 4г). В восьмилетнем возрасте клоны сформировали семена (рис. 4д).

Продуктивность применяемой биотехнологии:

- эксплант – кусочек растительной ткани размером 2–4 мм;
- вес эмбрионной культуры (ЭСМ) за 1 год – 550–3300 г;
- число глобулярных зародышей в 1 г эмбрионной культуры – 2040–11103 шт.;
- число зрелых зародышей до 1220 шт. на 1 г эмбрионной культуры у высокопродуктивной КЛ.

Таким образом, нами впервые были получены клонированные деревья лиственницы сибирской на основании применения биотехнологии соматического эмбриогенеза.

Можно представить, что при создании плантационного лесовыращивания через программу MVF может возникнуть проблема с биоразнообразием, т.к. возникает узкая генетическая изменчивость. Последняя может привести к большей уязвимости растений, к болезням и повреждению насекомыми, чем плантаций, полученных с помощью семян. Однако программа MVF имеет ряд преимуществ, т.к. она включает сорта, устойчивые к болезням и вредителям с одновременным улучшением хозяйственных признаков. По мнению Пак (Park et al., 2014), чем больше деревьев (семей) участвует в программе MVF, тем ниже риск, который может привести к дисбалансировке генетического разнообразия. Ученые в целом сходятся во мнении, что 10–20 сортовых деревьев достаточно для защиты биоразнообразия, чтобы обеспечить преимущества MVF (Libby, 1982; Hühn, 1987; Zobel, 1993; Namroud, et al., 2012). Такой порог гарантирует сохранение аллелей с популяционной частотой 10% и более, которые отвечают за большую часть генетической дисперсии количественных признаков. Линдгрэн (Lindgren, 1993) считает: (1) если вид применяется для короткой ротации, то может быть использовано



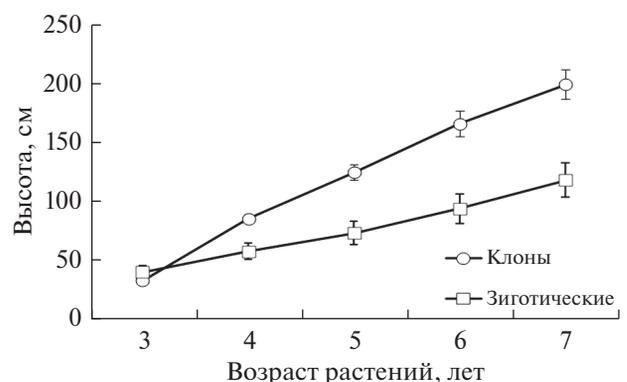
**Рис. 2.** Приготовление лабораторного образца растений-регенерантов лиственницы сибирской: (а) созревание соматических зародышей; (б) регенерация на среде  $\frac{1}{2}$ АИ; (в, г) адаптация проростков в стерильной почве; (д) клон до переноса в почву лесопитомника.

меньшее число сортов, поскольку потенциальный риск невелик; (2) меньшее число генотипов приемлемо, если управление плантациями включает борьбу с вредителями; (3) чем более известен “сорт”, тем более приемлемо его широкое использование. Посадка сортов может осуществляться сортовыми блоками или случайными смесями, несмотря на то, что они также могут быть применены в смешанных схемах плантации (Lindgren, 1993).

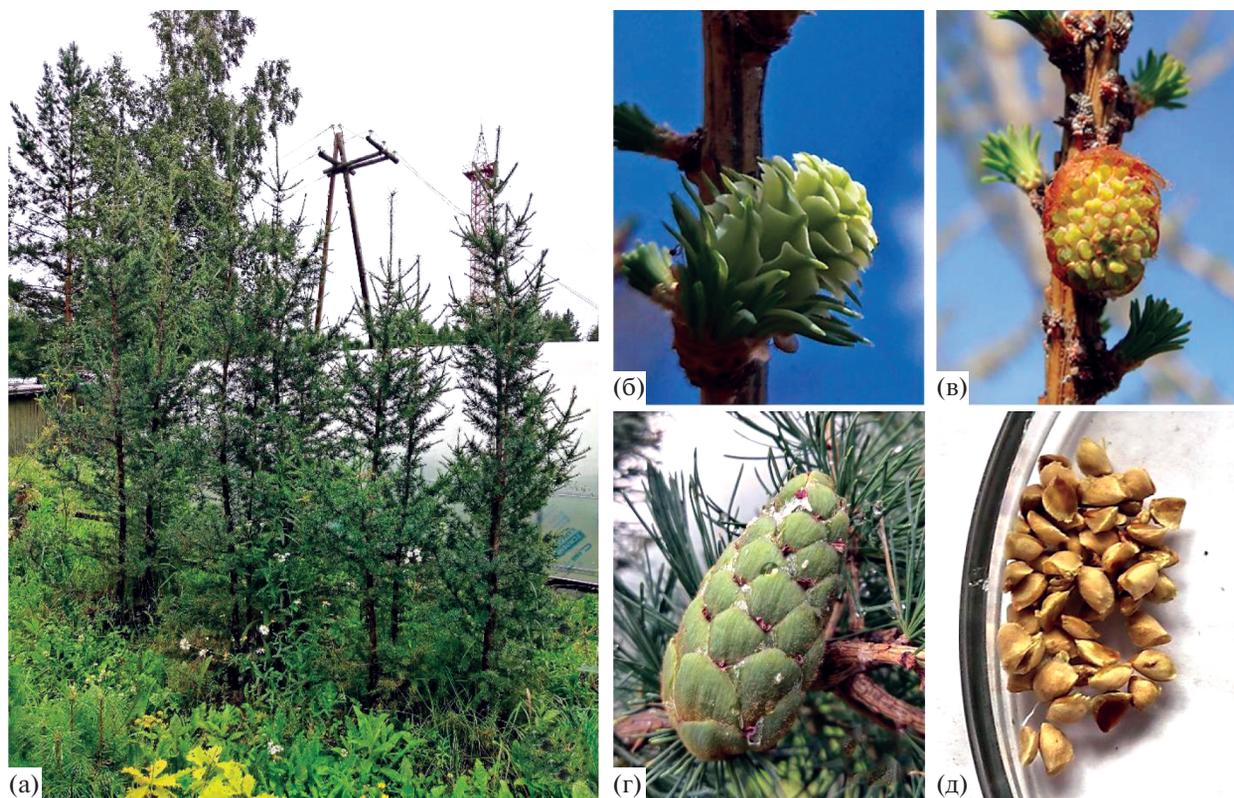
В восточной Канаде используется подход, называемый “Желаемый выигрыш и разнообразие” (“Desired gain and diversity”) (Park et al., 2016). MVF может обеспечить гораздо больший генетический выигрыш, чем селекция через семенное размножение, т.к. (1) при половом размножении возникает большой процент самоопыленных семян; (2) репродуктивный цикл у хвойных (особенно сосен) занимает длительный отрезок времени (более двух лет); (3) часто возникают неурожайные годы и формируются некачественные семена; (5) семена повреждаются конобионтами.

Основным преимуществом соматического эмбриогенеза как стратегии вегетативного размно-

жения хвойных видов (по сравнению с половым размножением) является высокая пролиферативная активность эмбриогенной культуры *in vitro*, которая может поддерживаться в течение длительного периода времени путем субкультивирования или криоконсервации (Lelu-Walter, Pâques, 2009; Klimaszewska et al., 2016). В наших исследованиях пролиферирующие эмбриогенные куль-



**Рис. 3.** Динамика роста клонов и лиственниц из семян на стационаре “Погорельский бор”.



**Рис. 4.** Клоны лиственницы сибирской на стационаре “Погорельский бор” ИЛ СО РАН: (а) вегетация клонов (лето); (б) мегастробил в период опыления; (в) микростробил; (г) мегастробил (июль); (д) незрелые семена клонов.

туры лиственницы сибирской при регулярном субкультивировании сохраняют свою активность в течение 2 лет. Мультипликация соматических зародышей активно идет через кливаж, почкообразование и расщепление клеток суспензора (Tret'yakova, Park, 2018). Кримоконсервирование эмбриогенных клеточных линий с использованием “морозильных контейнеров” относительно просто. Восстановление кримоконсервированных линий удовлетворительно. Так, при кримоконсервации в течение 22 лет удалось восстановить 95% клеточных линий (Park et al., 2016).

Интеграция многосортного плантационного лесовыращивания на основе программы MVF с геномной селекцией имеет ряд преимуществ по сравнению с семенным лесоразведением (Park et al., 2016):

- 1) MVF обеспечивает растениям более интенсивный рост, чем полученным из семян;
- 2) MVF может поставлять деревья с превосходным качеством древесины;
- 3) MVF обеспечивает гибкость для быстрой адаптации к изменяющимся условиям среды и повреждению насекомыми и болезнями, а также изменению климата за счет выведения устойчивых и адаптированных к конкретным факторам среды сортов.

У лиственницы сибирской введение в культуру эксплантов от дерева-донора А4 позволило нам получить клоны, которые, по данным генотипирования, по девяти микросателлитным локусам полностью соответствуют КЛ6, из которой они были получены. Кроме того, клонированные деревья отличались быстрым ростом и характеризовались сверххранним формированием генеративных органов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, соматический эмбриогенез является важной биотехнологией в размножении хвойных видов, в том числе в разработке и производстве сортов деревьев с желательными селекционными признаками (быстрым ростом, образованием высококачественной древесины, сверххранним формированием генеративных органов, устойчивостью к болезням и другими признаками). Данная технология может быть успешно реализована в крупномасштабном коммерческом производстве. Наиболее важным преимуществом производства хвойных деревьев методом СЭ является то, что эмбриогенные клеточные линии могут быть криогенно сохранены в ювенильном состоянии неограниченно долго, что невозможно при других методах размножения деревьев. Это

позволяет проводить длительные полевые испытания и последующий отбор тестируемых сортов. Биотехнология соматического эмбриогенеза становится ключевой технологией для репродукции хвойных видов. Разработанная авторами проекта биотехнология соматического эмбриогенеза для лиственницы сибирской и получение ЭСМ, которая подвергается криоконсервации и из которой в любой момент можно получить проростки и затем саженцы, может быть применена с модификациями и для других видов хвойных. В настоящее время необходимо оперативное внедрение многосортного лесного хозяйства (MVF) для плантационного лесовыращивания в России.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Сиделев С.И. Математические методы в биологии и экологии: введение в элементарную биометрию. Ярославль: Ярославский гос. ун-т им. П.Г. Демидова, 2012. 140 с.
- Третьякова И.Н. Способ микроклонального размножения лиственницы сибирской в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез на среде АИ для плантационного лесовыращивания. Патент РФ RU 2456344 С2. М.: Федеральная служба по интеллектуальной собственности, 2012. [https://new.fips.ru/registers-doc-view/fips\\_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2456344&TypeFile=html](https://new.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2456344&TypeFile=html)
- Третьякова И.Н., Баранчиков Ю.Н., Буглова Л.В., Белорусова А.С., Романова Л.И. Особенности формирования генеративных органов лиственницы сибирской и их морфогенетический потенциал // Успехи современной биологии. 2006. Т. 126. № 5. С. 472–480.
- Третьякова И.Н., Пак М.Э., Орешкова Н.В., Падутов В.Е. Регенерационная способность клеточных линий лиственницы сибирской в культуре *in vitro* // Известия российской академии наук. Серия биологическая. 2022. № 6. С. 585–596.
- Aronen T.S., Varis S., Tikkinen M.A., Välimäki S., Nikkanen T. Somatic embryogenesis of Norway spruce in Finland – seven years from start to first commercial pilots. In: *Canhoto J.M., Correia S.I.* (Editors) Book of Abstracts - 5th International Conference of the IUFRO Working Party 2.09.02 on “Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges” September 10–15, 2018. Coimbra, Portugal. P. 56.
- Bonga J.M. A comparative evaluation of the application of somatic embryogenesis, rooting of cuttings, and organogenesis of conifers // Canadian J. Forest Research. 2015. V. 45. № 4. P. 379–383.
- Ding C., Park Y.S., Bonga J., Bartlett B., Li Y., Raley F. A brief review of combining genomic selection and somatic embryogenesis for tree improvement. In: *Bonga J.M., Park Y.S., Trontin J.F.* (Editors) Proceedings of the 5th International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02 on “Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges.” September 10–15, 2018. Coimbra, Portugal. P. 55–69.
- Gamborg O., Phillips G.C. Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods. Berlin, Heidelberg: Springer, 1995. 385 p.
- Goddard M.E., Hayes B.J. Genomic selection // J. Animal breeding and Genetics. 2007. V. 124. № 6. P. 323–330.
- Goryachkina O.V., Park M.E., Tretyakova I.N., Badaeva E.D., Muratova E.N. Cytogenetic stability of young and long-term embryogenic cultures of *Larix sibirica* // Cytologia. 2018. V. 83. № 3. P. 323–329.
- 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. V. 4. № 4. P. 177–179.
- Hertzberg M. From genes towards products and the significance of gene delivery // BMC Proceedings. BioMed Central. 2011. V. 5. № 7. P. 1.
- Hühn M. Clonal mixtures juvenile-mature correlations and necessary number of clones // Silvae Genet. 1987. V. 36. P. 83–92.
- Klimaszewska K., Hargreaves C., Lelu-Walter M.A., Trontin J.F. Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000 // In vitro embryogenesis in higher plants. Humana Press, N.Y., 2016. P. 131–166.
- Klimaszewska K., Cyr D.R. Conifer somatic embryogenesis: I. Development // Dendrobiology. 2002. V. 48. P. 31–39.
- Lebedev V.G., Lebedeva T.N., Chernodubov A.I., Shestibratov K.A. Genomic selection for forest tree improvement: Methods, achievements and perspectives // Forests. 2020. V. 11. № 11. P. 1190.
- Lelu-Walter M.-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2008. V. 92. № 1. P. 31–45.
- 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. V. 66. № 104. P. 1–10.
- Libby W.J. What is a safe number of clones per plantation // Resistance to diseases and pests in forest trees. 1982. P. 324–360.
- Lindgren D. The population biology of clonal deployment. In *Ahuja M. R., Libby W. J.* (eds) // Clonal Forestry I: Genetics and Biotechnology. Berlin: Springer-Verlag, 1993. P. 34–49.
- MacKay J.J., Becwar M.R., Park Y.-S., Corderro J.P., Pullman G.S. Genetic control of somatic embryogenesis initiation in Loblolly pine and implications for breeding // Tree Genetics and Genomes. 2006. V. 2. P. 1–9.
- Merkle S. The ups and downs of developing hybrid sweetgum varieties for the U.S. bioenergy and pulp and paper industries: a 20-year case study. In: *Bonga J.M., Park Y.S., Trontin J.F.* (Editors) Proceedings of the 5th International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02 on “Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges”. September 10–15, 2018. Coimbra, Portugal. P. 225–229.
- Namroud M.-C., Bousquet J., Doerksen T., Beaulieu J. Scanning SNPs from a large set of expressed genes to assess the impact of artificial selection on the undomesticated genetic diversity of white spruce // Evolutionary Applications. 2012. V. 5. № 6. P. 641–656.
- Park Y.-S. Conifer somatic embryogenesis and multi-varietal forestry // In: Fenning T. (Eds.) Challenges and Opportunities for the World's Forests in the 21st Century. Forestry Sciences, Springer, Dordrecht. 2014. V. 81. P. 425–439.
- Park Y.-S., Beaulieu J., Bousquet J. Multi-varietal forestry integrating genomic selection and somatic embryogenesis // Vegetative propagation of forest trees. 2016. P. 302–322.
- Park Y.-S., Ding C., Lenz P., Nadeau S., Adams G., Millican S., Beaulieu J., Bousquet J. Implementing genomic selection for

- multi-varietal forestry of white spruce (*Picea glauca*) in New Brunswick, Canada. In: *Bonga J.M., Park Y.S., Trontin J.F.* (Editors) Proceedings of the 5th International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02 on "Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges". September 10–15, 2018. Coimbra, Portugal. P. 230–233.
- Pereira V.T., Nunes S., Sousa D., Almeida T.* KLON – plant biotechnology for productivity and sustainability of agroforestry industries In: *Canhoto J. M., Correia S. I.* (Editors) Book of Abstracts – 5th International Conference of the IUFRO Working Party 2.09.02 on "Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges". September 10–15, 2018. Coimbra, Portugal. P. 33.
- Peng C., Gao F., Wang H., Shen H., Yang L.* Optimization of maturation process for somatic embryo production and cryopreservation of embryogenic tissue in *Pinus koraiensis* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2021. V. 144. № 1. P. 185–194.
- Taniguchi T., Konagaya K., Nanasato Y.* Somatic embryogenesis in artificially pollinated seed families of 2nd generation plus trees and cryopreservation of embryogenic tissue in *Cryptomeria japonica* D. Don (Sugi) // Plant Biotechnology. 2020. V. 37. № 2. P. 239–245.
- Tretiakova I.N.* Embryogenic cell lines and somatic embryogenesis in *in vitro* culture of Siberian larch // Doklady Biological Sciences. Springer Nature BV. 2013. V. 450. № 1. P. 139–141.
- Tretiakova I.N., Barsukova A.V.* Somatic embryogenesis in *in vitro* culture of three larch species // Russian J. Developmental Biology. 2012. V. 43. № 6. P. 353–361.
- Tretiakova I.N., Kudoyarova G.R., Park M.E., Kazachenko A.S., Shuklina A.S., Akhiyarova G.R., Korobova A.V., Veselov S.U.* Content and immunohistochemical localization of hormones during *in vitro* somatic embryogenesis in long-term proliferating *Larix sibirica* cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2019. V. 136. № 3. P. 511–522.
- Tretiakova I.N., Pak M.E., Shuklina A.S., Pahomova A.P., Rogozhin E.A., Sadykova V.S., Petukhova I.A.* Use of plant antimicrobial peptides in *in vitro* embryogenic cultures of *Larix sibirica* // Biology Bulletin. 2020. V. 47. № 3. P. 225–236.
- Tretiakova I.N., Park M.E.* Somatic polyembryogenesis of *Larix sibirica* in embryogenic *in vitro* culture // Russian J. Developmental Biology. 2018. V. 49. № 4. P. 222–233.
- Tretiakova I.N., Park M.E., Baranova A.A., Lisetskaya I.A., Shuklina A.S., Rogozhin E.A., Sadykova V.S.* Use of antimicrobial peptides secreted by *Trichoderma* micromycetes to stimulate embryogenic cultures of *Larix sibirica* // Russian J. Developmental Biology. 2018. V. 49. № 6. P. 370–380.
- Tretiakova I.N., Park M.E., Ivanitskaya A.S., Oreshkova N.V.* Peculiarities of somatic embryogenesis of long-term proliferating embryogenic cell lines of *Larix sibirica in vitro* // Russian J. Plant Physiology. 2016. V. 63. № 6. P. 800–810.
- Tretiakova I.N., Park M.E., Pakhomova A.P., Sheveleva I.S., Muratova E.N.* Induction of somatic embryogenesis in siberian spruce (*Picea obovata*) in *in vitro* culture // Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Biologiya. 2021. № 54. P. 6–20.
- Tretiakova 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. V. 86. № 1. P. 55–60.
- Tretiakova I.N., Shuvaev D.N.* Somatic Embryogenesis in Siberian Dwarf Pine (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) // Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Springer, Cham, 2018. P. 307–317.
- Wu H.X.* Benefits and risks of using clones in forestry – a review // Scandinavian J. Forest Research. 2019. V. 34. № 5. P. 352–359.
- Zobel B.* Clonal forestry in eucalyptus. In *Ahuja M. R., Libby W.J.* (Eds.). Clonal Forestry In: Genetics and Biotechnology. Berlin: Springer-Verlag, 1993. P. 139–148.

## Siberian Larch Reproduction Using the Somatic Embryogenesis Biotechnology

I. N. Tretiakova<sup>1</sup>, \*, \*\* and M. E. Park<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Forest Institute, Siberian Branch of the RAS, Akademgorodok, 50, bldg. 28, Krasnoyarsk, 660036 Russia

\*E-mail: culture@ksc.krasn.ru

\*\*E-mail: mtavi@bk.ru

The biotechnology of somatic embryogenesis *in vitro*, combined with genomic selection and cryopreservation is used to create varietal genetically tested fast-growing plantations (Multi-Varietal Forestry program (MVF), Park, 2014, 2016, 2018). In 2008, the Sukachev Forest Institute of the Siberian Branch of the RAS has developed for the first time the biotechnology of somatic embryogenesis for Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) and obtained 42 proliferating cell lines consisting of embryonal-suspensor mass (ESM). The age of cell lines reaches 13 years. Significant variability was observed between cell lines in the number and size of globular embryos in proliferating embryogenic cultures, and in the ability of somatic embryos to mature and germinate. In different cell lines, the number of globular somatic embryos per 1 g of ESMs fresh weight ranges from 2040 to 11103, with 10 to 1220 embryos maturing. The regenerants germinate in a growth chamber, and plantlets of individual cell lines grow successfully in a greenhouse and then in the soil of the forest nursery at the Forest Institute's Pogorelsky Bor station. Genotyping of clones at microsatellite loci showed their complete genetic identity to the cell line from which they were obtained. In cloned Siberian larch trees at the age of seven, the initiation of generative organs forming occurred. Thus, at present, it is possible to quickly implement the MVF program for plantation forestry in Russia.

**Keywords:** somatic embryogenesis, clones, larch, varietal forest planting.

**Acknowledgements:** The study was funded by a RSF grant № 22-14-20008 (<https://rscf.ru/project/22-14-20008/>) and the Krasnoyarsk territorial scientific foundation.

## REFERENCES

- Aronen T.S., Varis S., Tikkinen M.A., Välimäki S., Nikkanen T., Somatic embryogenesis of Norway spruce in Finland – seven years from start to first commercial pilots, *Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges*, 5th International Conference of the IUFRO Working Party 2.09.02, Book of Abstracts, September 10–15, 2018, Coimbra, Portugal. P. 56.
- Bonga J.M., A comparative evaluation of the application of somatic embryogenesis, rooting of cuttings, and organogenesis of conifers, *Canadian J. Forest Research*, 2015, Vol. 45, No. 4, pp. 379–383.
- Ding C., Park Y.S., Bonga J., Bartlett B., Li Y., Raley F., A brief review of combining genomic selection and somatic embryogenesis for tree improvement, *Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges*, Proceedings of the 5th International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02, September 10–15, 2018, Coimbra, Portugal, pp. 55–69.
- Gamborg O., Phillips G.C., *Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods*, Berlin, Heidelberg: Springer, 1995, 385 p.
- Goddard M.E., Hayes B.J., Genomic selection, *J. Animal breeding and Genetics*, 2007, Vol. 124, No. 6, pp. 323–330.
- Goryachkina O.V., Park M.E., Tretyakova I.N., Badaeva E.D., Muratova E.N., Cytogenetic stability of young and long-term embryogenic cultures of *Larix sibirica*, *Cytologia*, 2018, Vol. 83, No. 3, pp. 323–329.
- 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, No. 4, pp. 177–179.
- Hertzberg M., From genes towards products and the significance of gene delivery, *BMC Proceedings. BioMed Central*, 2011, Vol. 5, No. 7, P. 1.
- Hühn M., Clonal mixtures juvenile-mature correlations and necessary number of clones, *Silvae Genet.*, 1987, Vol. 36, pp. 83–92.
- Klimaszewska K., Cyr D.R., Conifer somatic embryogenesis: I. Development, *Dendrobiology*, 2002, Vol. 48, pp. 31–39.
- 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*, N.Y.: Humana Press, 2016, pp. 131–166.
- Lebedev V.G., Lebedeva T.N., Chernodubov A.I., Shestibratov K.A., Genomic selection for forest tree improvement: Methods, achievements and perspectives, *Forests*, 2020, Vol. 11, No. 11, p. 1190.
- Lelu-Walter M.-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K., Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2008, Vol. 92, No. 1, pp. 31–45.
- 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, No. 104, pp. 1–10.
- Libby W.J., What is a safe number of clones per plantation, In: *Resistance to diseases and pests in forest trees*, 1982, pp. 324–360.
- Lindgren D., The population biology of clonal deployment, In: *Clonal Forestry I: Genetics and Biotechnology*, Berlin: Springer-Verlag, 1993, pp. 34–49.
- MacKay J.J., Becwar M.R., Park Y.-S., Corderro J.P., Pullman G.S., Genetic control of somatic embryogenesis initiation in Loblolly pine and implications for breeding, *Tree Genetics and Genomes*, 2006, Vol. 2, pp. 1–9.
- Merkle S., The ups and downs of developing hybrid sweetgum varieties for the U.S. bioenergy and pulp and paper industries: a 20-year case study, *Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges*, Proceedings of the 5th International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02, September 10–15, 2018, Coimbra, Portugal, pp. 225–229.
- Namroud M.-C., Bousquet J., Doerksen T., Beaulieu J., Scanning SNPs from a large set of expressed genes to assess the impact of artificial selection on the undomesticated genetic diversity of white spruce, *Evolutionary Applications*, 2012, Vol. 5, No. 6, pp. 641–656.
- Park Y.-S., Beaulieu J., Bousquet J., Multi-varietal forestry integrating genomic selection and somatic embryogenesis, *Vegetative propagation of forest trees*, 2016, pp. 302–322.
- Park Y.-S., Conifer somatic embryogenesis and multi-varietal forestry, In: *Challenges and Opportunities for the World's Forests in the 21st Century*, Dordrecht: Forestry Sciences, Springer, 2014, V. 81, pp. 425–439.
- Park Y.-S., Ding C., Lenz P., Nadeau S., Adams G., Millican S., Beaulieu J., Bousquet J. Implementing genomic selection for multi-varietal forestry of white spruce (*Picea glauca*) in New Brunswick, Canada, *Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges*, Proceedings of the 5th International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02, September 10–15, 2018, Coimbra, Portugal. P. 230–233.
- Peng C., Gao F., Wang H., Shen H., Yang L., Optimization of maturation process for somatic embryo production and cryopreservation of embryogenic tissue in *Pinus koraiensis*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2021, Vol. 144, No. 1, pp. 185–194.
- Pereira V.T., Nunes S., Sousa D., Almeida T., KLON – plant biotechnology for productivity and sustainability of agroforestry industries, *Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges*, Book of Abstracts – 5th International Conference of the IUFRO Working Party 2.09.02, September 10–15, 2018, Coimbra, Portugal, p. 33.
- Sidelev S.I., *Matematicheskie metody v biologii i ekologii: vvedenie v elementarnuyu biometriyu* (Mathematical methods in biology and ecology: an introduction to elementary biometrics), Yaroslavl: Yaroslavskii gos. un-t im. P. G. Demidova, 2012, 140 p.
- Taniguchi T., Konagaya K., Nanasato Y., Somatic embryogenesis in artificially pollinated seed families of 2nd generation plus trees and cryopreservation of embryogenic tissue in *Cryptomeria japonica* D. Don (Sugi), *Plant Biotechnology*, 2020, Vol. 37, No. 2, pp. 239–245.
- Tretyakova I.N., Embryogenic cell lines and somatic embryogenesis in in vitro culture of Siberian larch, *Doklady Biological Sciences*, Springer Nature BV, 2013, Vol. 450, No. 1, pp. 139–141.
- Tretyakova I.N., Baranchikov Y.N., Buglova L.V., Belorussova A.S., Romanova L.I., Osobennosti formirovaniya generativnykh organov listvennitsy sibirskoi i ikh morfogeneticheskii potentsial (Peculiarities of forming Siberian larch generative organs and their morphogenetic potential),

- Uspekhi sovremennoi biologii*, 2006, Vol. 126, No. 5, pp. 472–480.
- Tretyakova I.N., Barsukova A.V., Somatic embryogenesis in *in vitro* culture of three larch species, *Russian J. Developmental Biology*, 2012, Vol. 43, No. 6, pp. 353–361.
- Tretyakova I.N., Kudoyarova G.R., Park M.E., Kazachenko A.S., Shuklina A.S., Akhiyarova G.R., Korobova A.V., Veselov S.U., Content and immunohistochemical localization of hormones during *in vitro* somatic embryogenesis in long-term proliferating *Larix sibirica* cultures, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2019, Vol. 136, No. 3, pp. 511–522.
- Tretyakova I.N., Pak M.E., Shuklina A.S., Pahomova A.P., Rogozhin E.A., Sadykova V.S., Petukhova I.A., Use of plant antimicrobial peptides in *in vitro* embryogenic cultures of *Larix sibirica*, *Biology Bulletin*, 2020, Vol. 47, No. 3, pp. 225–236.
- 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, No. 6, pp. 585–596.
- Tretyakova I.N., Park M.E., Baranova A.A., Lisetskaya I.A., Shuklina A.S., Rogozhin E.A., Sadykova V.S., Use of antimicrobial peptides secreted by *Trichoderma* micromycetes to stimulate embryogenic cultures of *Larix sibirica*, *Russian J. Developmental Biology*, 2018, Vol. 49, No. 6, pp. 370–380.
- Tretyakova I.N., Park M.E., Ivanitskaya A.S., Oreshkova N.V., Peculiarities of somatic embryogenesis of long-term proliferating embryogenic cell lines of *Larix sibirica in vitro*, *Russian J. Plant Physiology*, 2016, Vol. 63, No. 6, pp. 800–810.
- Tretyakova I.N., Park M.E., Pakhomova A.P., Sheveleva I.S., Muratova E.N., Induction of somatic embryogenesis in Siberian spruce (*Picea obovata*) in *in vitro* culture, *Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Biologiya*, 2021, No. 54, pp. 6–20.
- Tretyakova I.N., Park M.E., Somatic polyembryogenesis of *Larix sibirica* in embryogenic *in vitro* culture, *Russian J. Developmental Biology*, 2018, Vol. 49, No. 4, pp. 222–233.
- 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, No. 1, pp. 55–60.
- Tretyakova I.N., Shuvaev D.N., Somatic Embryogenesis in Siberian Dwarf Pine (*Pinus pumila* (Pall.) Regel), In: *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*, Springer, Cham, 2018, pp. 307–317.
- Tret'yakova I.N., *Sposob mikroklonal'nogo razmnozheniya listvennitsy sibirskoi v kul'ture in vitro cherez somaticheskii embriogenez na srede AI dlya plantatsionnogo lesovyrashchivaniya. Patent RF RU 2456344 C2* (Method for microclonal propagation of Siberian larch in *in vitro* culture through somatic embryogenesis on AI medium for plantation forestry. Patent RF RU 2456344 C2), Moscow: Federal'naya sluzhba po intellektual'noi sobstvennosti, 2012, available at: [https://new.fips.ru/registers-doc-view/fips\\_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2456344&TypeFile=html](https://new.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2456344&TypeFile=html)
- Wu H.X., Benefits and risks of using clones in forestry – a review, *Scandinavian J. Forest Research*, 2019, Vol. 34, No. 5, pp. 352–359.
- Zobel B., Clonal forestry in eucalyptus, *Clonal Forestry*, In: *Genetics and Biotechnology*, Berlin: Springer-Verlag, 1993, pp. 139–148.