

УДК 581.1:576.5:57.085.23

ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ КЛОНОВ ПЛЮСОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ *Picea abies* (L.) Н. Karst. ИЗ СРЕДНЕТАЕЖНОЙ ПОДЗОНЫ КАРЕЛИИ К СОМАТИЧЕСКОМУ ЭМБРИОГЕНЕЗУ

© 2024 г. Р. В. Игнатенко^{а, *}, О. В. Чирва^а, М. А. Ершова^а,
Н. А. Галибина^а, И. А. Теслюк^а

^аИнститут леса — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”,

Петрозаводск, Россия

*e-mail: ocean-9@mail.ru

Поступила в редакцию 14.12.2023 г.

После доработки 01.01.2024 г.

Принята к публикации 03.01.2024 г.

Представлены результаты исследования соматического эмбриогенеза у ели европейской (*Picea abies* (L.) Н. Karst.), произрастающей на территории подзоны средней тайги в Республике Карелия (Россия). Незрелые зиготические зародыши отбирали с 10 клонов плюсовых деревьев на Петрозаводской лесосеменной плантации и дерева в г. Петрозаводске при сумме эффективных температур от 728 до 1257 градусо-дней (при базовой температуре 5°). Установлено, что в качестве субстрата для индукции соматического эмбриогенеза и пролиферации клеточных линий необходимо использовать питательную среду LM, а в качестве эксплантов — зародыши на стадиях развития от глобулярной до семядольной. Спустя 14 месяцев культивирования из 26 клеточных линий, полученных от эксплантов с Петрозаводской лесосеменной плантации, сохранилось 12 шт. (46%), а из дерева в г. Петрозаводске — 2 клеточные линии из 23 (9%). В результате исследования выявлены материнские генотипы клонов плюсовых деревьев ели европейской, способные к образованию эмбрионально-сuspензорной массы, длительной пролиферации и формированию растений-регенерантов.

Ключевые слова: *Picea abies*, ель европейская, зиготические зародыши, клоны плюсовых деревьев, микроклональное размножение хвойных, эмбриогенные культуры

DOI: 10.31857/S0015330324010039, EDN: NWHIYW

ВВЕДЕНИЕ

Древесина является универсальным, экологичным и возобновляемым материалом, который используется во многих отраслях промышленности [1]. Однако в результате антропогенного воздействия (лесозаготовка, сельскохозяйственные мероприятия и др.) площади лесных фитоценозов стремительно сокращаются [2–4]. В связи с этим необходимы программы по эффективному лесовосстановлению. Использование микроклонального размножения с применением селекционно-генетических методов отбора растительного материала может способствовать ускоренному получению качественного семенного материала экономически ценных древесных видов.

Ель европейская (*Picea abies* (L.) Н. Karst.) является одним из важнейших лесообразующих видов на территории Европы. Для восстановления фитоценозов без вреда для естественных лесов создаются плантации с использованием высокопродуктивных генотипов [4]. Однако семенная продуктивность *P. abies* варьирует от года к году из-за нерегулярного цветения и вредителей [5]. В связи с чем получение большого объема посадочного материала из ограниченного количества семян представляется крайне перспективным, что для хвойных растений наиболее эффективно достигается с помощью соматического эмбриогенеза (СЭ).

Впервые СЭ у голосеменных был описан в 1985 г. на примере незрелых зародышей *P. abies* [6, 7] и мегагаметофитов *Larix deciduas* Mill [8]. К сожалению, несмотря на то, что метод СЭ уже разработан, его широкое применение для *P. abies* сильно ограничено в связи с тиражиро-

Сокращения: Петрозаводская ЛСП — Петрозаводская лесосеменная плантация; СЭ — соматический эмбриогенез; ЭСМ — эмбрионально-сuspензорная масса.

ванием только определенных генотипов, а также высокими затратами на ручной труд [4, 9, 10]. Между тем в литературе представлены данные по инициации СЭ у *P. abies*, а также получению растений-регенерантов и созданию на их основе плантаций [5, 11]. Помимо этого, имеются сведения об инициации СЭ для ряда других видов рода *Picea*: *P. sitchensis* (Bong.) Carr. [12, 13], *P. omorica* Purk., *P. pungens* “Glauca” Beissn., *P. breweriana* S. Watson [14], *P. mariana* (Mill.) [15], *P. morrisonicola* Hay. [16], *P. koraiensis* Nakai [17], *P. ajanensis* Fisch. ex Carr. [18], *P. obovata* Ledeb. [19] и др.

В России на сегодняшний день информация об успешной инициации СЭ и получении растений-регенерантов у *P. abies* в изученной нами литературе отсутствует. Более того, эффективность СЭ сильно варьирует на разных этапах и для различных генотипов растений, поэтому модификация протоколов на каждой стадии до сих пор остается актуальной задачей [4].

Цель исследования – изучение процесса соматического эмбриогенеза у эксплантов ели европейской, собранных с разных деревьев-доноров в среднетаежной подзоне Карелии и при разных условиях культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор незрелых шишек производили с 10 клонов плюсовых деревьев ели европейской (*Picea abies* (L.) Н. Karst.), произрастающих на двух участках Петрозаводской лесосеменной плантации (ЛСП) I порядка (Прионежский район, Республика Карелия). Плантация закладывалась в 1977-х годах (участок 1, деревья № 1–5) и 1994 (участок 2, деревья № 6–10). Характеристика деревьев приведена в табл. 1. Сбор шишек на Петрозаводской ЛСП проводили 27 июля, 25 августа и 19 сентября, что соответствовало сумме эффективных температур 728, 1126 и 1257 градусо-дней (при базовой температуре 5°C) соответственно. Также однократно – 4 августа (сумма эффективных температур – 822 градусо-дня) шишки были отобраны с дерева *P. abies* (возраст 15 лет), которое произрастало на территории Петрозаводского городского округа (г. Петрозаводск). В каждую дату отбора при помощи стереомикроскопа (Leica, Германия) определяли стадию развития зиготического зародыша.

Перед введением зародышей в культуру шишки хранили в холодильнике при температуре 4°C в течение 3–4 недель. Обработка растительного материала включала несколько этапов. Из шишек извлекали семена, которые в нестерильных условиях помещали в 70% этиловый спирт на одну минуту. Далее, в стерильных условиях семена помещали в 10% раствор перекиси водорода на 10 мин, после чего промывали в обильном количестве стерильной воды в течение 10 мин.

Таблица 1. Морфологическая характеристика деревьев ели, произрастающих на Петрозаводской лесосеменной плантации

№ дерева	Высота, м	Диаметр (0.3 м), см	Диаметр (1.3 м), см	Возраст дерева, лет
1	18	47	43	42
2	16	44	43	27
3	12	36	30	30
4	14	33	29	34
5	14	43	37	31
6	10	25	23	21
7	10	26	22	22
8	10	25	28	26
9	10	20	24	24
10	9	19	22	20

Семена очищали от покровных чешуй, мегаспорофиты осторожно вскрывали и зиготические зародыши помещали на среду инициации. В каждую банку, как правило, помещали 4 зиготических зародыша. Банки выдерживали в темноте при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Для инициации соматического эмбриогенеза в соответствии с данными литературы было выбрано две среды: DCR [20] и LM с модификациями [9, 21]. В качестве регуляторов роста растений использовали 2,4-Д (9.0 мкмоль) и БАП (4.5 мкмоль), содержание сахарозы в обеих средах составляло 10 г/л, агара – 6 г/л.

После того, как размеры культуры клеток достигали примерно 5–10 мм, из культуры удаляли зиготический зародыш, и ткань пересаживали на питательную среду для пролиферации (LM или DCR соответственно) для получения эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) и создания клеточной линии. При успешной пролиферации клеточных линий субкультивирование проводили каждые 2 недели.

Для вызревания соматических зародышей часть ЭСМ помещали на питательную среду созревания (maturation LM) схожего состава, но содержащую вместо 2,4-Д и БАП – 30 мкмоль АБК, 60 г/л сахарозы и 9 г/л агара [9]. Сформированные семядольные соматические зародыши переносили на среду прорастания (germination LM) на 10–21 сутки, в зависимости от клеточной линии. Среда прорастания отличалась меньшим содержанием сахарозы (20 г/л), отсутствием NH_4NO_3 и фитогормонов. Культивирование на средах созревания и прорастания осуществляли на свету при 16-часовом фотопериоде.

Цитологический анализ полученных культур клеток *P. abies* проводился с применением метода давленных препаратов. Перед началом анализа каллус 1–2 мин выдерживали в красителе (0.2%

водный раствор сафранина с добавлением одной капли насыщенного спиртового раствора метиленового синего), затем на предметное стекло переносили исследуемый образец культуры клеток и добавляли одну каплю глицерина [22]. Препараты просматривали под световым микроскопом (Carl Zeiss Primo Star, Германия) при 4-х и 10-кратном увеличении. Для микрофото-съемки использовали цифровую камеру-окуляр ADFstd 10 (ADF, КНР).

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка развития зиготических зародышей показала, что на 27 июля 2022 г. большая часть зародышей находилась на глобулярной стадии развития (рис. 1а). В это время зародыш проходил этап раннего эмбриогенеза, на котором за счет деления клеток суспензора эмбрион продвигался к холозальному концу мегагаметофита, увеличивался в размерах и развивался. Следующий этап – поздний эмбриогенез, в результате которого 25 августа были зарегистрированы семядольные зародыши (рис. 1б). Завершается эмбриогенез формированием зрелого зиготическо-

го зародыша биполярной структуры, который несет на одном конце гипокотиля зародышевый корешок, на другом семядоли (19 сентября). Хранение материала при низких положительных температурах в течение 3–4 недель до введения в культуру *in vitro* способствовало замедлению развития.

В рамках исследования в культуру *in vitro* был введен 291 зиготический зародыш, собранный на Петрозаводской ЛСП с клонов плюсовых деревьев *P. abies* (помещены на питательную среду LM – 263 шт., на среду DCR – 28 шт.), а также 24 зародыша, отобранные с *P. abies* в г. Петрозаводске (помещены на питательную среду LM). Стоит отметить, что 18% (57 шт.) эксплантов из общей выборки, введенные в культуру *in vitro*, подверглись контаминации в первые 14 дней эксперимента и не учитывались при дальнейшем анализе.

Шишки, собранные с Петрозаводской ЛСП, были повреждены огневкой шишковой (*Dioryctria abietella* Schiff.). При вскрытии шишек от клонов плюсовых деревьев № 4, 5 и 8 целых семян обнаружить не удалось, соответственно в культуру *in vitro* экспланты с этих деревьев введены не были.

Образование массы клеток происходило на 7–14 сутки в зависимости от генотипа растения и среды инициации. При этом стадия развития

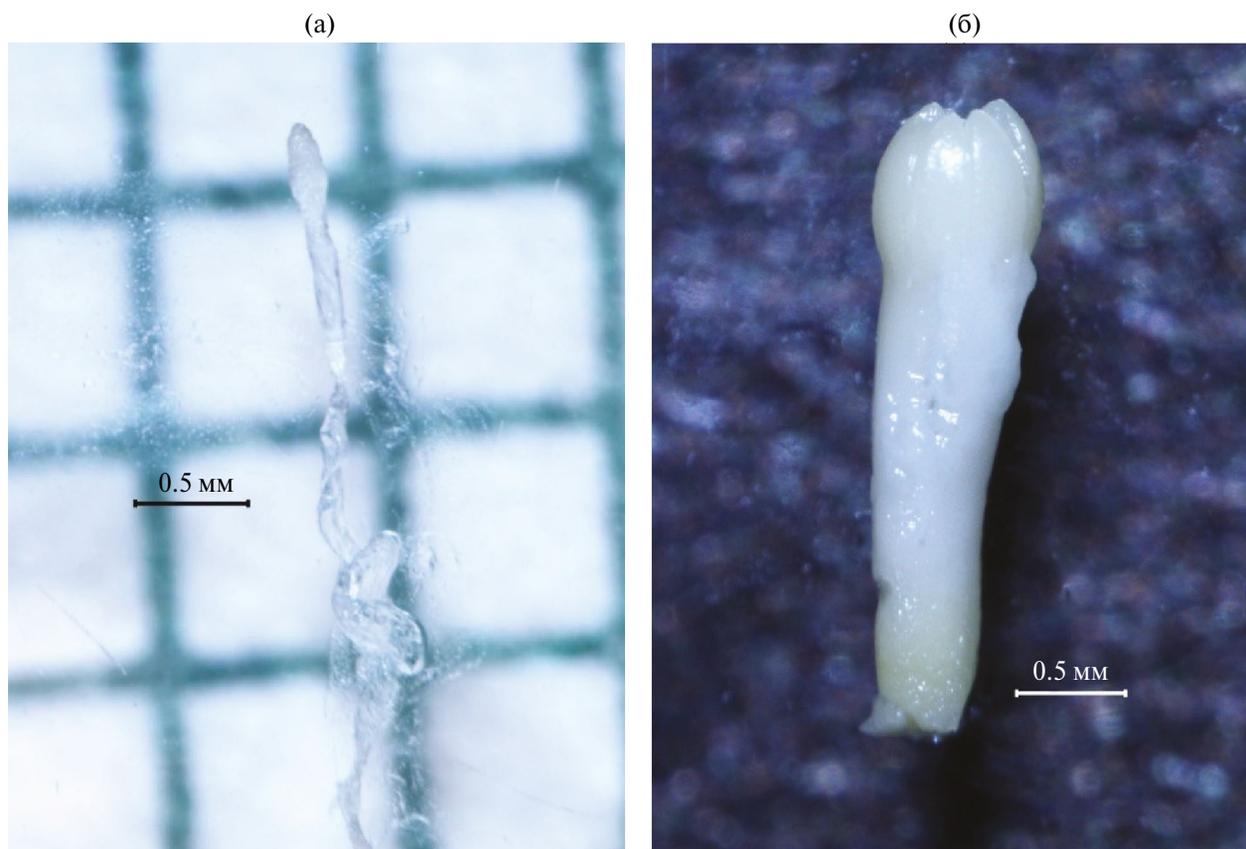


Рис. 1. Внешний вид зиготического зародыша *Picea abies*: а – глобулярный зародыш (27 июля); б – семядольный зародыш (25 августа). Масштаб – 0.5 мм.

зиготических зародышей *P. abies*, отобранных 27 июля и 25 августа, не оказывала существенно-го влияния на данный процесс. Зародыши, собранные 19 сентября, в 50% случаев в культуре *in vitro* развивались в растения.

В результате сравнения данных по инициации культуры клеток на питательных средах LM и DCR из зародышей, полученных из семян деревьев *P. abies*, произрастающих на Петрозаводской ЛСП, было установлено, что инициация культуры в 2.5 раза чаще происходила на питательной среде LM (рис. 2а). В то же время 96% эксплантов *P. abies* из г. Петрозаводска образовывали массу клеток на среде LM. При визуальном осмотре наличие вредителей в шишках с данного растения обнаружено не было.

В результате морфологической оценки было выявлено, что на питательной среде DCR формировался белый и твердый каллус, который через некоторое время начинал темнеть, переставая развиваться. На среде LM формирующаяся масса клеток была прозрачной, слизистой и мягкой (рис. 3а). Именно такие культуры, как показали цитологические исследования, являлись ЭСМ (рис. 4). Формирование ЭСМ начинается в результате удлинения и неравного деления клеток, с образования длинной эмбриональной трубки и эмбриональной инициали [23]. Подобное деление является основным критерием успешности СЭ. Дальнейшее деление эмбриональных инициалей приводит к формированию глобулярной структуры зародыша. Через месяц культивирования из ЭСМ были выделены клеточные линии, которые отличались между собой по пролиферативной активности. Было сформировано 26 клеточных линий для деревьев с Петрозаводской ЛСП, что составляет 35% от общего числа образовавшихся масс клеток. Стоит отметить, что ЭСМ активно формировалась из эксплантов двух генотипов *P. abies*, произрастающих на Петро-

водской ЛСП – № 3 и 7 (рис. 2б). Из эксплантов, деревом-донором которых являлась *P. abies* из г. Петрозаводска, были получены 23 эмбриогенные культуры, из которых в дальнейшем сформировались клеточные линии (рис. 2б).

У всех клеточных линий часть ЭСМ была перенесена на следующую питательную среду (maturation LM), где происходило созревание соматических зародышей (рис. 3б, в). Формирование семядольных зародышей зафиксировано на 10–21 сутки культивирования, в зависимости от клеточной линии. Полученные растения размещались на субстрате germination LM. Спустя некоторое время у части растений (20%) начинали формироваться корни (рис. 3г). Таким образом, за 3 месяца исследования процесса СЭ были получены растения-регенеранты *P. abies*.

Спустя 14 месяцев культивирования из 26 клеточных линий, полученных от эксплантов *P. abies* из Петрозаводской ЛСП, сохранилось 12 шт. (46%), а из эксплантов *P. abies* г. Петрозаводска – 2 клеточные линии (9%). Часть культур была подвержена грибковой инфекции, а другая часть переставала развиваться, темнела и погибала. Наиболее активными пролиферативными способностями обладали клеточные линии, полученные из эксплантов клонов плюсовых деревьев № 3 и 7 (рис. 2б), которые сохранили способность к образованию растений-регенерантов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Получение вегетативного потомства хвойных растений методом СЭ активно развивается [4]. Предполагается, что в ближайшем будущем СЭ будет внедрен в селекционные программы стран Европы, что поспособствует преодолению проблем в лесном секторе, вызванных изменением климата и высоким спросом на продукцию из древесины.

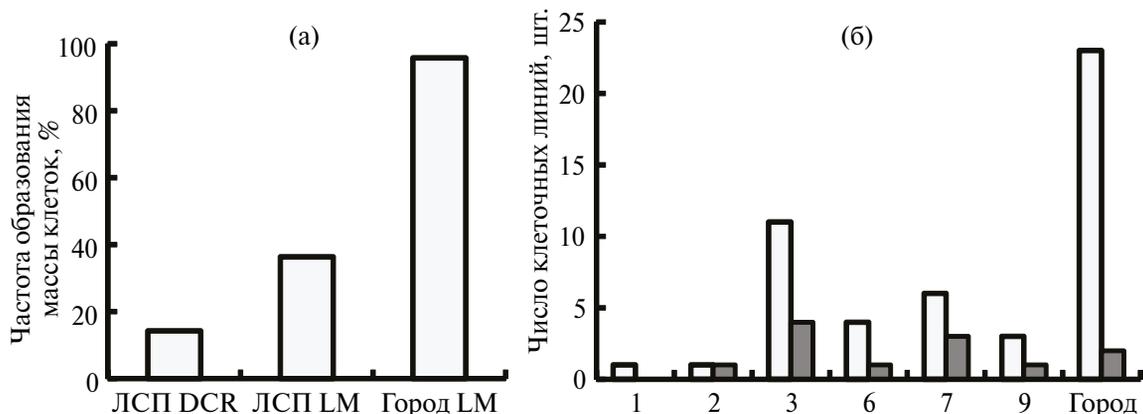


Рис. 2. Частота образования массы клеток (а) из зародышей *Picea abies*, собранных с деревьев на Петрозаводской лесосеменной плантации (ЛСП) и в г. Петрозаводске; б – число клеточных линий. Светлые столбцы – клеточные линии, сформированные в летний сезон 2022 г.; темные столбцы – клеточные линии, сохранившиеся спустя 14 месяцев культивирования.

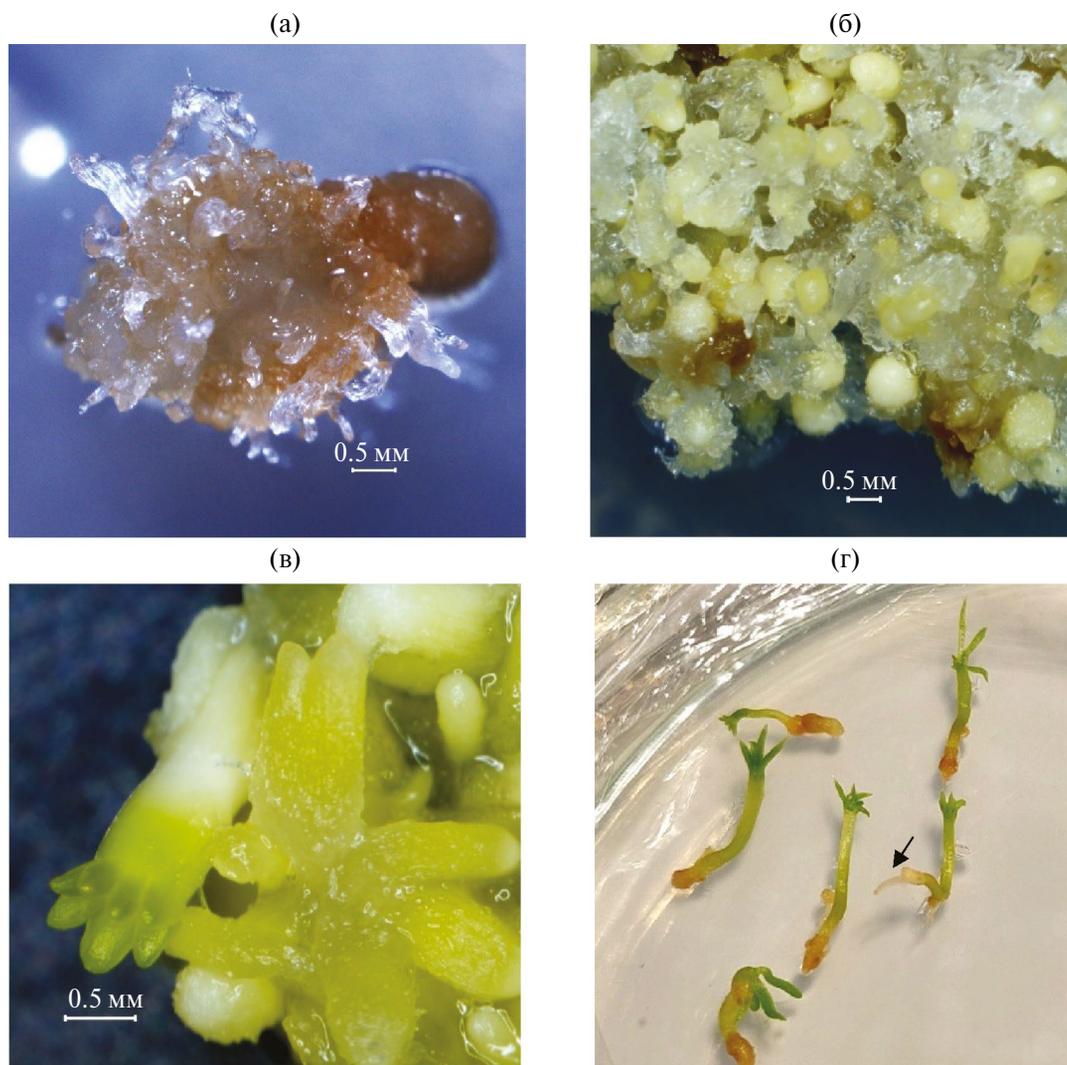


Рис. 3. Получение соматических растений *Picea abies*: а – инициация эмбриогенной культуры; б – глобулярные соматические зародыши на питательной среде maturation LM; в – вызревание соматического зародыша; г – растения-регенеранты на питательной среде germination LM (стрелкой обозначен сформированный корень). Масштаб – 0.5 мм.

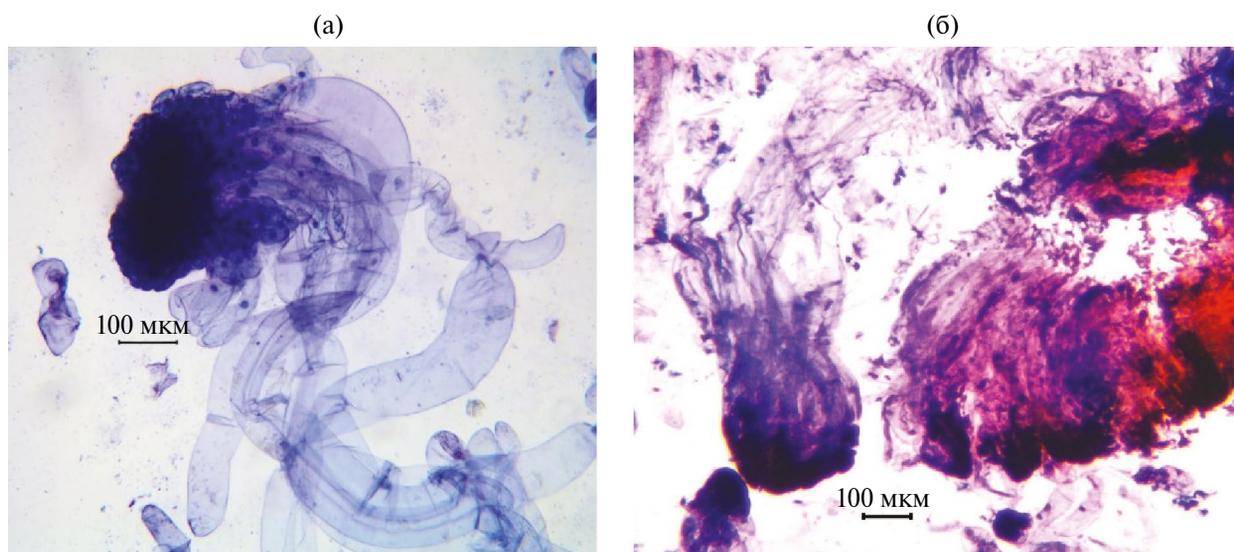


Рис. 4. Формирование соматических зародышей в эмбрионально-суспензорной массе *Picea abies*. Масштаб – 100 мкм.

Считается, что как зрелые, так и незрелые зиготические зародыши могут быть использованы в качестве эксплантов при инициации эмбриогенных культур *Picea*, хотя частота инициации у зрелых эмбрионов ниже, по сравнению с незрелыми [9, 24]. Так на *P. abies* было показано, что из незрелых зародышей формирование масс клеток достигает 100%, в то время, как из зрелых – 50% [25]. Для *P. abies* [26] и *P. mariana* [15] характерна более активная индукция СЭ из зиготических зародышей на этапе раннего эмбриогенеза на посткливажной стадии развития (культура мегагаметофитов). В то же время у *P. sitchensis* частота индукции СЭ составляла от 3 до 5% при использовании эксплантов как зрелых, так и незрелых зиготических зародышей [12, 13]. Установлено, что ЭСМ у *P. pungens* образуется из незрелых зиготических зародышей на стадии сформированных семядолей [27]. Представленные данные свидетельствуют о необходимости разработки видоспецифичных протоколов индукции СЭ для представителей рода *Picea*.

По нашим данным, в 2022 г. для среднетаежной подзоны Карелии оптимальным сроком для сбора шишек *P. abies* являлся период – конец июля–август. В этот период зиготический зародыш развивался из глобулярного в семядольный. При поздних сроках сбора растительного материала (сентябрь), помимо снижения частоты инициации из-за вызревания зародышей, пораженные вредителями шишки могут уже не содержать семян, что делает невозможным размножение растений как естественным путем, так и с помощью СЭ. Поэтому ранний сбор и хранение шишек при низких положительных температурах в холодильнике замедляет развитие зиготического зародыша, продлевая период введения материала в культуру без снижения частоты инициации, а также оказывает негативное влияние на развитие личинок вредителя, что способствует сохранению большей части семян. Отметим, что развитие личинок огневки шишковидной в шишках *P. abies* делает невозможным сбор семян с деревьев, произрастающих на Петрозаводской ЛСП на протяжении нескольких лет. Семена, собранные с клонов плюсовых деревьев на плантации, могли бы послужить качественным посадочным материалом для целей лесовосстановления в среднетаежных лесах Европейского Севера России. В связи с этим проведение исследований по искусственному размножению ценных генотипов хвойных растений с определенных географических районов и их сохранению в культуре *in vitro* является особенно актуальным.

Модификация протоколов и подбор условий культивирования до сих пор остается важнейшим этапом для успешного запуска СЭ. К ним относят протоколы по предварительной стерилизации растительного материала перед введе-

нием эксплантов в культуру *in vitro* и состав питательной среды. В литературе [24, 28] отмечается, что стресс, вызванный химическим и физическим воздействием на клетки экспланта, может способствовать укорачиванию теломер, а это, в свою очередь, оказывает негативное влияние на процесс СЭ. Для растений рода *Picea* наиболее часто используемыми и рекомендуемыми питательными средами являются LP [29] и LM [4, 21]. В нашем исследовании мы инокулировали зародыши *P. abies* на два субстрата, значительно отличающихся по составу. Показано, что питательная среда DCR не подходит для запуска СЭ *P. abies* – на ней формировался неэмбриогенный каллус. Похожие результаты были получены нами и при введении мегагаметофитов *Pinus sylvestris* L., содержащих незрелые зародыши [30, 31]. Интересно, что в работе Третьяковой с соавт. [19], где в культуру *in vitro* вводили зародыши *P. obovata* на 4 различных субстрата – DCR, 1/2LV, MS, AI, активной способностью к пролиферации обладали только 3 клеточные линии из 300, при этом большая часть ЭСМ культивировалась на питательной среде DCR.

В нашем эксперименте после среды пролиферации клеточные линии переносили на среду созревания и культивировали при 16-часовом фотопериоде. В литературе [32–34] представлена информация о том, что перед началом созревания зародышей хвойных растений на короткий период времени можно использовать субстрат, не содержащий регуляторы роста, с добавлением активированного угля (предсозревание). Помимо этого, для снижения осмотического потенциала питательной среды в нее добавляют полиэтиленгликоль [34–36]. Это может оказывать положительное влияние на созревание соматических зародышей. Также некоторые исследователи [33, 37] рекомендуют выращивать культуры хвойных растений на среде созревания в темноте. Перечисленные выше модификации протоколов культивирования эмбриогенных линий, вероятно, могут способствовать лучшему формированию растений-регенерантов.

На успех инициации СЭ существенное влияние оказывает генотип дерева-донора. Aronen с соавт. [24] показали, что инициация СЭ у эксплантов *P. abies* от контролируемого опыления варьировала в зависимости от генотипа, а также отличалась год от года и составляла 61–100% в 2012 г., и 30–94% в 2014 г. В нашем исследовании ЭСМ были получены для всех деревьев, с которых удалось собрать неповрежденный семенной материал. При этом наибольшее число эмбриогенных клеточных линий было образовано для клонов плюсовых деревьев № 3 и 7, а также для дерева из г. Петрозаводска – 23 клеточные линии. Через 14 месяцев с начала культивирования от данных деревьев-доноров активную пролиферацию про-

должили 36% (дерево № 3), 50% (дерево № 7) и 9% (дерево из г. Петрозаводска) клеточных линий от первоначально образованных. В работе Hazubaska-Przybyl и Wojarczuk [11] показано, что спустя 24 месяца культивирования способностью к активному делению обладали 9% эмбриогенных культур *P. abies*. Таким образом, можно заключить, что генотип дерева-донора эксплантов оказывает влияние не только на инициацию СЭ, но и на последующую выживаемость клеточных линий.

В результате проведенных исследований были адаптированы протоколы различных этапов СЭ для эксплантов с деревьев-доноров *P. abies*, произрастающих в среднетаежной подзоне Карелии. Установлено, что незрелые зиготические зародыши, отобранные в качестве эксплантов при сумме эффективных температур 728–1126 градусо-дней (при базовой температуре 5°) и хранившиеся при низких положительных температурах в течение 3–4 недель, наиболее отзывчивы к СЭ. Выявлены генотипы клонов плюсовых деревьев, произрастающих на Петрозаводской ЛСП, способные к образованию ЭСМ, длительной пролиферации и формированию растений-регенерантов. Полученные данные свидетельствуют о высокой репродуктивной способности некоторых генотипов *P. abies*, произрастающих на Петрозаводской ЛСП, и важности проведения исследований по их массовому тиражированию с перспективой дальнейшего использования данных генотипов в качестве растительного материала для целей лесовосстановления на Европейском Севере России.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института леса – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук” за помощь в сборе полевого материала и лично старшему химику лаборатории аналитической С.И. Тихомировой за помощь при культивировании клеточных линий ели европейской.

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета по государственному заданию Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук” (Институт леса – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pintilii R.-D., Andronache I., Diaconu D.C., Dobrea R.C., Zelěnáková M., Fensholt R., Peptenatu D., Drăghici C.-C., Ciobotaru A.-M. Using fractal analysis in modeling the dynamics of forest areas and economic impact assessment: maramures, county, romania, as a case study // *Forests*. 2017. V. 8. P. 25. <https://doi.org/10.3390/f8010025>
2. Keenan R.J., Reams G.A., Achard F., de Freitas J.V., Grainger A., Lindquist E. Dynamics of global forest area: results from the fao global forest resources assessment // *For. Ecol. Manag.* 2015. V. 352. P. 9. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.06.014>
3. Singha K., Sahariah D., Saikia A. Shrinking forest and contested frontiers: a case of changing human-forest interface along the protected areas of Nagaon District, Assam, India // *Eur. J. Geogr.* 2019. V. 10. P. 120.
4. Hazubaska-Przybyl T., Wawrzyniak M.K., Kijowska-Oberc J., Staszak A.M., Ratajczak E. Somatic embryogenesis of Norway spruce and Scots pine: possibility of application in modern forestry // *Forests*. 2022. V. 13. P. 155. <https://doi.org/10.3390/f13020155>
5. Välimäki S., Teyssier C., Tikkinen M., Delile A., Boizot N., Varis S., Lelu-Walter M.-A., Aronen T. Norway spruce somatic embryogenesis benefits from proliferation of embryogenic tissues on filter discs and cold storage of cotyledonary embryos // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. P. 1031686. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1031686>
6. Chalupa V. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. // *Commun. Inst. For. Cech.* 1985. V. 14. P. 57.
7. Hakman I., Fowke L.C., von Arnold S., Eriksson T. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce) // *Plant Sci.* 1985. V. 38. P. 53. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(85\)90079-2](https://doi.org/10.1016/0168-9452(85)90079-2)
8. Nagmani R., Bonga J.M. Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua* // *Can. J. For. Res.* 1985. V. 15. P. 1088. <https://doi.org/10.1139/x85-177>
9. Varis S. Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst // Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants / Eds. S. Jain, P. Gupta. Springer. 2018. P. 225
10. Hazubaska-Przybyl T., Ratajczak E., Obarska A., Pers-Kamczyc E. Different roles of auxins in somatic embryogenesis efficiency in two *Picea* species // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 3394. <https://doi.org/10.3390/ijms21093394>
11. Hazubaska-Przybyl T., Wojarczuk K. Somatic embryogenesis of selected spruce species (*Picea abies*, *P. omorika*, *P. pungens* “Glauca” and *P. breweriana*) // *Acta Soc. Bot. Pol.* 2008. V. 77. P. 189. <https://doi.org/10.5586/asbp.2008.023>
12. Krogstrup P., Eriksen E.N., Moller J.D., Roulund H. Somatic embryogenesis in sitka spruce (*Picea sitchensis*)

- sis (Bong.) Carr.) // Plant Cell Rep. 1988. V. 7. P. 594. <https://doi.org/10.1007/BF00272766>
13. von Arnold S., Woodward S. Organogenesis and embryogenesis in mature zygotic embryos of *Picea sitchensis* // Tree Physiol. 1988. V. 4. P. 291. <https://doi.org/10.1093/treephys/4.3.291>
 14. Hazubska T., Szczygiel K. Induction of somatic embryogenesis in spruce: *Picea omarika*, *P. pungens* “Glauca”, *P. breweriana* and *P. abies* // Dendrobiologia. 2003. T. 50. P. 17. <https://doi.org/10.5586/asbp.2008.023>
 15. Lelu M.-A., Bornman C.H. Induction of somatic embryogenesis in excised cotyledons of *Picea abies* and *Picea mariana* // Plant Physiol. Biochem. 1990. V. 28. P. 785.
 16. Liao Y.K., Liao C.K., Ho Y.L. Maturation of somatic embryos in two embryogenic cultures of *Picea morrisonicola* Hayata as affected by alternation of endogenous IAA content // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2008. P. 257. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9371-3>
 17. Li C.H., Liu B.G., Kim T.D., Moon H.K., Choi Y.-E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in elite genotypes of *Picea koraiensis* // Plant Biotechnol. 2008. V. 2. P. 259. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0073-4>
 18. Шалаев Е.А., Третьякова И.Н. Индукция соматического эмбриогенеза у ели аянской в культуре *in vitro* // Хвойные boreальной зоны. 2011. Т. 28. № 1-2. С. 69.
 19. Третьякова И.Н., Пак М.Э., Пахомова А.П., Шевелева И.С., Муратова Е.Н. Индукция соматического эмбриогенеза у ели сибирской (*Picea obovata*) в культуре *in vitro* // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. Т. 54. С. 6. <https://doi.org/10.17223/19988591/54/1>
 20. Gupta P.K., Durzan D.J. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*) // Plant Cell Rep. 1985. V. 4. P. 177.
 21. Litvay J.D., Verma D.C., Johnson M.A. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.) // Plant Cell Rep. 1985. V. 4. P. 325.
 22. Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В. Особенности инициации эмбрионов из мегагаметофитов *Pinus sibirica* в культуре *in vitro* // Онтогенез. 2014. Т. 45. С. 112. <https://doi.org/10.7868/s0475145014020074>
 23. Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Шуваев Д.Н., Пак М.Э. Перспективы микроклонального размножения хвойных в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез // Хвойные boreальной зоны. 2012. Т. 29. С. 180.
 24. Aronen T., Virta S., Varis S. Telomere length in Norway spruce during somatic embryogenesis and cryopreservation // Plants. 2021. V. 10. P. 416. <https://doi.org/10.3390/plants10020416>
 25. von Arnold S., Clapham D., Egertsdotter U., Mo L.H. Somatic embryogenesis in conifers – a case study of induction and development of somatic embryos in *Picea abies* // Plant Growth Regul. 1996. V. 20. P. 3.
 26. Krogstrup P. Embryolike structures from cotyledons and ripe embryos of Norway spruce (*Picea abies*) // Can. J. For. Res. 1986. V. 16. P. 664. <https://doi.org/10.1139/x86-116>
 27. Железниченко Т.В., Новикова Т.И. Влияние аскорбиновой кислоты и глутатиона на индукцию соматического эмбриогенеза *Picea pungens* Engelmann // Turczaninowia. 2017. Т. 20. №. 3. С. 27. <https://doi.org/10.14258/turczaninowia.20.3.4>
 28. Chatelain M., Drobniak S.M., Szulkin M. The association between stressors and telomeres in non-human vertebrates: a metaanalysis // Ecol. Lett. 2020. V. 23. P. 381. <https://doi.org/10.1111/ele.13426>
 29. von Arnold S.V., Eriksson T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta* // Can. J. Bot. 1981. V. 59. P. 870.
 30. Еришова М.А., Игнатенко Р.В., Новичонок Е.В., Чирва О.В., Галибина Н.А. Оптимизация условий стерилизации и культивирования эксплантов *Pinus sylvestris* (Pinaceae) // Растительные ресурсы. 2022. Т. 58. С. 431. <https://doi.org/10.31857/S0033994622040057>
 31. Ignatenko R.V., Chirva O.V., Ershova M.A., Galibina N.A. Some problems arising during the initiation of somatic embryogenesis in *Pinus sylvestris* L. // Environ. Sci. Proc. 2022. V. 22. P. 48. <https://doi.org/10.3390/IECF2022-13364>
 32. von Aderkas P., Label P., Lelu M.A. Charcoal affects early development and hormonal concentrations of somatic embryos of hybrid larch // Tree Physiol. 2002. V. 22. С. 431. <https://doi.org/10.1093/treephys/22.6.431>
 33. Szczygiel K., Hazubska-Przybyl T., Bojarczuk K. Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of the genera *Picea*, *Abies* and *Larix* // Acta Soc. Bot. Pol. 2007. V. 76. P. 7. <https://doi.org/10.5586/asbp.2007.001>
 34. Третьякова И.Н., Барсукова А.В. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы // Онтогенез. 2012. Т. 43. №. 6. С. 425.
 35. Stasolla C., Kong L., Yeung E.C., Thorpe T.A. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2002. V. 38. P. 93. <https://doi.org/10.1079/IVP2001262>
 36. Stasolla C., van Zyl L., Egertsdotter U., Craig D., Liu W., Sederoff R.R. The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos // Plant Physiol. 2003. V. 131. P. 49. <https://doi.org/10.1104/pp.015214>
 37. Häggman H., Jokela A., Krajnakova J., Kauppi A., Niemi K., Aronen T. Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction // J. Exp. Bot. 1999. V. 50. P. 1769. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.341.1769>