

УДК 581.1

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИЧНОСТИ ЭМБРИОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ *LARIX SIBIRICA*

© 2024 г. И. Н. Третьякова^{a, *}, Н. В. Орешкова^{a, b, c}, М. Э. Пак^a

^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра

“Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр

“Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, Россия

^cФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Сибирский федеральный университет”, Красноярск, Россия

*e-mail: culture@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 31.05.2024 г.

После доработки 04.07.2024 г.

Принята к публикации 09.07.2024 г.

В статье излагаются результаты исследования по генетической идентичности генотипов по 21 микросателлитному локусу дерева-донора, полученной от него эмбрионной клеточной линии (КЛ6), клонов, выращенных из КЛ6 и эмбрионной КЛ22.27.1, эксплант (зиготический зародыш) для которой был получен в результате контролируемого опыления клона пыльцой материнского дерева-донора. Проведенное генотипирование по ядерным микросателлитным локусам дерева-донора и КЛ6 показало частичную идентичность выявленных аллелей по большинству исследованных локусов. Изменчивость отдельных локусов в образцах свидетельствует о проявлении отцовского генотипа привнесенной пыльцой, которое неизбежно возникает при свободном опылении. Генотипы образцов хвои клонов полностью соответствовали КЛ6. У КЛ22.27.1 по большинству локусов были выявлены аллели, не встречающиеся в родительских генотипах. Только 2 локуса были идентичны родительским генотипам. Высокая частота мутаций в полученной клеточной линии свидетельствует о ее геномной нестабильности.

Ключевые слова: *Larix sibirica*, дерево-клон, клеточные линии, микросателлитные маркеры, соматический эмбриогенез

DOI: 10.31857/S0015330324060123, EDN: LWBDSR

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проводятся активные исследования по соматическому эмбриогенезу хвойных в культуре *in vitro* [1–4]. Применение соматического эмбриогенеза в сочетании с криоконсервацией и геномной селекцией послужило основой для получения хозяйственно ценных генетически тестированных клонов и элитных генотипов. На основе биотехнологии соматического эмбриогенеза было создано новое перспективное направление — сортовое плантационное лесовыращивание (Международная программа Multi-Varietal Forestry (MVF)) [5].

Для успешного сортового лесовыращивания необходимо проведение оценки генетической идентичности эмбрионных клеточных линий и клонированных из них растений. Высокие концентрации регуляторов роста в среде и длительность культивирования могут оказать влияние на качество эмбрионных культур и полученное

потомство. В ряде работ было показано, что эмбрионные культуры растений могут характеризоваться соматической изменчивостью [6, 7].

Молекулярные маркеры, в частности микросателлиты (SSR-маркеры), долгое время являются признанным инструментом для оценки популяционной изменчивости, анализа генетической структуры популяций, определения родства, ДНК-идентификации. Ввиду высокой скорости мутирования, кодоминантного характера наследования, равномерного распределения по геному и высокой воспроизводимости они получили широкое применение в изучении генетического разнообразия растений, в том числе хвойных видов [8, 9].

Соматический эмбриогенез — уникальное явление в развитии растений. Этот процесс является наглядным примером тотипотентности растительных клеток, и с помощью него можно изучать молекулярные основы эмбрионной

дифференцировки и регуляции развития растительных клеток *in vitro*. Применение клеточной и генной инженерии в бесполой репродукции через соматический эмбриогенез позволит контролировать этот процесс фундаментально, эффективно и точно.

Показано, что соматический эмбриогенез идет под строгим генетическим контролем. Только отдельные деревья доноры способны формировать эмбриогенные культуры и соматические зародыши *in vitro* [10–12].

Изучение генетической идентичности эмбриогенных культур и соответствие их родительским генотипам имеет большое значение не только для анализа соматической изменчивости, но и для исследования генома хвойных в целом.

В связи с этим, целью данной работы была оценка генетической идентичности, путем генотипирования микросателлитных (SSR) локусов, у некоторых эмбриогенных клеточных линий и деревьев-клонов лиственницы сибирской.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для исследования послужила хвоя материнского дерева-донора А4 и восьмилетних клонов № 8 и № 10, полученных из клеточной линии 6, а также эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) КЛ6 (возраст культуры 12 лет, свободное опыление дерева-донора А4) и КЛ22.27.1 (возраст культуры 1 год, контролируемое опыление дерева-клона 8 пыльцой дерева-донора А4, рис. 1).

Биотехнология соматического эмбриогенеза

Биотехнология соматического эмбриогенеза для *Larix sibirica* излагалась нами ранее [13].

Она включала 5 этапов: инициация ЭСМ, пролиферация эмбриогенных культур (регулярное субкультивирование), созревание соматических зародышей, прорастание и акклиматизация клонированных сеянцев [14].

Микросателлитный анализ

Препараты тотальной ДНК для микросателлитного анализа были выделены из хвои деревьев, клонов и эмбриональной суспензорной массы. Клеточные линии выделялись модифицированным методом с применением цетилтриметиламмонийбромида (СТАВ) [15]. Всего было проанализировано 4 образца в двух повторностях.

Оценку качества выделенной ДНК проводили при помощи спектрофотометра NanoPhotometer P 330 IMPLIN. Для оценки чистоты и качества нуклеиновых кислот при спектрофотометрическом измерении, чистоту образца определяли, исходя из соотношения оптических плотностей при длинах волн 230, 260 и 280 нм. Оптимальные значения соотношения A_{260}/A_{280} в наших образцах ДНК составляли 1.8–2.0. Значения менее 1.8 могут указывать на загрязнение образца полипептидами, более 2 – на возможную деградацию и наличие свободных нуклеотидов.

Оценка количества выделенной ДНК проводили с использованием настольного флуориметра Qubit (“Invitrogen”, США) (http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/cell_tissue_analysis/Qubit-all-file-types.Par.0519.File.dat/Qubit-2-Fluorometer-User-Manual.pdf) и буферных растворов, необходимых для работы Qubit dsDNA BR Assay Kit (“Invitrogen”, США). Для дальнейшей работы отбирали образцы высококачественной ДНК с концентрацией не менее 20–30 нг/мкл.

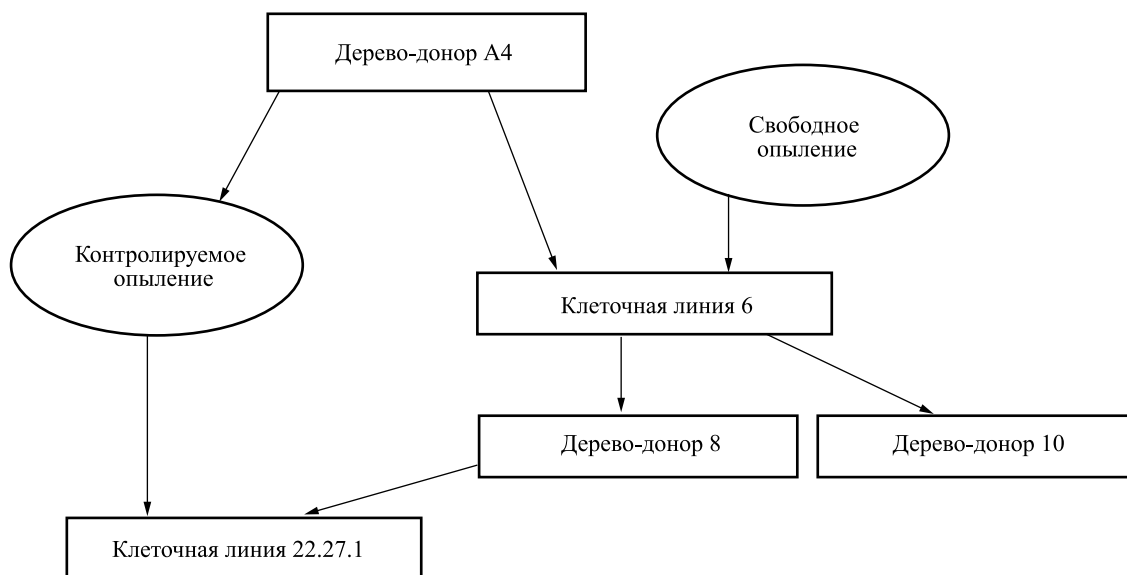


Рис. 1. Схема принадлежности исследуемых образцов.

Выделенную ДНК использовали для проведения ПЦР с 21 парой олигонуклеотидов-праймеров, разработанных ранее для микросателлитных последовательностей лиственницы японской (*L. kaempferi*) [16], лиственницы западной (*L. occidentalis*) [17] и лиственницы сибирской (*L. sibirica*) [18]. Описание отобранных для исследований микросателлитных локусов и условия ПЦР-амплификации приведены в табл. 1.

Для проведения ПЦР использовали готовые реакционные смеси для амплификации ДНК “GenePak PCR Core” (ООО “Лаборатория Изоген”, Россия), содержащие ингибированную для “горячего старта” Taq-ДНК-полимеразу, дидеоксинуклеозидтрифосфаты и хлорид магния. ПЦР-амплификацию проводили на приборе ДНК-амплификатор T100 ThermalCycler

(“Bio-Rad”, США). Программа амплификации включала первичную денатурацию в течение 1 мин при 94°C, затем 9 циклов “touchdown” с понижением на 1°C каждый цикл: 30 с при 94°C, 30 с при 63°C, 1 мин при 72°C, далее 24 цикла без “touchdown”: 30 с при 94°C, 30 с при 53°C, 30 с при 72°C; финальная элонгация составляла 10 мин при 72°C.

Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 6% полиакриламидном геле с использованием трис-EDTA-боратного электродного буфера в камерах для вертикального электрофореза. Гели окрашивали в растворе бромистого этидия и визуализировали с помощью системы гельдокументирования Gel Imager-2 (“Хеликон”, Россия). Молекулярный вес фрагментов определяли путем сопоставления со стандартным маркером в программе

Таблица 1. Ядерные микросателлитные локусы, отобранные для генотипирования образцов лиственницы сибирской.

Локус	Мотив и число его повторов в референсном геноме	Размер фрагмента, №	t°C отжига	Источник литературы
<i>bcLK 056</i>	AG ₍₂₀₎	174–200	Touchdown 63°–53°C	[16]
<i>bcLK 066</i>	TG ₍₁₂₎	155–172		
<i>bcLK 189</i>	AG ₍₁₇₎ AT(AG) ₍₇₎	162–196		
<i>bcLK 224</i>	AG ₍₁₇₎	152–168		
<i>bcLK 225</i>	GA ₍₂₀₎	180–213		
<i>bcLK 232</i>	AG ₍₁₉₎	142–178		
<i>bcLK 260</i>	TG ₍₁₄₎ AG ₍₉₎	115–126		[17]
<i>UBCLXtet_1–22</i>	TATC ₍₉₎ TA ₍₁₂₎	175–250		
<i>Ls_417667</i>	AAT ₍₁₆₎	207–243		[18]
<i>Ls_840190</i>	TAC ₍₁₅₎	216–249		
<i>Ls_954234</i>	ATT ₍₁₅₎	171–204		
<i>Ls_611965</i>	CAG ₍₁₈₎	222–276		
<i>Ls_752897</i>	AAG ₍₁₅₎	216–264		
<i>Ls_1247092(2)</i>	CTT ₍₁₉₎	201–228		
<i>Ls_3765334</i>	GAG ₍₁₇₎	174–213		
<i>Ls_1008427</i>	ATAG ₍₁₃₎	152–174		
<i>Ls_2672894</i>	TTTG ₍₁₁₎	152–164		
<i>Ls_2552367</i>	CTAT ₍₁₀₎	184–196		
<i>Ls_980491</i>	CTAT ₍₁₂₎	204–240		
<i>Ls_3952800</i>	TATG ₍₁₀₎	200–264		
<i>Ls_305132</i>	GTCGGA ₍₇₎	210–240		

Photo-Capt. В качестве маркера стандартных длин использовали ДНК плазмиды pBR322, обработанной рестриктазой *HpaII*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Коллекция пролиферирующих эмбриогенных культур (ЭК) лиственницы сибирской Института леса им. В.Н. Сукачева (ФИЦ КНЦ СО РАН) состоит из 54 клеточных линии (КЛ), полученных в разные годы (2008–2023 гг.) от шести генотипов в результате свободного и контролируемого опыления. Из них 22 клеточные линии в течение 8–14 и более лет продуцируют массовые соматические зародыши. Из КЛ6, инициированной в 2011 г., получены клоны деревьев лиственницы, которые отличались быстрым ростом и сверххранним развитием генеративных органов [4].

Проллиферирующая КЛ6, сохраняла жизнеспособность до 12 лет. У этой КЛ происходило образование глобулярных соматических зародышей и их размножение через кливаж (при регулярном субкультивировании). При переводе фрагментов эмбриогенной ткани этой клеточной линии на среду АИ для созревания с АБК (32 мг/л) зародыши в течение 45–60 дней созревали (13 ± 3 шт/г ЭСМ), а затем прорастали. Таким образом, способность к регенерации у КЛ6 сохранялась около 12 лет. КЛ 22.27.1 была получена в 2022 г. в результате контролируемого опыления дерева-клона № 8 пыльцой материнского дерева А4. КЛ22.27.1 успешно пролиферировала. Эмбриональная масса ее состояла из глобулярных зародышей (рис. 2а). На среде АИ с АБК шла дифференцировка соматических зародышей до их полного созревания (рис. 2б) и прорастания (рис. 2в). Число зрелых семядольных зародышей у КЛ22.27.1 составило – 26 ± 4.6 шт/г ЭСМ.

Микросателлитный анализ

В результате проведенного молекулярно-генетического анализа дерева-донора (А4), деревьев-клонов (№ 8 и № 10) и клеточных линий (КЛ6, КЛ22.27.1) лиственницы сибирской выяснилось, что 9 (*bcLK 066*, *bcLK 224*, *bcLK 232*, *bcLK 260*, *UBCLXtet 1–22*, *Ls 417667*, *Ls 3765334*, *Ls 2672894*, *Ls 980491*) из 21 локусов оказались мономорфными во всех исследованных образцах.

Остальные 12 локусов проявили себя как полиморфные (табл. 2). Причем по 8 локусам (*bcLK 056*, *bcLK 225*, *Ls 840190*, *Ls 752897*, *Ls 1247092*, *Ls 1008427*, *Ls 2552364* и *Ls 305132*) КЛ6 была гомозиготной. У локусов *bcLK 189*, *Ls 2552364*, *Ls 3952800* в КЛ6 только один аллель соответствовал материнскому дереву А4. По локусам *Ls 954234*, *Ls 611965* КЛ6 оказалась гетерозиготной с двумя аллелями идентичными мате-

ринскому генотипу. А по локусу *bcLK 225* у этой клеточной линии выявлены 2 аллеля, отличные от материнского дерева.

В целом, проведенное генотипирование по микросателлитным локусам КЛ6 показало, что выявленные аллели по большинству локусов соответствовали материнскому дереву-донору. Измененные аллели КЛ6, наблюдаемые у отдельных локусов, скорее всего, свидетельствуют о проявлении отцовского генотипа, которое неизбежно возникало при свободном опылении.

Анализ генотипов по тем же самым локусам у КЛ22.27.1 показал несколько иную картину. Стоит отметить, что КЛ22.27.1 была получена от дерева-клона № 8 при контролируемом опылении пыльцой дерева-донора А4. При генотипировании у КЛ22.27.1 только по локусу *Ls 611965* был выявлен генотип (222/213) полностью идентичный родительским деревьям. По локусам *bcLK 056*, *Ls 752897*, *Ls 1008427*, *Ls 305132* у клеточной линии был выявлен один аллель не встречающийся в родительских генотипах. В локусах *bcLK 189*, *Ls 840190*, *Ls 2552364*, *Ls 3952800* в гомозиготном генотипе КЛ22.27.1 сходство выявлено по одному из аллелей родительских деревьев. У локуса *Ls 954234* в гетерозиготном генотипе выявлен один аллель сходный с родительскими, а второй совершенно отличный. А в локусах *bcLK 225* и *Ls 1247092* были выявлены генотипы, отличающиеся от родительских образцов. В данном случае измененные аллели у КЛ22.27.1, наблюдаемые по ряду локусов скорее всего, свидетельствуют о высоком уровне геномной нестабильности и высокой частоте мутаций в полученной клеточной линии. Подобные результаты по изучению культиви-

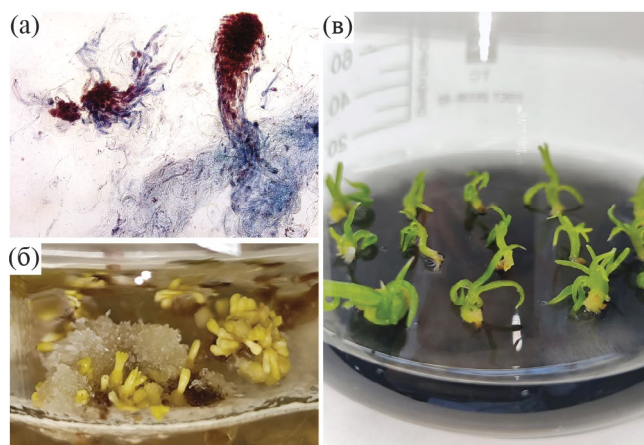


Рис. 2. Соматические зародыши (СЗ) лиственницы сибирской (КЛ22.27.1) на разных стадиях онтогенеза: (а) – глобулярные СЗ на среде для пролиферации, (б) – дифференцированные семядольные СЗ на среде для созревания, (в) – 14-дневные регенеранты на среде для прорастания.

Таблица 2. Полиморфные микросателлитные локусы и их генотипы при изучении дерева-донор, эмбриональных клеточных линий и деревьев-клонов.

Образцы	<i>bcLK 056</i>	<i>bcLK 189</i>	<i>bcLK 225</i>	<i>Ls₋840190</i>	<i>Ls₋954234</i>	<i>Ls₋611965</i>	<i>Ls₋752897</i>	<i>Ls₋1247092</i>	<i>Ls₋1008427</i>	<i>Ls₋2552364</i>	<i>Ls₋3952800</i>	<i>Ls₋305132</i>
Дерево-донор А4	147/147	168/168	206/206	240/240	207/183	222/213	249/249	217/217	152/152	182/214	295/267	222/222
Дерево-донор А4	147/147	168/168	206/206	240/240	207/183	222/213	249/249	217/217	152/152	182/214	295/267	222/222
КЛ6	147/147	168/164	182/182	240/240	207/183	222/213	249/249	217/217	152/152	182/182	295/295	222/222
КЛ6	147/147	168/164	182/182	240/240	207/183	222/213	249/249	217/217	152/152	182/182	295/295	222/222
Дерево-клон 8	147/147	168/164	182/182	240/237	207/207	222/213	249/249	217/217	152/152	182/214	295/295	222/222
Дерево-клон 8	147/147	168/164	182/182	240/237	207/207	222/213	249/249	217/217	152/152	182/214	295/295	222/222
Дерево-клон 10	147/147	168/164	182/182	240/240	207/207	222/213	249/249	217/217	152/152	182/214	295/295	222/222
Дерево-клон 10	147/147	168/164	182/182	240/240	207/207	222/213	249/249	217/217	152/152	182/214	295/295	222/222
КЛ 22.27.1	167/147	164/164	164/164	240/240	207/192	222/213	249/240	229/229	152/176	182/182	295/295	222/210
КЛ 22.27.1	167/147	164/164	164/164	240/240	207/192	222/213	249/240	229/229	152/176	182/182	295/295	222/210

рования *in vitro* мегагаметофитов лиственницы сибирской ранее были описаны в работе Крутовского К. В. с соавт. [19].

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка генетической идентичности эмбрионных клеточных линий очень важна для успешного создания клонированных растений [4, 6, 7]. В ряде работ было показано, что эмбрионные культуры видов хвойных могут характеризоваться генотипической нестабильностью [10, 20].

Высокая частота мутаций и генетическая нестабильность по ядерным микросателлитным локусам была ранее отмечена в эмбрионных клеточных линиях некоторых древесных – сосны приморской (*Pinus pinaster* Aiton) [21], сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) [20], пихты кефалинийской (*Abies cephalonica* Loudon) [22], дубов пробкового (*Quercus subres* L.) и чересчатого (*Quercus robur* L.) [23, 24].

У эмбрионных культур лиственницы Маршлинса (*Larix marschlinii* Grot) [25], лиственницы европейской (*L. decidua* Mill.) [26, 27], лиственницы японской (*L. leptolepis* Gonf.) [28], ели обыкновенной (*Picea abies* L.) [29], сосны черной (*Pinus nigra* J.F.Arnold) [30], сосны лучистой (*Pinus radiata* D.Don) [31] была обнаружена полиплоидия. Появление полиплоидных клеток при соматическом эмбриогенезе также было отмечено в культуре мегагаметофитов лиственницы европейской (*Larix decidua* Mill.) [32].

В проведенных нами ранее исследованиях по соматической изменчивости гаплоидной культуры тканей *in vitro*, полученной из мегагаметофитов лиственницы сибирской была выявлена высокая частота соматического мутагенеза и генетическая гетерогенность после двух месяцев культивирования. Из шести клеточных линий, только четыре линии оказались гаплоидными [19]. Однако при изучении гаплоидных культур хвойных видов следует принять во внимание тот факт, что мегагаметофиты этого класса растений представлены не только гаплоидными клетками. На стадии образования целлюлярного (клеточного) гаметофита, наряду с гаплоидными клетками, происходит образование диплоидных и даже полиплоидных клеток [33].

Вместе с тем, в других работах в некоторых эмбрионных культурах елей (*P. abies*, *P. glauca*, *P. mariana* × *P. glauca*, *P. orientalis*) и сосны приморской (*Pinus pinaster*) соматическая изменчивость не была обнаружена [34–37]. У ели обыкновенной генетических вариаций не было замечено на всех стадиях соматического эмбриогенеза – от ЭСМ до растений регенерантов [34]. Генетическая стабильность была так же обнаружена у регенерирующих растений сосны Эл-

лиота (*Pinus elliotii* Engelm.) [38]. У большинства регенерантов *Pinus massoiana* мутаций в тестируемых локусах SSR не наблюдалось [12].

Проведенный нами ранее цитогенетический анализ эмбрионных клеточных линий *L. sibirica* показал, что молодые КЛ в возрасте до 1 г. могут сохранять цитогенетическую стабильность и содержать в кариотипе нормальное для данного вида диплоидное число хромосом ($2n = 24$). В длительно пролиферирующих КЛ накапливаются мутации и происходит изменение числа хромосом ($2n = 25$; $2n = 26$). У таких КЛ сохраняется способность формировать соматические зародыши. В наших коллекционных клеточных линиях выделяется КЛ6, которая в возрасте 6–12 лет являлась цитогенетически стабильной с диплоидным числом хромосом $2n = 24$ [39, 40]. Генетическая стабильность КЛ6 была подтверждена микросателлитным анализом. Не соответствия материнскому генотипу данной КЛ наблюдалось только по двум аллелям из одиннадцати локусов [16]. Относительная генетическая стабильность КЛ6 была показана и в настоящем исследовании. Именно из этой клеточной линии были получены клоны деревьев № 8 и № 10, которые по данным микросателлитного анализа, полностью идентичны данной КЛ. Следовательно, такие клеточные линии можно использовать для получения посадочного материала в плантационном лесовыращивании при постоянном генетическом контроле.

Однако, проведенное контролируемое опыление клонов пыльцой дерева-донора и получение КЛ показало генетическую нестабильность у КЛ22.27.1, в которой наблюдалась высокая частота мутаций. С этой клеточной линией требуется дополнительная цитогенетическая работа.

Следовательно, проведение регулярного цитогенетического и микросателлитного контроля очень важно при клонировании растений через соматический эмбриогенез. При этом необходимо выявлять генетическую стабильность или нестабильность клеточных культур. Выявление клеточных линий с измененным хромосомным набором представляет большой интерес для генетики хвойных растений, а также вносит вклад в развитие теоретических аспектов репродуктивной биологии и в целом биологии развития растений.

Таким образом, соматический эмбриогенез является важной биотехнологией в размножении хвойных видов, в том числе для разработки и производства сортов деревьев с желательными селекционными признаками. Данная технология может быть успешно реализована в крупномасштабном коммерческом производстве. Наиболее важным преимуществом производства хвойных деревьев методом соматического эмбриогенеза является то, что эмбрионные

клеточные линии могут быть криогенно сохранены в ювенильном состоянии неограниченно долго, что было невозможно при других методах размножения деревьев.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научного проекта (№ 22-14-20008).

Статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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, New York, NY. 2016. P. 131. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_7
2. Chen T.T., Wu X.Q., Ye J.R., Shen L.Y., Zhu L.H. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration of disease-resistant *Pinus massoniana* Lamb. // J. Nanjing For Univ. 2019. V. 43. P. 1.
3. Peng Ch., Gao F., Wang H., Tretyakova I.N., Nosov A.N., Shen H., Yang L. Morphological and physiological indicators for screening cell lines with high potential for somatic embryo maturation at an early stage of somatic embryogenesis in *Pinus koraiensis* // Plants. 2022. V. 11. P. 1867. <https://doi.org/10.3390/plants11141867>
4. Tretyakova I.N., Park M.E. Collectible cell lines of *Larix sibirica* obtained by somatic embryogenesis and their ability to regenerate // Forest. 2023. V. 14. P. 1920. <https://doi.org/10.3390/f14091920>
5. Park Y.-S. Conifer somatic embryogenesis and multi-varietal forestry. In: Fenning T. (ed) Challenges and Opportunities for the World's Forests in the 21st Century // Forestry Sciences, Springer, Dordrecht. 2014. V. 81. P. 425. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7076-8_17
6. Bordallo P.N., Silva D.H., Maria J., Cruz C.D., Fontes E.P. Somaclonal variation on *in vitro* callus culture potato cultivars // Horti Bras. 2004. V. 22. P. 300. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362004000200027>
7. Iakshmanan V., Venkataramareddy S.R., Neelwarne B. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers // Electron J. Biotech. 2007. V. 10. P. 106. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue1-fulltext-12>
8. Krutovsky K.V., St.Clair J.B., Saich R., Hipkins V.D., Neale D.B. Estimation of population structure in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. *menziesii*) using allozyme and microsatellite markers // Tree Gen. Gen. 2009. V. 5. P. 641. <https://doi.org/10.1007/s11295-009-0216-y>
9. Echt C.S., Saha S., Krutovsky K.V., Wimalanathan K., Erpelding J.E., Liang Ch., Nelson C.D. An annotated genetic map of loblolly pine based on microsatellite and cDNA markers // BMC Genetics. 2011. V. 12. P. 1. <https://doi.org/10.1186/1471-12-1>
10. 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 Gen. Gen. 2006. V. 2. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s11295-005-0020-2>
11. Carneros E., Celestino C., Klimasewska K., Park Y.S., Toribio M., Bonga J.M. Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2009. V. 98. P. 165. <https://doi.org/10.1007/s11240-0-009-9549-3>
12. Xia X.R., Yang F., Ke X., Chen Y.M., Ye J.R., Zhu L.H. Somatic embryogenesis of masson pine (*Pinus massoniana*): initiation, maturation and genetic stability analysis at SSR loci // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2021. V. 145. P. 667. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02036-z>
13. Третьякова И.Н. РФ Патент 2456344. 2012.
14. Третьякова И.Н., Пак М.Э., Орешкова Н.В., Падутов В.Е. Регенерационная способность клеточных линий лиственницы сибирской в культуре *in vitro* // Известия РАН. Серия биол. 2022. N. 6. P. 585. <https://doi.org/10.31857/S1026347022050195>
15. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. V. 12. P. 12.
16. Isoda K., Watanabe A. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi* // Mol. Ecol. 2006. V. 6. P. 664. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01291.x>
17. Chen C., Liewlaksaneeyanawin C., Funda T., Kenawy A., Newton C.H., El-Kassaby Y.A. Development and characterization of microsatellite loci in western larch (*Larix occidentalis* Nutt.) // Mol. Ecol. Resources. 2009. V. 9. P. 843. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02289.x>
18. Орешкова Н.В., Бондар Е.И., Путинцева Ю.А., Шаров В.В., Кузьмин Д.А., Крутовский К.В. Разработка ядерных микросателлитных маркеров с длинными (трех-, четырех-, пяти- и шестину-клеотидными) мотивами для трех видов лиственницы на основе полногеномного *de novo* секвенирования лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) // Генетика. 2019. Т. 55. С. 418. <https://doi.org/10.1134/S1022795419040094>
19. Krutovsky K.V., Tretyakova I.N., Oreshkova N.V., Pak M.E., Kvitzko O.V., Vaganov E.A. Somaclonal variation of haploid *in vitro* tissue culture obtained from Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) megagametophytes for whole genome *de novo* sequencing // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2014. V. 50. P. 655. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9619-z>
20. Burg K., Helmersson A., Bozhkov P., Von Arnold S. Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine // Exp. Bot. 2007. V. 58. P. 687. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl241>

21. Marum L., Rocheta M., Maroco J., Oliveira M., Miguel C. Analysis of genetic stability at SSR loci during somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*) // Plant Cell Rep. 2009. V. 28. P. 673. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0668-9>
22. Aronen T.S., Krajnakova J., Haggman H., Ryynanen L.A. Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica* // Plant Sci. 1999. V. 142. P. 163.
23. Endemann M., Hristoforoglu K., Stauber T., Wilhelm E. Assessment of age-related polyploidy in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry // Biol. Plant. 2001. V. 44. P. 339. <https://doi.org/10.1023/A:1012426306493>
24. Lopes T., Pinto G., Loureiro J., Costa A., Santos C. Determination of genetic stability in long-term somatic embryogenic cultures and derived plantlets of cork oak using microsatellite markers // Tree Physiol. 2006. V. 26. P. 1145. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.9.1145>
25. Fourre J.L., Berger P., Niquet L., André P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches // Theor. Appl. Genet. 1997. V. 94. P. 159. <https://doi.org/10.1007/s001220050395>
26. Von Aderkas P., Bonga J.M. Formation of haploidembryoids of *Larix decidua*: early embryogenesis // Amer. J. Bot. 1988. V. 75. P. 690. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1988.tb13491.x>
27. Von Aderkas P., Anderson P. Aneuploidy and polyploidization in haploid tissue cultures of *Larix decidua* // Physiol. Plant. 1993. V. 88. P. 73. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01762.x>
28. Von Aderkas P., Klimaszewska K., Bonga J.M. Haploid and diploid embryogenesis in *Larix leptolepis*, *L. decidua* and their reciprocal hybrids // Can. J. For. Res. 1990. V. 20. P. 9.
29. Lelu M.A. Variations morphologiques et génétiques chez *Picea abies* obtenues après embryogenèse somatique // Annales de Recherches Sylvicoles. Association Forêt-Cellulose. 1987. P. 35.
30. Salajova T., Salaj J. Somatic embryogenesis in European black pine (*Pinus nigra* Arn.) // Biol. Plant. 1992. V. 4. P. 213.
31. O'Brien E.W., Smith D.R., Gardner R.C., Murray B.G. Flow cytometric determination of genome size in *Pinus* // Plant Sci. 1996. V. 115. P. 91.
32. Von Aderkas P., Pattanavibool R., Hristoforoglu K., Ma Y. Embryogenesis and genetic stability in long term megagametophyte-derived cultures of larch // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2003. V. 74. P. 27. <https://doi.org/10.1023/A:1024614209524>
33. Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных. Новосибирск: Наука Сибирское отделение. 1990. 283 с.
34. Mo L.M., von Arnold S., Lagererantz U. Morphogenic and genetic stability in long-term embryogenic cultures and somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) // Plant Cell Rep. 1989. V. 8. P. 375. <https://doi.org/10.1007/BF00270072>
35. Eastman P., Webster F.B., Pitel J.A., Roberts D.R. Evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) using culture morphology and isozyme analysis // Plant Cell Rep. 1991. V. 10. P. 425. <https://doi.org/10.1007/BF00232617>
36. Tremblay L., Levasseur C., Tremblay F.M. Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana* Pinaceae) and white spruce (*P. glauca* Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability // Am. J. Bot. 1999. V. 86. P. 1373. <https://doi.org/10.2307/2656920>
37. Harvenge L., Trontin J. F., Reymond I., Canlet F., Pâques M. Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis // Planta. 2001. V. 213. P. 8. <https://doi.org/10.1007/s004250100628>
38. Yang F., Xia X.R., Ke X., Ye J., Zhu L.H. Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii* Engelm): improving initiation of embryogenic tissues and maturation of somatic embryos // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2020. V. 143. P. 159. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01905-315>
39. 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* Ldeb. // Сибирский экологический журнал. 2023. Т. 5. С. 715. <https://doi.org/10.15372/SEJ20230512>
40. Третьякова И.Н., Парк М.Е., Иванитская А.С., Орешкова Н.В. Peculiarities of somatic embryogenesis of long-term proliferating embryogenic cell lines of *Larix sibirica* in vitro // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 800. <https://doi.org/10.1134/S1021443716050137>