

Соматический эмбриогенез представителей рода *Larix*: состояние и перспективы

В.Н. Шмаков¹, Ю.М. Константинов^{1, 2} 

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

² Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

 e-mail: yukon48@mail.ru

Аннотация. Клональное размножение хвойных с использованием соматического эмбриогенеза имеет существенное значение для селекции древесных видов, реализации программ лесоразведения и лесовосстановления. В сочетании с криоконсервацией соматический эмбриогенез создает основу для получения хозяйственно ценных линий клонов и элитных генотипов. Использование в промышленных масштабах в лесном хозяйстве таких генетически проверенных линий клонов может значительно увеличить продуктивность лесов по сравнению с любыми доступными традиционными методами улучшения древесных культур. Лиственница считается одним из основных кандидатов для широкомасштабного лесовосстановления не только за счет обширности занимаемых ареалов, но и благодаря уникальному качеству ее древесины, быстрому росту и высокой экологической пластичности. Однако большинство видов лиственницы характеризуется неравномерностью урожаев и чрезвычайно низким качеством семян. В связи с этим получение посадочного материала для лесовосстановления из семян лиственниц на семенных плантациях нецелесообразно, но может быть успешно реализовано в программах по лесоразведению с применением технологий соматического эмбриогенеза. Исследования по соматическому эмбриогенезу лиственницы проводятся уже более тридцати лет, что позволило накопить значительный опыт в данной области. К настоящему времени изучены условия инициации и поддержания эмбриогенных культур, формирования и развития соматических зародышей. Достигнут значительный прогресс в изучении как факторов, влияющих на эти процессы, так и молекулярных механизмов, лежащих в основе различных этапов эмбриогенеза. Однако имеющихся на сегодняшний день знаний о соматическом эмбриогенезе представителей рода *Larix* все еще недостаточно для разработки технологий получения селекционно-ценного растительного материала *in vitro*. В обзоре проведен анализ современного состояния исследований по проблеме соматического эмбриогенеза представителей рода *Larix*. Особое внимание уделено вопросам выбора эксплантов для соматического эмбриогенеза, составу сред для культивирования, зависимости потенциала соматического эмбриогенеза от продолжительности культивирования, генетическому контролю соматического эмбриогенеза. Ключевые слова: *Larix*; соматический эмбриогенез; генетический контроль.


Для цитирования: Шмаков В.Н., Константинов Ю.М. Соматический эмбриогенез представителей рода *Larix*: состояние и перспективы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6):575-588. DOI 10.18699/VJ20.651

Somatic embryogenesis in *Larix*: the state of art and perspectives

V.N. Shmakov¹, Yu.M. Konstantinov^{1, 2} 

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

 e-mail: yukon48@mail.ru

Abstract. Clonal propagation of conifers using somatic embryogenesis is essential for the selection of tree species, and for the implementation of afforestation and reforestation. In combination with cryopreservation, somatic embryogenesis creates the basis for the development of economically valuable lines of clones and elite genotypes. The industrial use of such genetically verified clone lines in forestry can significantly increase forest productivity compared to any conventional methods for improving tree crops that are available. Larch is considered as one of the main conifer candidates for large-scale reforestation, not only due to the vastness of its habitat, but also due to the unique quality of its wood, rapid growth and high ecological plasticity. However, the vast majority of larch species are characterized by uneven yields and extremely low seed quality. In this regard, obtaining planting material for reforestation from larch seeds on seed plantations is not advisable, but can be successfully implemented in afforestation programs using somatic embryogenesis technologies. Research on the somatic embryogenesis of larch has been conducted for over 30 years, which allowed considerable experience in this field to be accumulated. To date, the conditions for the initiation and maintenance of embryogenic cultures, as well as for the formation and development of somatic embryos have been determined. Significant progress has been made in the study of both the factors affecting these processes and the molecular mechanisms that underlie the various stages of embryogenesis. Nevertheless, despite the successes achieved, knowledge available today on the somatic embryogenesis of representatives of the genus *Larix* is still not enough to develop technologies for producing valuable plant-breeding material *in vitro*. This review analyzes the current state of

research on the problem of somatic embryogenesis of representatives of the genus *Larix*. Particular attention is paid to the choice of explants for somatic embryogenesis, the composition of the media for cultivation, the dependence of the potential of somatic embryogenesis on the duration of cultivation, and the genetic control of somatic embryogenesis. Key words: *Larix*; somatic embryogenesis; genetic control.

For citation: Shmakov V.N., Konstantinov Yu.M. Somatic embryogenesis in *Larix*: the state of art and perspectives. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):575-588. DOI 10.18699/VJ20.651

Введение

Представители рода *Larix* широко распространены в умеренной и холодных (субарктических и субальпийских) территориальных зонах планеты (Gowere, Richards, 1990; Kim, 2015). Род *Larix* включает от десяти до двадцати пяти видов, распространенных в Северном полушарии на трех континентах: в Северной Америке, Европе и Азии (Дылис, 1981; Koropachinsky, Milyutin, 2013; Pâques et al., 2013). В лесном фонде нашей страны леса с господством лиственницы занимают первое место и по площади (около 37 %, 264 млн га), и по запасу древесины (31 %, 25.2 млрд м³), существенно превосходя другие породы (Биоразнообразие..., 2010; Рысин, 2010). Вопрос о точном количестве видов лиственницы в определенной степени спорный из-за легкости скрещивания в естественных условиях и производства гибридов, которые, в свою очередь, продолжают гибридизироваться (Wei, Wang, 2003; Koropachinsky, Milyutin, 2013).

Лиственница считается одним из основных кандидатов для широкомасштабного лесовосстановления и генетического улучшения не только из-за обширности занимаемых ареалов, но также в силу уникального качества ее древесины, быстрого роста и высокой экологической пластичности (Gowere, Richards, 1990; Bailian, Wyckoff, 1994). Это единственный широко распространенный политипный листопадный род хвойных. Отчасти благодаря этому качеству многие лиственницы могут выдерживать экстремальные зимние температуры и низкий уровень влажности (Bonga et al., 1995). Что касается практического использования представителей рода *Larix* для лесовосстановления, то оно весьма затруднено из-за низкой продуктивности и качества семян (Lelu et al., 1994a; Zhang Y. et al., 2012; Третьякова и др., 2015). Следовательно, получать посадочный материал для лесовосстановления из семян лиственниц на семенных плантациях нецелесообразно. Задача может быть решена с помощью методов клонального размножения зародышей или проростков, полученных из ограниченного количества семян (Munoz-Concha, 2017). У *Larix* это достигается путем черенкования – укоренения стеблей, взятых от молодых саженцев и выращенных в условиях теплицы. Альтернатива данному методу – использование системы культивирования соматических зародышей, позволяющее получить неограниченное количество сеянцев с одинаковым генетическим составом, так как они являются производными одного семени (Attree, Fowke, 1993; Isah, 2016).

Соматический эмбриогенез может оказаться гораздо более эффективным, чем традиционное черенкование. Клеточные линии, продуцируемые соматическими зародышами, могут поддерживаться в ювенильном состоянии в течение неограниченного времени путем их криоконсервации. Криоконсервация позволяет прово-

дить длительные полевые испытания клонированных линий. Вместе с тем часть этих линий поддерживается в физиологическом ювенильном состоянии до тех пор, пока полевые испытания не покажут, какие из линий наиболее предпочтительны для массового производства потомства. Это делает возможным отбор внутри семей, что не применимо к укоренению черенками (Park, Bonga, 1992; Bonga, 2016). Кроме того, технология соматического эмбриогенеза может ускорить традиционные программы лесовосстановления за счет сокращения периода, необходимого для получения генетически улучшенных деревьев (Kim, 2015). К сожалению, для хвойных крупномасштабное использование соматического эмбриогенеза с целью практического размножения часто ограничивается лишь несколькими выбранными генотипами, а сам процесс остается трудоемким и дорогостоящим. Для его универсального применения необходимо решить еще много проблем (Bonga, 2016; Klimaszewska et al., 2016).

Настоящий обзор посвящен анализу состояния исследований соматического эмбриогенеза представителей рода *Larix*. Можно надеяться, что намечающееся благодаря применению методов геномики, транскриптомики, протеомики и метаболомики ускорение научного прогресса в этой области позволит разработать новые, более эффективные протоколы соматического эмбриогенеза для внедрения в программы селекции, лесоразведения и лесовосстановления.

Выбор типа экспланта для соматического эмбриогенеза лиственниц

Впервые метод соматического эмбриогенеза для представителей рода *Larix* был успешно применен в 1985 г. для *L. decidua* (Nagmani, Bonga, 1985). С тех пор достигнут большой прогресс в этой области для большинства видов лиственницы и ее гибридов (табл. 1). Как отмечено в многочисленных исследованиях, формирование эмбрионных культур зависит от типа и стадии развития, на которой находится эксплант.

Первоначально работы проводились в основном с использованием в качестве эксплантов мегагаметофитов *L. decidua*, *L. leptolepis* (= *L. kaempferi*) и их реципрокных гибридов *L. × eurolepis* и *L. × leptoeuropaea* (von Aderkas et al., 1987, 1990; von Aderkas, Bonga, 1988; Rohr et al., 1989), что позволило получить гаплоидные эмбрионные культуры и на их основе соматические зародыши. Формировавшиеся из последних растения чаще всего представляли собой миксоплоиды с преобладанием диплоидных клеток (von Aderkas, Anderson, 1993; von Aderkas, Bonga, 1993; von Aderkas et al., 2002). В это же время были предприняты успешные попытки инициации соматических зародышей из протопластов *L. decidua* и гибрида *L. × eurolepis* (*L. decidua* × *L. leptolepis*) (Klimaszewska, 1989a; von Ader-

Таблица 1. Вид *Larix*, тип экспланта и базовая среда культивирования, использованные для инициации соматического эмбриогенеза

Вид	Тип экспланта	Базовая среда	Частота индукции	Лит. источник
<i>L. decidua</i>	НПС33	LM	Н. д.	Cornu, Geoffrion, 1990
	НС33	MSG	20	von Aderkas et al., 1990
	333	MSG	5	Lelu et al., 1994c
	Мегагаметофит	MS, 1/2 MS, LM, 1/2 LM	0.3	Nagmani, Bonga, 1985
<i>L. leptolepis</i>	НС33	MSG	15	von Aderkas et al., 1990
	НПС33	LM, LP, MS	59–67	Kim et al., 1998
	333	LP, LM	22–38	Kim, 2015
	Мегагаметофит	MSG	2	von Aderkas et al., 1990
<i>L. × eurolepis</i>	НПС33	MSG, DCR, LM	6–12	Klimaszewska, 1989b
	НС33	MSG	2	Lelu et al., 1994c
<i>L. × leptoeuropaea</i>	НС33	MSG	26	»
	НПС33	MSG	62	»
	333	MSG	8	»
	СЗ, семядоли	MSG	12–98	Saly et al., 2002
	СЗ, хвоя	MSG	3	Lelu et al., 1994c
<i>L. occidentalis</i>	НС33	1/2 LM	70	Thompson, von Aderkas, 1992
	НПС33	1/2 LM	30	»
	333	1/2 LM	1	von Aderkas et al., 1995
<i>L. sibirica</i>	НПС33	MSG	67–98	Белоруссова, Третьякова, 2008
<i>L. gmelinii</i>	НПС33	1/2 MS, MSG	50–81	Третьякова, Барсукова, 2012
<i>L. sukaczewii</i>	НПС33	1/2 MS, MSG	98	»
<i>L. laricina</i>	НПС33	MSG	44	Klimaszewska et al., 1997
<i>L. olgensis</i>	НС33	MS, S	Н. д.	Song et al., 2016
<i>L. principis-rupprechtii</i>	НС33	S, B	Н. д.	Qi et al., 2000

Примечание. Тип экспланта: 333 – зрелый зиготический зародыш, НПС33 – незрелый предсемядольный зиготический зародыш, НС33 – незрелый семядольный зиготический зародыш, СЗ – соматический зародыш.

kas, 1992; Koralach, Zoglauer, 1995; Pattanavibool et al., 1998). Но исследования, проведенные в последующие годы, доказали, что соматический эмбриогенез инициируется наиболее эффективно из незрелых зиготических зародышей. Этот факт установлен как для видов рода *Larix*, так и для других представителей хвойных (Chen et al., 2010; Bonga, 2016; Sarmast, 2018; Шуклина, Третьякова, 2019). При этом чаще всего используются зиготические зародыши на предсемядольной и семядольной стадиях развития (Lelu et al., 1994a; Ogita et al., 1999a; Lu et al., 2005; Lelu-Walter, Râques, 2009), хотя получены положительные результаты при применении зиготических зародышей на более ранних или более поздних стадиях развития (Wang et al., 2007; Белоруссова, Третьякова, 2008; Wang, Yang, 2010). Имеется незначительный прогресс в инициации соматического эмбриогенеза из зрелых зародышей. Так, для гибрида *L. × leptoeuropaea* (*L. leptolepis* × *L. decidua*) хвоя соматических проростков давала эмбриональные массы с меньшей частотой (3 %), чем зрелые соматические зародыши того же генотипа (83 %) (Lelu et al., 1994c). Значительно больше данных об успешной инициации соматического эмбриогенеза из зрелых зародышей известно для представителей других таксономических групп хвой-

ных. Так, эмбриогенные культуры получены из зрелых зиготических зародышей таких видов, как *Pinus gerardiana*, *P. kesya*, *P. koraiensis*, *Abies alba*, *A. nordmanniana*, *A. balsamea*, *A. fraseri*, *Picea abies*, *P. glauca*, *P. morrisonicola*, *P. likiangensis*, *P. omorika* и др. (Yeung, Thorpe, 2005; Vooková, Kormuřák, 2007; Chen et al., 2010; Шуклина, Третьякова, 2019).

Существенный недостаток использования эксплантов из ювенильного материала (зиготические зародыши) для клонального размножения, в том числе с помощью соматического эмбриогенеза, заключается в невозможности применения материала от растений, генетический потенциал которых уже проявился фенотипически (взрослые деревья со строго определенными характеристиками) (Bonga, 2017). Поэтому в качестве первичного экспланта наибольший интерес представляют вегетативные части растений (сегменты побегов и зрелой хвои). Так, в ряде работ говорится о возможности получения соматического эмбриогенеза из растительного материала от взрослых растений хвойных: примордиальных меристем 2- и 10-летних соматических растений *Picea glauca* (Klimaszewska et al., 2011; Klimaszewska, Rutledge, 2016), хвои соматических растений в возрасте от 2 мес. до 3 лет *Picea abies*

(Harvengt et al., 2001), вегетативных апексов побегов, адвентивных почек и хвой взрослых деревьев *Pinus kestiya*, *P. roxburghii*, *P. sylvestris*, *P. patula*, *P. wallichiana*, *P. pinea*, *P. radiata*, *P. pinaster* (Trontin et al., 2016a; Шуклина, Третьякова, 2019).

Трудности в использовании растительного материала от взрослых деревьев связаны с тем, что на вегетативной и репродуктивной стадии их развития происходят существенные физиологические, биохимические, генетические и другие изменения в растительных тканях. Это значительно снижает вероятность и частоту эмбриогенеза из эксплантов взрослых деревьев (Klimaszewska et al., 2011). При этом с увеличением зрелости экспланта постепенно репрессируется генетическая программа для индукции эмбриогенной ткани, а после того как образуется апикальная меристема, потенциал для получения эмбриогенной ткани полностью нарушается (Bonga et al., 2010).

Среди прочих негативно действующих факторов можно отметить следующие. Из-за присутствия множества соединений, образуемых и выделяемых в питательные среды растениями, происходит ингибирование деления, роста клеток, наблюдаются нарушения эмбриогенного ответа и нормальной экспрессии генов, участвующих в индукции соматического эмбриогенеза (Isah, 2016; Sarmast, 2018). Одной из важных причин названных нарушений является изменение паттерна метилирования геномной ДНК (von Aderkas, Bonga, 2000). Для преодоления неспособности материала взрослых растений формировать эмбриогенную культуру в ряде случаев применяют процедуру реювенилизации тканей. Для этого экспланты помещают в различного рода стрессовые условия: голодание, холододовая обработка при низких положительных температурах или использование в составе сред для культивирования тяжелых металлов (Bonga, 1996, 1997; Wendling et al., 2014). Процесс реювенилизации стимулируется изменением рН среды культивирования, использованием ферментов деградации клеточной стенки, понижением уровня эндогенных антиоксидантов (глутатион, аскорбиновая кислота, витамин Е) путем изменения содержания экзогенных ауксинов (von Arnold, 1987; Earnshaw, Johnson, 1987; Mo et al., 1996). Показано, что воздействие ауксина повышает уровень метилирования ДНК, что в свою очередь приводит к стимуляции деления клеток, их дедифференцировке, тем самым стимулируя инициацию соматического эмбриогенеза (von Aderkas, Bonga, 2000).

Кроме того, ткани взрослых деревьев хвойных пород содержат множество поверхностных микроорганизмов, которые снижают способность тканей к регенерации (Третьякова и др., 2014). К сожалению, до настоящего времени не разработаны эффективные методы борьбы с таким бактериальным загрязнением. Известно лишь несколько процедур, позволяющих уменьшить, но не устранить полностью такое загрязнение в системах культуры тканей растений (Sarmast, 2018).

Несмотря на многолетние усилия исследователей (Chalupa, 1989; Bonga, Pond, 1991; Bonga, 1996, 2004; Ewald, 1998), соматический эмбриогенез от зрелых деревьев лиственницы до сих пор не получен и остается актуальной задачей для будущих исследований (von Aderkas, Bonga, 2000; Klimaszewska et al., 2016).

Влияние генотипа исходного растения на соматический эмбриогенез лиственниц

По всей вероятности, основным фактором (помимо типа экспланта), который определяет, будут ли формироваться соматические зародыши, является генотип родительских деревьев (Третьякова, Барсукова, 2010; Bonga et al., 2010). При этом на инициацию соматического эмбриогенеза у многих хвойных влияет аддитивная генетическая изменчивость, предоставляющая возможность селекции на усиление признака инициации соматического эмбриогенеза (Park, 2002). Соматический эмбриогенез можно получить только у отдельных генотипов, что значительно затрудняет использование этой технологии для практического крупномасштабного размножения хвойных.

Эксперименты по изучению генетического контроля инициации соматического эмбриогенеза проводились на представителях нескольких родов хвойных, в том числе рода *Larix* (Klimaszewska et al., 2016). В работе И.Н. Третьяковой с коллегами (Третьякова и др., 2015) было задействовано 200 деревьев *L. sibirica*, и только один генотип дал начало стабильно поддерживаемой эмбриогенной культуре. Анализ полученных результатов свидетельствует о более сильном материнском, чем отцовском, влиянии на инициацию культуры (Третьякова и др., 2015; Klimaszewska et al., 2016). Материнский эффект на стадии инициации может быть объяснен как генотипом, так и стадией развития или физиологического состояния материнского дерева и унаследованными материнскими аллелями зиготического зародыша (Niskanen et al., 2004).

Состав сред для культивирования эмбриогенных масс и соматических зародышей лиственниц

На рост и развитие эмбриогенной культуры хвойных, в том числе представителей рода *Larix*, сильное влияние оказывает состав питательной среды. Выбор солей (микро- и макроэлементов) и органических составляющих, коррекция их баланса и концентраций играют важную роль как в инициации каллусогенеза, так и в дальнейшем поддержании полученной культуры *in vitro* (Pâques et al., 2013). При этом подбор состава питательных сред часто зависит от видовой принадлежности растения и типа используемого в качестве экспланта материала (Isah, 2016).

В зависимости от решаемых задач и исходного растительного материала, в работах по соматическому эмбриогенезу лиственниц применяются следующие базовые среды (см. табл. 1): LM (полный или половинный состав (1/2 LM)) (Litvay et al., 1985), MS (полный или половинный состав (1/2 MS)) (Murashige, Skoog, 1962), MSG (Becwar et al., 1990), LP (Quoirin, Lepoivre, 1977), S (Ewald et al., 1995), B (Ewald et al., 1997), АИ (Третьякова и др., 2012), DCR (Gupta, Durzan, 1985), WPM (Lloyd, McCown, 1980). На всех этапах культивирования базовая среда дополняется такими органическими соединениями, как: L-глутамин в концентрации от 0.05 до 1.5 г/л; мио-инозитол (0.1–1.0 г/л); гидролизат казеина (0.5–1.0 г/л); аскорбиновая кислота (0.4 г/л) (Cornu, Geoffrion, 1990; von Aderkas et al., 1990; Lelu et al., 1994c; Klimaszewska et al., 1997; Третьякова и др., 2015; Kim, 2015).

Ключевыми компонентами питательной среды, контролирующими весь процесс соматического эмбриогенеза, являются фитогормоны (von Aderkas et al., 2001; Vondráková et al., 2016). Их состав и соотношения зависят от стадии развития соматических зародышей. На этапе инициации эмбриогенных масс обязательно присутствие в среде эндогенных ауксинов в сочетании с цитокининами. Исключение составляют виды *Abies*, у которых для инициации эмбриогенеза чаще всего необходимы только цитокинины (Pullman, Frampton, 2018). В большинстве исследований по эмбриогенезу у представителей рода *Larix* описано использование 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (1.0–2.0 мг/л) совместно с 6-бензиламинопурином (0.5–1.0 мг/л) (Klimaszewska, 1989a, b; Korlach, Zoglaue, 1995; Lelu-Walter, Pâques, 2009; Tretyakova et al., 2019). В ряде работ упоминается применение в качестве ауксинов нафтилуксусной кислоты, пиклорама или 4-хлорфеноксиуксусной кислоты в концентрации 1.0 мг/л (Qi et al., 2004; Kim, 2015) и кинетина (0.1–5.0 мг/л) как представителя цитокининов (Cornu, Geoffrion, 1990; Qi et al., 2000; Song et al., 2016). Индолилуксусная кислота, как показано для *L. leptolepis*, играет важную роль в контроле прорастания соматических зародышей (Li Z. et al., 2017a, b).

На этапе созревания соматических зародышей наиболее важным компонентом питательной среды становится абсцизовая кислота (Lelu et al., 1994b, 1995). Оптимальное содержание этого фитогормона (от 0.01 до 32.0 мг/л) и сроки культивирования соматических зародышей в его присутствии (1–4 недели) значительно варьируют у разных видов лиственниц (Label, Lelu, 1994, 2000; von Aderkas et al., 1995, 2002, 2015; Gutmann et al., 1996; Klimaszewska et al., 1997; Ogita et al., 1999b; Kim, Moon, 2007; Третьякова и др., 2012; Song et al., 2018). Для улучшения процесса созревания соматических зародышей иногда совместно с абсцизовой кислотой используют: индолилмасляную кислоту в концентрации 1.0 мг/л (Третьякова и др., 2012); 5.0 мг/л ингибитора транспорта ауксина 2-(п-хлорофенокси)-2-метилпропионовой кислоты (PCIB); 5.0 мг/л флороглюцинола (синергист ауксина) (Kim, Moon, 2009) или нитрат серебра (2.0–5.5 мг/л) (Saly et al., 2002; Song et al., 2018). Улучшение качества соматических зародышей, их прорастания и формирования полноценных растений достигается путем сочетания абсцизовой кислоты с активированным углем (0.5–10 г/л), который вводится в питательную среду на стадии предсозревания соматических зародышей (Harry et al., 1991; Qi et al., 2004; Umehara et al., 2004; Третьякова и др., 2016; Klimaszewska et al., 2016). Учитывая то, что созревающие соматические зародыши должны подвергаться воздействию водного стресса аналогично развивающимся зиготическим зародышам *in vivo*, для снижения доступной воды в питательную среду вводят такие вещества, как полиэтиленгликоль 3000–4000 в концентрации 4–10 %, сахарозу в повышенной концентрации (3–8 %) или мальтозу (3 %), гелеобразователи гелрайт или фитагель (0.3–0.4 %) (Klimaszewska et al., 1997; Ma et al., 1998; Qi et al., 2004; Lu et al., 2005; Teyssier et al., 2011; Третьякова, Барсукова, 2012; Третьякова и др., 2012; Song et al., 2018). На начальных стадиях инициации развития эмбриогенной культуры концентрация используемой сахарозы составляет 1–3 %

(von Aderkas et al., 1987; Lelu et al., 1994c; Kim, 2015), а в качестве гелеобразователя применяется чаще всего агар в концентрации 0.7 % (Klimaszewska, 1989b; von Aderkas et al., 1990; Белорусова, Третьякова, 2008).

Помимо изучения положительного действия определенных соединений, входящих в состав сред для культивирования, на различные стадии соматического эмбриогенеза, исследованы также вещества, присутствие которых в среде негативно влияет на культуру *in vitro*. Для *L. × leptoeuropaea* было показано, что обогащение атмосферы этиленом или добавление 2-хлорэтилфосфоновой кислоты (5.0 и 10.0 мг/л) или 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (1.0–10.0 мг/л) в среду культивирования сильно снижало индукцию вторичного соматического эмбриогенеза (Saly et al., 2002). Ванилилбензиловый эфир и 4-[(фенилметокси)метил]фенол ингибировали раннее развитие соматических зародышей, а именно дифференцировку суспензоров, у *L. leptolepis* (Umehara et al., 2005, 2007). Эти вещества присутствуют в достаточных для ингибирования количествах в суспензионной культуре с высокой плотностью клеток и в значительно меньшей, не оказывающей негативного влияния концентрации – в культуре с низкой плотностью клеток (Umehara et al., 2004).

К настоящему времени накоплен обширный опыт в исследуемой области, но в связи с низкой эффективностью соматического эмбриогенеза представителей рода *Larix* работы по оптимизации состава питательной среды, включая специфические сахара, витамины, органические кислоты, модификаторы окислительно-восстановительного потенциала и др., продолжаются.

Зависимость потенциала соматического эмбриогенеза лиственниц от возраста культуры *in vitro*

При инициации и поддержании эмбриогенной культуры значительное внимание уделяется эффективности получения соматических зародышей в культуре *in vitro* в течение длительных периодов времени. Этот вопрос имеет как фундаментальное, так и прикладное значение. При лесовосстановлении требуется длительное тестирование регенерированных деревьев из отдельных клеточных линий для последующего их широкомасштабного использования. Следовательно, линии культуры ткани должны поддерживаться в функционально неизменном виде до тех пор, пока элитные характеристики полученных из них регенерантов не будут подтверждены экспериментально (Charest, Klimaszewska, 1995). Однако возраст эмбриогенной культуры, т.е. количество субкультивирований, может отрицательно влиять на ее способность к регенерации полноценных соматических зародышей (Pâques et al., 2013). Это прежде всего связано с увеличением скорости и накоплением большого количества мутаций и общей генетической нестабильностью длительно поддерживаемых культур *in vitro* в результате соматической изменчивости (Krutovsky et al., 2014; Klimaszewska et al., 2016).

Как установлено, соматическая изменчивость проявляется на морфологическом, цитологическом (количество и структура хромосом), биохимическом (метаболические нарушения) и молекулярно-генетическом (геномы ядра и органелл) уровнях (Cyr, Klimaszewska, 2002). При этом

частично дифференцированные культуры, такие как эмбриональные массы *in vitro*, демонстрируют меньшую вариабельность, чем истинные культуры каллусного типа (Сур, 1999). К тому же эмбрионные культуры хвойных, в отличие от покрытосеменных, считаются генетически более стабильными (Isabel et al., 1996). Ряд исследований по оценке уровня соматклональной изменчивости в эмбрионных культурах хвойных показал отсутствие каких-либо соматклональных изменений в эмбрионных тканях и у соматических зародышей *Picea abies*, *Picea glauca* × *P. engelmannii*, *Pinus pinea*, *Picea mariana* (Heinze, Schmidt, 1995; Isabel et al., 1996; Cuesta et al., 2008; Krutovsky et al., 2014). В целом эмбрионные культуры представителей рода *Larix* обладают высокой стабильностью (Klimaszewska et al., 2016). Так, у *L. × eurolepis* эмбрионная линия была стабильной и после 4 лет субкультивирования (Pâques et al., 2013), а у *L. leptolepis* – в течение 9 лет (Wang et al., 2007; Lelu-Walter, Pâques, 2009). В последнем случае эмбрионные культуры со временем становились неэмбрионными (Li W. et al., 2013). На протяжении 9 лет не терялась эмбрионность культур *L. decidua*, полученных из гаплоидного материала – мегagamетофитов (Pattanavibool et al., 1995). При этом за время наблюдений почти все линии удвоили ($2n = 24$) число хромосом, но и гаплоидные, и дигаплоидные линии оставались эмбрионными. Дальнейшие исследования (17-летняя культура) показали, что ни одна линия не сохраняла постоянную эмбрионность в течение всего периода культивирования (von Aderkas et al., 2003). В нескольких линиях эмбрионный потенциал был потерян полностью, а в других потеря была временной, так как наблюдалось периодическое восстановление эмбриогенеза. Проллиферативная активность 15 эмбрионных клеточных линий *L. sibirica* сохранялась в течение 2–8 лет (Пак и др., 2016; Третьякова, Пак, 2018), а плоидность хромосом клеток этих линий не менялась до 2 лет культивирования (Третьякова et al., 2017). Далее были выявлены разброс хромосомных чисел от 24 до 30 и большое количество патологий митоза и клеток с микроядрами (Горячкина и др., 2017). Однако имелись отдельные клеточные линии, у которых генетическая стабильность культур сохранялась до 7 лет. По данным микросателлитного анализа, эмбрионные линии характеризовались слабой аллельной изменчивостью (Третьякова et al., 2017). Тем не менее способность соматических зародышей из длительно поддерживаемых линий к созреванию и прорастанию со временем уменьшалась (Третьякова и др., 2016).

Длительное культивирование эмбрионных масс, приводящее к формированию соматических зародышей и впоследствии растений, может вызывать редкие фенотипические аномалии у *Picea glauca* и *P. mariana* (Isabel et al., 1996; Tremblay et al., 1999) или генетическую нестабильность у *Pinus sylvestris* и *P. pinaster* (Burg et al., 2007; Marum et al., 2009). Изменения в относительном содержании митохондриальной ДНК наблюдались в эмбрионных тканях у *Larix leptolepis*, *L. decidua* и их реципрокных гибридов (DeVerno et al., 1994). Таким образом, несмотря на достаточно высокую стабильность эмбрионных культур представителей рода *Larix*, со временем качество и количество соматических зародышей

изменяются. В связи с этим длительное поддержание данных культур методом регулярных субкультивирований не представляется целесообразным.

Криоконсервация эмбрионных линий

Помимо основной проблемы – снижения или потери эмбрионного потенциала культуры на фоне возможных генетических изменений при длительном поддержании *in vitro*, следует учитывать также высокие трудозатраты при необходимости регулярных субкультивирований и увеличение риска потери материала из-за загрязнения, человеческих ошибок или технических сбоев.

Решением этих проблем может стать периодическая повторная инициация эмбрионных культур. Однако эта достаточно трудоемкая и дорогостоящая процедура не может быть использована для видов, в том числе хвойных, у которых наиболее подходящие экспланты для индукции эмбрионного каллуса доступны лишь в ограниченный период времени года (Ozudogru, Lambardi, 2016).

Другим подходом для преодоления вышеназванных трудностей является применение техники уменьшения скорости роста и увеличения интервалов субкультуры путем инкубации при пониженной температуре (4–5 °C) и низкой интенсивности света (например, 10 мкмоль/м²/с), а также изменения осмотического потенциала среды консервирования, уменьшения поступления неорганических питательных веществ, добавления замедлителей роста в культуральную среду (Hassan, 2017). Хранение в условиях минимального роста – очень простой метод, позволяющий сохранять культуру *in vitro* в течение периода от 6 до 12 месяцев, но не более 3 лет, в зависимости от вида растения (Ozudogru et al., 2010). Более длительное выдерживание культур при таких условиях приводит к резкому падению частоты регенерации растений и повышению числа генетических изменений.

Для долговременного стабильного сохранения эмбрионных культур идеален метод криоконсервации, который обеспечивает их сохранность и стабильность (Charest, Klimaszewska, 1995). Эмбрионные культуры могут храниться в жидком азоте при –196 °C или при –150 °C в паровой фазе азота неограниченно долго без потери ювенильности (Park et al., 1998). Этот метод обеспечивает длительное хранение различных типов тканей и органов, включая кончики побегов, соматические и зиготические зародыши, цельные семена, пыльцу, пыльники и почки (Vendrame, 2018).

Существуют различные типы методов криоконсервации. Традиционные методы основаны на дегидратации, вызванной замораживанием. Среди методов криоконсервации, доступных для эмбрионных культур, наиболее распространено медленное охлаждение материала. В последние годы этот подход позволил разработать эффективные протоколы сохранения материала без потери или с незначительной потерей регенерационной способности в течение продолжительного времени (до 20 лет) для различных видов как широколиственных (*Citrus* ssp., *Hevea brasiliensis*, *Fraxinus excelsior*, *Quercus suber*, *Q. robur* и др.), так и хвойных деревьев (*Abies cephalonica*, *Picea abies*, *P. glauca*, *P. sitchensis*, *Pinus caribaea*, *P. nigra*, *P. patula* и др.) (Ozudogru, Lambardi, 2016).

Методы криоконсервации разработаны и успешно применяются для гибридов лиственницы *L. × eurolepis* и *L. × leptoeuropaea* (Klimaszewska et al., 1992; Pâques et al., 2013). С их помощью удалось добиться возобновления роста всех протестированных линий после их размораживания. Кроме того, криоконсервация как таковая и ее продолжительность (не менее 18 лет) не оказывали заметного влияния на продуктивность соматических зародышей (Lelu-Walter, Pâques, 2009). На протяжении многих лет криоконсервированные линии гибридных лиственниц используются в экспериментах в обычном режиме. Однако до настоящего момента нет данных о применении методов криоконсервации для длительного сохранения эмбрионных линий основной части видов лиственниц, кроме указанных двух гибридных форм. В то же время успешный опыт использования методов криосохранения для представителей других родов хвойных открывает возможности для более широкого применения этой технологии длительного сохранения эмбрионных культур видов лиственниц.

Генетический контроль соматического эмбриогенеза лиственниц

При изучении молекулярных механизмов процесса соматического эмбриогенеза большое внимание уделяется профилированию всего генома на основе транскриптомики, протеомики и метаболомики (Trontin et al., 2016b). Установлено, что в ходе соматического эмбриогенеза *in vitro* клеточных культур видов *Larix* происходят изменения организации митохондриального генома и относительной представленности некоторых геномных областей (De Verno et al., 1994). Для исследования различных этапов соматического эмбриогенеза *L. leptolepis* с использованием метода секвенирования РНК созданы 454 библиотеки, содержащие последовательности кДНК (Zhang Y. et al., 2012). Обнаружено, что 25773 выявленных транскрипта связаны со 160 биохимическими путями первичного и вторичного метаболизма. 78 % генов, экспрессирующихся в эмбриогенезе, были полностью гомологичны таковым *Arabidopsis thaliana*. Гены транскрипционных факторов *LaMYB33* и *LaSCL6* важны для сохранения компетентности и поддержания состояния эмбрионности у *L. leptolepis* как части эпигенетического комплекса регуляции экспрессии генов (Li S. et al., 2013; Li W. et al., 2014). На стадии раннего эмбриогенеза большую роль играют гены *LdLECI* и *LdWOX2* (*L. decidua*) (Rupps et al., 2016), *LaSERK1* (*L. leptolepis*) (Li L. et al., 2013). Экспрессия генов *LaNFYA1*, *LaNFYA2*, *LaNFYA3* и *LaNFYA4* имеет важное значение на ранних стадиях детерминации и в начале созревания соматических зародышей (*L. leptolepis*) (Zhang L. et al., 2014). На предсемядольной стадии развития соматических зародышей необходима экспрессия генов антиоксидантной защиты – *SOD*, *CAT* и *APX* (*L. leptolepis*) (Zhang S. et al., 2010a). На стадиях инициации и позднего созревания соматических зародышей увеличивается экспрессия генов, связанных с синтезом или транспортом ауксинов, – *LaHDZ31*, *32*, *33* и *34* (*L. leptolepis*) (Li S. et al., 2013; Li Z. et al., 2017b), *LaNIT* (*L. leptolepis*) (Li Z. et al., 2018). Гены *LmAP2L1* (*L. × leptoeuropaea*) (Guillaumot et al., 2008), *LkBBM* (*L. leptolepis* × *L. olgensis*) (Li K. et al.,

2014), *LdBBM* и *LdSERK* (*L. decidua*) (Rupps et al., 2016) наиболее активны на стадии прорастания соматических зародышей. При этом ген транскрипционного фактора *LmAP2L2* конститутивно экспрессируется на всех стадиях эмбриогенеза (*L. × leptoeuropaea*) (Guillaumot et al., 2008).

Стратегия высокопроизводительного секвенирования была использована для идентификации миРНК, участвующих в регуляции соответствующих генов-мишеней на отдельных стадиях соматического эмбриогенеза у *L. leptolepis* (Zhang J. et al., 2012). Для 60 миРНК установлено более 100 генов-мишеней. Дифференциальная экспрессия различных миРНК (miR156, miR159, miR160, miR162, miR165, miR166, miR167, miR168, miR169, miR171, miR172, miR397, miR398) была обнаружена в эмбрионных и неэмбрионных культурах *L. leptolepis* (Zhang J. et al., 2012; Zhang L. et al., 2014; Li S. et al., 2013; Li W. et al., 2013, 2014). У хвойных миРНК регулируют активность большинства генов транскрипционных факторов, в том числе генов, участвующих в процессе эмбриогенеза. Фактор транскрипции *MYB* (*LaMYB33*) идентифицирован в качестве гена-мишени для miR159 (Li W. et al., 2013). В свою очередь гены *LaHDZ31*, *LaHDZ32*, *LaHDZ33* и *LaHDZ34* регулируются miR165/166 (Li Z. et al., 2016). Мишенями miR169 являются *LaNFYA1*, *LaNFYA2*, *LaNFYA3* и *LaNFYA4* (Zhang L. et al., 2014), а гомолог *Larix SCARECROW-LIKE 6* (*LaSCL6*) – мишенью для miR171 (Zang et al., 2019). Посттранскрипционная регуляция этих генов с помощью миРНК может участвовать в поддержании потенциала развития, как описано выше, на различных стадиях соматического эмбриогенеза представителей рода *Larix*. Идентифицированные у видов *Larix* гены, играющие важную роль в соматическом эмбриогенезе на разных его стадиях, суммированы в табл. 2.

Обсуждая перспективы геномных исследований соматического эмбриогенеза клеточных культур видов *Larix*, можно отметить принципиальную важность выяснения таких важных в теоретическом и прикладном отношении вопросов, как: 1) структурно-функциональные изменения митохондриального генома лиственниц, происходящие в культуре *in vitro*, и возможность их обращения; 2) генетическая регуляция взаимодействия геномов ядра, митохондрий и хлоропластов во время соматического эмбриогенеза. Очевидно, что от решения названных вопросов во многом будет зависеть успешность разработки этой технологии для культуры клеток *in vitro*.

Проведены работы по определению изменений протеома и состава жирных кислот на различных стадиях развития эмбрионных масс и соматических зародышей ряда видов лиственницы. В результате сравнительного протеомного анализа эмбрионных и неэмбрионных каллусов *L. principis-rupprechtii* обнаружено 503 белка, из них дифференциально регулировался 71 (Zhao et al., 2015b). Кроме того, белки анализировали на трех стадиях развития соматических зародышей того же вида лиственницы: стадии проэмбрионной массы, стадии глобулярных и семядольных зародышей. Идентифицировано 96 белков, дифференциально экспрессирующихся на разных стадиях развития. Функциональный анализ позволил установить, что содержание белков, участвующих в первичном метаболизме, фосфорилировании и поддер-

Таблица 2. Гены соматического эмбриогенеза у представителей рода *Larix*

Вид	Стадия эмбриогенеза	Идентифицированный ген	Лит. источник
<i>L. kaempferi</i>	Ранний эмбриогенез	<i>miR159, 169, 171, 172</i>	Zhang S. et al., 2010b
	Определение компетентности и поддержание состояния эмбриогенности	MYB-like (<i>MYB33</i>), <i>miR159</i>	Li S. et al., 2013; Li W. et al., 2013
		Scarecrow-like (<i>SCL6</i>), <i>miR171</i>	Li W. et al., 2014; Zang et al., 2019
	Предсемядольные стадии развития соматических зародышей	Superoxide dismutase (<i>SOD</i>), catalase (<i>CAT</i>), ascorbate peroxidase (<i>APX</i>)	Zhang S. et al., 2010a
	Предсемядольные и семядольные стадии развития соматических зародышей	<i>TAS3/miR390, laccase/miR397, plastocyanin/miR398, ARF/miR160, miRNA167, class III HD-ZIP/miR166, miRNA156</i>	Zhang J. et al., 2012
	Все стадии эмбриогенеза	<i>miRNA162, miRNA168</i>	»
	Ранний эмбриогенез	<i>LaSERK1</i>	Li L. et al., 2013
	Ранние стадии детерминации и начало созревания соматических зародышей	<i>LaNFYA1, LaNFYA2, LaNFYA3, LaNFYA4, miR169</i>	Zhang L. et al., 2014
Стадии инициации и позднего созревания соматических зародышей	<i>LaHDZ31, LaHDZ32, LaHDZ33, LaHDZ34, miR165/166</i>	Li Z. et al., 2016, 2017b	
	<i>LaNIT</i>	Li Z. et al., 2018	
<i>L. × marschlinii</i>	Стадии созревания соматических зародышей и их прорастание	Germin-like protein 1 (<i>LmGER1</i>)	Mathieu et al., 2006
	Стадии прорастания соматических зародышей	Apetala 2-like (<i>LmAP2L1</i>)	Guillaumot et al., 2008
	Все стадии эмбриогенеза	Apetala 2-like (<i>LmAP2L2</i>)	»
<i>L. decidua</i>	Ранний эмбриогенез	<i>LdLEC1, LdWOX2</i>	Rupps et al., 2016
	Поздний эмбриогенез, стадии прорастания соматических зародышей	<i>LdBBM, LdSERK</i>	»
<i>L. leptolepis × L. olgensis</i>	Стадии прорастания соматических зародышей	<i>LkBBM</i>	Li K. et al., 2014

жании редокс-потенциала клетки, возрастает в процессе развития соматических зародышей. Изучение общего профиля белков *L. × eurolepis* показало значительные различия в их содержании на отдельных этапах созревания соматических зародышей (Teyssier et al., 2014). Обнаруженные в работе 147 белков участвуют главным образом в первичном метаболизме и стабилизации полученных метаболитов. Так, запасные белки, идентифицированные как леугмин- и вицилин-подобные, появлялись на предсемядольной стадии развития.

При изучении жирнокислотного состава липидов эмбриогенных и неэмбриогенных каллусов *L. sibirica* было обнаружено высокое содержание олеиновой кислоты в суммарных липидах эмбриогенной культуры клеток на фоне более низкого содержания линолевой кислоты по сравнению с неэмбриогенным каллусом (Макаренко и др., 2016). Авторы предложили использовать концентрации этих жирных кислот в качестве маркера эмбриогенного потенциала при отборе перспективных клеточных линий лиственницы сибирской на стадии раннего эмбриогенеза. Выявлены также существенные различия состава и содержания нейтральных липидов в тканях эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий *L. sibirica* (Семёнова и др., 2020). Установлено, что доминирующими липидами двух типов линий являются глицериды. При этом триглицериды и 1,2-диглицериды заметно активнее накапливались в эмбриогенных клеточных линиях, а содержание эфиров стероидов в этих линиях было пониженным.

Несмотря на значительные успехи в понимании молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе соматического эмбриогенеза хвойных, в частности представителей рода *Larix*, в настоящее время существует острая потребность в расширении комплексных исследований в этой области с целью получения новых знаний, необходимых для разработки методов и подходов к получению растительного материала *in vitro* и использования его в программах лесовосстановления и лесоразведения.

Метод соматического эмбриогенеза представителей рода *Larix* в селекционных программах лесовосстановления

Клональное размножение отдельных видов хвойных путем соматического эмбриогенеза уже широко используется в плантационном лесовыращивании и при реализации программ мультисортного лесного хозяйства (Multi Variety Forest – MVF) в различных странах мира, прежде всего во Франции, Канаде, Германии, Великобритании, Ирландии, странах Скандинавии, в Китае (Park et al., 2016). Мультисортное лесное хозяйство определяется как использование ряда генетически проверенных сортов древесных видов в условиях производственных лесосеменных плантаций (Weng et al., 2011). Еще в середине 1990-х гг. INRA (Национальный институт сельскохозяйственных исследований) во Франции организовал исследования соматического эмбриогенеза у гибридных видов лиственницы (Pâques et al., 2013). В результате была раз-

работана улучшенная процедура, ведущая к рутинному производству растений-регенерантов из соматических зародышей. Новый протокол был применен для размножения гибрида *L. × leptoeuropaea* сорт REVE-VERT (Lelu-Walter, Râques, 2009). В эти же годы была начата программа селекции гибридной лиственницы *L. × eurolepis* на государственном предприятии Staatsbetrieb Sachsenforst (Германия), которая базировалась на достижениях в области, сочетающей методику клонального размножения и исходного растительного материала, имеющего превосходный генетический фон (контролируемые скрещивания) (Kraft, Kadolsky, 2018). Селекционные программы, включающие в себя биотехнологические подходы соматического эмбриогенеза и генетической инженерии, развернуты в Китае и направлены на улучшение имеющегося генофонда местного вида *L. principis-rupprechtii* (Zhao et al., 2015a). Методы генетической инженерии совместно с соматическим эмбриогенезом лиственниц давно успешно апробированы в лабораторных условиях. При этом для введения генов в клетки эмбрионной культуры и непосредственно в соматические зародыши *L. laricina*, *L. leptolepis*, *L. × eurolepis*, *L. principis-rupprechtii* используется как агробактериальная, так и биобаллистическая трансформация (Klimaszewska et al., 1997; Levée et al., 1997; Qi et al., 2000; Li Z. et al., 2016). В ближайшее время для генетического улучшения хвойных планируется использовать, помимо традиционных методов, бурно развивающиеся и многообещающие технологии геномного редактирования на основе системы CRISPR-Cas, которые уже успешно применены для широколиственных древесных видов, таких как грейпфрут (*Citrus paradisi*), апельсин (*Citrus × sinensis*), яблоня (*Malus domestica*, *M. prunifolia* × *M. pumila*), тополь (*Populus tomentosa*, *P. tremula* × *alba*, *P. tremula* × *tremuloides*) и др. (Sarmast, 2016; Chang et al., 2018).

С целью повышения эффективности селекции деревьев наряду с методами соматического эмбриогенеза и криоконсервации в последние десятилетия успешно применяется технология геномной селекции (Park, 2002). Данная технология на основе совокупности картирования локусов количественных признаков позволяет спрогнозировать фенотип отдельного индивида (Goddard, Hayes, 2007). Таким образом, геномная селекция дает возможность идентифицировать элитные генотипы на очень ранней стадии развития без фенотипирования через полевые испытания и тем самым значительно сократить сроки сортоиспытания в рамках программ лесоразведения (Park et al., 2016).

В нашей стране, благодаря интенсивным исследованиям соматического эмбриогенеза хвойных, в том числе сибирских видов лиственницы, более десяти лет проводившихся сотрудниками Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (г. Красноярск) под руководством И.Н. Третьяковой, достигнуты значительные успехи в этой области, начиная с условий инициации эмбрионной культуры и заканчивая проведением полевых испытаний выращенных из соматических эмбрионов растений-регенерантов (Третьякова и др., 2019). Полученные результаты в комплексе с прогрессивными методами криосохранения, создания и отбора элитных генотипов на основе геномной инженерии и геномной селекции могут значительно повысить эффективность традиционных селекционных программ по лесо-

восстановлению, проводимых в Российской Федерации. В качестве наиболее масштабного из подобного рода проектов можно отметить международный проект «Лиственница» при участии Швеции, Норвегии, Финляндии, Исландии, Канады, Китая, Японии, США (Abaimov et al., 2002; Martinsson, 2002). Целью этого проекта, начатого в 1992 г., являются создание коллекции семян четырех видов лиственницы из России (*Larix sukaczewii*, *L. sibirica*, *L. gmelinii* и *L. cajanderi*), изучение генетики этих видов и исследования по разведению и видоизменению популяций, созданных на плантациях в разных частях Северного полушария, отбор перспективных форм и популяций.

Заключение

Соматический эмбриогенез все чаще рассматривают как наиболее перспективный метод клонального размножения хвойных, в частности лиственниц, поскольку он имеет ряд преимуществ перед традиционными технологиями лесоразведения. За более чем 30-летний период с момента первого документированного случая соматического эмбриогенеза у видов *Larix* фронт работ в этой области значительно расширился. Изучены условия инициации, поддержания эмбрионных культур, созревания и прорастания соматических зародышей, регенерации полноценных растений и их выращивания в полевых условиях. На основе методов криоконсервации разработаны протоколы поддержания эмбрионных культур в функциональном ювенильном состоянии в течение длительных периодов времени. Наблюдается прогресс в исследовании молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе реализации отдельных этапов развития соматических зародышей.

Несмотря на имеющиеся успехи, ряд вопросов, непосредственно связанных с соматическим эмбриогенезом у видов рода *Larix*, остаются недостаточно изученными. Решение этих вопросов в ближайшем будущем позволит создать научные основы для разработки новых подходов и методов получения качественного растительного материала *in vitro* и использования его в программах широкомасштабного промышленного лесовосстановления и лесоразведения. Можно надеяться также, что объединение усилий и более тесное сотрудничество отдельных научных коллективов, успешно работающих в Российской Федерации по проблеме соматического эмбриогенеза видов *Larix* и других видов хвойных, и применение в этих работах комплексного подхода, использующего методы геномики, транскриптомики, протеомики, метаболомики, криосохранения и геномной селекции, будут способствовать ускоренному решению этой планетарного значения биологической проблемы.

Список литературы / References

- Белоруссова А.С., Третьякова И.Н. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты. *Онтогенез*. 2008;39(2):106-115.
[Belorussova A.S., Tretyakova I.N. Patterns of somatic embryo formation in Siberian larch: embryological aspects. *Russ. J. Dev. Biol.* 2008;39(2):83-91. DOI 10.1134/S1062360408020045.]
Биоразнообразие лиственниц Азиатской России. Отв. ред. С.П. Ефремов, Л.И. Милютин. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2010.
[Efremov S.P., Milyutin L.I. (Eds.). Larch Biodiversity of Asian Russia. Novosibirsk: Acad. Publ. House "Geo", 2010. (in Russian)]

- Горячкина О.В., Пак М.Э., Третьякова И.Н. Цитогенетические особенности эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica* Ledeb. в культуре *in vitro*. *Вестн. Том. гос. ун-та. Биология*. 2017;39: 140-153. DOI 10.17223/19988591/39/9.
- [Goryachkina O.V., Park M.E., Tretyakova I.N. Cytogenetic peculiarities of *Larix sibirica* Ledeb. Embryogenic cell lines in *in vitro* culture. *Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2017;39:140-153. DOI 10.17223/19988591/39/9. (in Russian)]
- Дылис Н.В. Лиственница. М.: Лесн. пром-сть, 1981.
- [Dylis N.V. The Larch. Moscow: Lesnaya Promyshlennost Publ., 1981. (in Russian)]
- Макаренко С.П., Шмаков В.Н., Дударева Л.В., Столбикова А.В., Семёнова Н.В., Третьякова И.Н., Константинов Ю.М. Жирнокислотный состав суммарных липидов эмбрионных и неэмбрионных каллусных линий лиственницы. *Физиология растений*. 2016;63(2):267-274. DOI 10.7868/S001533031602010X.
- [Makarenko S.P., Shmakov V.N., Dudareva L.V., Stolbikova A.V., Semenova N.V., Tretyakova I.N., Konstantinov Y.M. Fatty acid composition of total lipids in embryogenic and nonembryogenic callus lines of larch. *Russ. J. Plant Physiol.* 2016;63(2):252-258. DOI 10.1134/S1021443716020102.]
- Пак М.Э., Иваницкая А.С., Двойнина Л.М., Третьякова И.Н. Эмбрионный потенциал длительно пролиферирующих клеточных линий *Larix sibirica in vitro*. *Сиб. лесн. журн.* 2016;1:27-38. DOI 10.15372/SJFS20160103.
- [Pak M.E., Ivanitskaya A.S., Dvoynina L.M., Tretyakova I.N. The embryogenic potential of long-term proliferation cell lines of *Larix sibirica in vitro*. *Sibirskij Lesnoj Zhurnal = Siberian Journal of Forest Science*. 2016;1:27-38. DOI 10.15372/SJFS20160103. (in Russian)]
- Рысин Л.П. Лиственничные леса России. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2010.
- [Rysin L.P. Larch Forests in Russia. Moscow: KMK Publ., 2010. (in Russian)]
- Семёнова Н.В., Шмаков В.Н., Пак М.Э., Третьякова И.Н., Константинов Ю.М., Дударева Л.В. Особенности состава нейтральных липидов эмбрионных и неэмбрионных клеточных линий *Larix sibirica* Ledeb. *Биол. мембраны*. 2020;37(3):215-223. DOI 10.31857/S0233475520020127.
- [Semenova N.V., Shmakov V.N., Park M.E., Tretyakova I.N., Konstantinov Yu.M., Dudareva L.V. Particularities of neutral lipid composition in embryogenic and non-embryogenic calluses lines of *Larix sibirica* Ledeb. *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology*. 2020;3(in press).]
- Третьякова И.Н., Барсукова А.В. Сохранение генофонда хвойных видов Сибири при помощи соматического эмбриогенеза *in vitro* – современного метода биотехнологии. *Хвойные бореальной зоны*. 2010;XXVII(1-2):203-206.
- [Tretyakova I.N., Barsukova A.V. Preservation of gene pool of siberian conifer species by somatic embryogenesis *in vitro* – modern method of biotechnology. *Khvoynyye Borealnoy Zony = Conifers of the Boreal Area*. 2010;XXVII(1-2):203-206. (in Russian)]
- Третьякова И.Н., Барсукова А.В. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы. *Онтогенез*. 2012; 43(6):425-435.
- [Tretyakova I.N., Barsukova A.V. Somatic embryogenesis in *in vitro* culture of three larch species. *Russ. J. Dev. Biol.* 2012;43(6): 353-361. DOI 10.1134/S1062360412060082.]
- Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Шуваев Д.Н., Пак М.Э. Перспективы микроклонального размножения хвойных в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез. *Хвойные бореальной зоны*. 2012;XXX(1-2):180-186.
- [Tretyakova I.N., Voroshilova E.V., Shuvaev D.N., Pak M.E. The prospects of clonal micropropagation of conifers using *in vitro* culture via somatic embryogenesis. *Khvoynyye Borealnoy Zony = Conifers of the Boreal Area*. 2012;XXX(1-2):180-186. (in Russian)]
- Третьякова А.В., Демина Е.А., Рекославская Н.И., Салаяев Р.К., Столбиков А.С. Особенности получения каллусной культуры пихты сибирской *Abies sibirica* Ledeb. *Изв. Ирк. гос. ун-та. Сер. «Биология. Экология»*. 2014;10:11-23.
- [Tretyakova A.V., Demina E.A., Rekoslavskaya N.I., Salyaev R.K., Stolbikov A.S. Peculiar properties of the process of obtaining tissue cultures of *Abies sibirica* Ledeb. *Izvestiya Irkutskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya "Biologiya. Ecologiya" = The Bulletin of Irkutsk State University. Series "Biology. Ecology"*. 2014;10:11-23. (in Russian)]
- Третьякова И.Н., Иваницкая А.С., Пак М.Э. Продуктивность эмбрионных клеточных линий и их соматическая изменчивость у лиственницы сибирской *in vitro*. *Лесоведение*. 2015;1: 27-35.
- [Tretyakova I.N., Ivanitskaya A.S., Park M.E. *In vitro* productivity and somaclonal variability of embryogenic cell lines of Siberian larch. *Lesovedenie = Russian Journal of Forest Science*. 2015;1: 27-35. (in Russian)]
- Третьякова И.Н., Пак М.Э. Соматический полиэмбриогенез *Larix sibirica* в эмбрионной культуре *in vitro*. *Онтогенез*. 2018; 49(4):251-263. DOI 10.1134/S0475145018010068.
- [Tretyakova I.N., Pak M.E. Somatic polyembryogenesis of *Larix sibirica* in embryogenic *in vitro* culture. *Russ. J. Dev. Biol.* 2018; 49(4):222-233. DOI 10.1134/S1062360418040069.]
- Третьякова И.Н., Пак М.Э., Баранова А.А., Лисецкая И.А., Шуклина А.С., Рогожин Е.А., Садыкова В.С. Использование антимикробных пептидов микромицетов рода *Trichoderma* для выхода эмбрионной культуры *Larix sibirica*. *Онтогенез*. 2019; 50(1):41-52. DOI 10.1134/S0475145019010051.
- [Tretyakova I.N., Pak 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*. *Russ. J. Dev. Biol.* 2018;49(6):370-380. DOI 10.1134/S1062360419010053.]
- Третьякова И.Н., Пак М.Э., Иваницкая А.С., Орешкова Н.В. Особенности соматического эмбриогенеза длительно пролиферирующих эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica in vitro*. *Физиология растений*. 2016;63(6):812-822. DOI 10.1007/BF00048321.
- [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*. *Russ. J. Plant Physiol.* 2016;63(6):800-810. DOI 10.1134/S1021443716050137.]
- Шуклина А.С., Третьякова И.Н. Соматический эмбриогенез видов рода *Pinus* в культуре *in vitro*. *Успехи соврем. биологии*. 2019; 139(2):184-195. DOI 10.1134/S004213241902008X.
- [Shuklina A.S., Tretyakova I.N. Somatic embryogenesis of species of the genus *Pinus* in culture *in vitro*. *Uspekhi Sovremennoi Biologii = Advances in Current Biology*. 2019;139(2):184-195. DOI 10.1134/S004213241902008X. (in Russian)]
- Abaimov A.P., Barzut V.M., Berkutenko A.N., Buitink J., Martinsen O., Milyutin L.I., Polezhaev A., Putenikhin V.P., Takata K. Seed collection and seed quality of *Larix* spp. from Russia: Initial phase on the Russian-Scandinavian Larch Project. *Eurasian J. For. Res.* 2002;4:39-49.
- Attree S.M., Fowke L.C. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1993;35(1):1-35. DOI 10.1007/BF00043936.
- Bailian L., Wyckoff G.W. Breeding strategies for *Larix decidua*, *L. leptolepis* and their hybrids in the United States. *For. Genet.* 1994;1: 65-72.
- Becwar M.R., Nagmani R., Wann S.R. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Can. J. For. Res.* 1990;20:810-817. DOI 10.1139/x90-107.
- Bonga J.M. Frozen storage stimulates the formation of embryo-like structures and elongating shoots in explants from mature *Larix decidua* and *L. × eurolepis* trees. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1996;46:91-101. DOI 10.1007/BF00034841.
- Bonga J.M. The effect of collection date and frozen storage on the formation of embryo-like structures and elongating shoots from explants from mature *Larix decidua* and *L. × eurolepis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1997;51:195-200. DOI 10.1023/A:1005932628498.

- Bonga J.M. The effect of various culture media on the formation of embryo-like structures in cultures derived from explants taken from mature *Larix decidua*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2004;77:43-48. DOI 10.1023/B:TICU.0000016488.79965.b7.
- Bonga J.M. Conifer clonal propagation in tree improvement programs. In: Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. (Eds.). *Vegetative Propagation of Forest Trees*. Seoul, Korea: National Institute of Forest Science (NIFoS), 2016;3-31.
- Bonga J.M. Can explant choice help resolve recalcitrance problems in *in vitro* propagation, a problem still acute especially for adult conifers? *Trees*. 2017;31:781-789. DOI 10.1007/s00468-016-1509-z.
- Bonga J.M., Klimaszewska K., Lelu M.A., von Aderkas P. Somatic embryogenesis in *Larix*. In: Jain S., Gupta P., Newton R. (Eds.). *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Kluwer Acad. Publ., 1995; 3:315-339. DOI 10.1007/978-94-011-0960-4-20.
- Bonga J.M., Klimaszewska K., von Aderkas P. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2010;100:241-254. DOI 10.1007/s11240-009-9647-2.
- Bonga J.M., Pond S.E. Adventitious shoot formation in cultures of 30-year-old *Larix decidua*, *L. leptolepis*, *L. eurolepis*, and *L. laricina* trees. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1991;26:45-51. DOI 10.1007/BF00116609.
- Burg K., Helmersson A., Bozhkov P., von Arnold S. Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine. *J. Exp. Bot.* 2007;58:687-698. DOI 10.1093/jxb/erl241.
- Chalupa V. Micropropagation of *Larix decidua* Mill. and *Pinus sylvestris* L. *Biologia Plantarum (Praha)*. 1989;31(5):400-407. DOI 10.1007/BF02876363.
- Chang S., Mahon E.L., MacKay H.A., Rottmann W.H., Strauss S.H., Pijut P.M., Powell W.A., Coffey V., Lu H., Mansfield S.D., Jones T.J. Genetic engineering of trees: progress and new horizons. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2018;54:341-376. DOI 10.1007/s11627-018-9914-1.
- Charest P.J., Klimaszewska K. Cryopreservation of germplasm of *Larix* and *Picea* species. In: Bajaj Y.P.S. (Ed.). *Cryopreservation of Plant Germplasm I*. (Ser. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 32). Springer, Berlin, Heidelberg, 1995;191-203. DOI 10.1007/978-3-662-03096-7_12.
- Chen S., Chen S., Chen F., Wu T., Wang Y., Yi S. Somatic embryogenesis in mature zygotic embryos of *Picea likiangensis*. *Biologia Sect. Botany*. 2010;65(5):853-858. DOI 10.2478/s11756-010-0089-4.
- Cornu D., Geoffrion C. Aspects de l'embryogenèse somatique chez le mélèze. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 1990;137:25-34. DOI 10.1080/01811789.1990.10827026.
- Cuesta C., Ordás R.J., Fernández B., Rodríguez A. Clonal micropropagation of six selected half-sibling families of *Pinus pinea* and somaclonal variation analysis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2008; 95:125-130. DOI 10.1007/s11240-008-9412-y.
- Cyr D.R. Cryopreservation of embryogenic cultures of conifers and its application to clonal forestry. In: Jain S., Gupta P., Newton R. (Eds.). *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Forestry Sciences. Springer, Dordrecht, 1999;55:239-261. DOI 10.1007/978-94-017-3032-7_10.
- Cyr D.R., Klimaszewska K. Conifer somatic embryogenesis: II. Applications. *Dendrobiology*. 2002;48:41-49.
- DeVerno L.L., Charest R.J., Bonen L. Mitochondrial DNA variation in somatic embryogenic cultures of *Larix*. *Theor. Appl. Genet.* 1994; 88:727-732. DOI 10.1007/BF01253977.
- Earnshaw B.A., Johnson M.A. Control of wild carrot somatic embryo development by antioxidants. *Plant Physiol.* 1987;85:273-276. DOI 10.1104/pp.85.1.273.
- Ewald D. Advances in tissue culture of adult larch. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 1998;34(4):325-330. DOI 10.1007/BF02822742.
- Ewald D., Kretzschmar U., Chen Y. Continuous micropropagation of juvenile larch from different species via adventitious bud formation. *Biol. Plant.* 1997;39:321-329. DOI 10.1023/A:1000959621891.
- Ewald D., Weckwerth W., Naujoks G., Zocher R. Formation of embryo-like structures in tissue cultures of different yew species. *J. Plant Physiol.* 1995;147:139-143. DOI 10.1016/S0176-1617(11)81426-4.
- Goddard M.E., Hayes B.J. Genomic selection. *J. Anim. Breed. Genet.* 2007;124(6):323-330. DOI 10.1111/j.1439-0388.2007.00702.x.
- Gower S.T., Richards J.H. Larches: deciduous conifers in an evergreen world. *BioScience*. 1990;40(11):818-826. DOI 10.2307/1311484.
- Guillaumot D., Lelu-Walter M.-A., Germot A., Meytraud F., Gastinel L., Riou-Khamlihi C. Expression patterns of *LmAP2L1* and *LmAP2L2* encoding two-APETALA2 domain proteins during somatic embryogenesis and germination of hybrid larch (*Larix × marschlinisii*). *J. Plant Physiol.* 2008;165:1003-1010. DOI 10.1016/j.jplph.2007.08.009.
- Gupta P.K., Durzan D.J. Shoot multiplication for mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Rep.* 1985;4:177-179. DOI 10.1007/BF00269282.
- Gutmann M., von Aderkas P., Labe P., Lelu M.-A. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *J. Exp. Bot.* 1996;47(305):1905-1917. DOI 10.1093/jxb/47.12.1905.
- Harry I.S., Thompson M.R., Thorpere T.A. Generation of plantlets from mature embryos of western larch. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1991; 27(2):89-98. DOI 10.1007/BF02632134.
- Harveng L., Trontin J.F., Reymond L., Canlet F., Pâques M. Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis. *Planta*. 2001;213:828-832. DOI 10.1007/s004250100628.
- Hassan M.M. In vitro conservation of date palm somatic embryos using growth-retardant conditions. In: Al-Khayri J., Jain S., Johnson D. (Eds.). *Date Palm Biotechnology Protocols Volume II. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1638. New York, NY: Humana Press, 2017; 61-70. DOI 10.1007/978-1-4939-7159-6_6.
- Heinze B., Schmidt J. Monitoring genetic fidelity vs somaclonal variation in Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis by RAPD analysis. *Euphytica*. 1995;85:341-345. DOI 10.1007/BF00023965.
- Isabel N., Boivin R., Lévassieur C., Charest P.-M., Bousquet J., Tremblay F.M. Occurrence of somaclonal variation among somatic embryo-derived white spruces (*Picea glauca*, Pinaceae). *Am. J. Bot.* 1996;83(9):1121-1130. DOI 10.2307/2446195.
- Isah T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. *Acta Physiol. Plant.* 2016;38:118. DOI 10.1007/s11738-016-2134-6.
- Kim Y., Moon H. Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2007;88:241-245. DOI 10.1007/s11240-007-9202-y.
- Kim Y., Moon H. Effect of TIBA, PCIB and phloroglucinol on somatic embryomaturation and germination in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *J. Plant Biotechnol.* 2009;36:230-235. DOI 10.5010/JPB.2009.36.3.230.
- Kim Y.W. Initiation of embryogenic callus from mature zygotic embryos in Japanese larch (*Larix kaempferi*). *J. Plant Biotechnol.* 2015; 42:223-227. DOI 10.5010/JPB.2015.42.3.223.
- Kim Y.W., Youn Y., Noh E.R., Kim J.C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1998;55:95-101. DOI 10.1023/A:1006120302512.
- Klimaszewska K. Recovery of somatic embryos and plantlets from protoplast cultures of *Larix × eurolepis*. *Plant Cell Rep.* 1989a;8: 440-444. DOI 10.1007/BF00269044.
- Klimaszewska K. Plantlet development from immature zygotic embryos of hybrid larch through somatic embryogenesis. *Plant Science*. 1989b;63(1):95-103. DOI 10.1016/0168-9452(89)90105-2.
- Klimaszewska K., Devantier Y., Lachance D., Lelu M.A., Charest P.J. *Larix laricina* (tamarack): somatic embryogenesis and genetic transformation. *Can. J. For. Res.* 1997;27(4):538-550. DOI 10.1139/x96-208.
- Klimaszewska K., Hargreaves C., Lelu-Walter M.A., Trontin J.F. Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. In: Germana M., Lambardi M. (Eds.). *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1359. New York, NY: Humana Press, 2016;131-166. DOI 10.1007/978-1-4939-3061-6-7.
- Klimaszewska K., Overton C., Stewart D., Rutledge R.G. Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of

- 11 genes followed during the tissue culture process. *Planta*. 2011; 233:635-647. DOI 10.1007/s00425-010-1325-4.
- Klimaszewska K., Rutledge R.G. Is there potential for propagation of adult spruce trees through somatic embryogenesis? In: Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. (Eds.). *Vegetative Propagation of Forest Trees*. Seoul, Korea: National Institute of Forest Science (NIFoS), 2016;195-210.
- Klimaszewska K., Ward C., Cheliak W.M. Cryopreservation and plant regeneration from embryogenic cultures of larch (*Larix × eurolepis*) and black spruce (*Picea mariana*). *J. Exp. Bot.* 1992;43(246):73-79. DOI 10.1093/jxb/43.1.73.
- Korlach J., Zoglauer K. Developmental patterns during direct somatic embryogenesis in protoplast cultures of european larch (*Larix decidua* Mill.). *Plant Cell Rep.* 1995;15:242-247. DOI 10.1007/BF00193728.
- Koropachinsky I.Yu., Milyutin L.I. Natural Hybridization in Woody Plants. Novosibirsk: Acad. Publ. House "Geo", 2013.
- Kraft A., Kadolsky M. Hybrid larch (*Larix × eurolepis* Henry). In: Jain S.M., Gupta P. (Eds.). *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*. Forestry Sciences. Vol. 84. Springer, Cham., 2018;149-158. DOI 10.1007/978-3-319-89483-6_11.
- Krutovsky K.V., Tretyakova I.N., Oreshkova N.V., Pak M.E., Kvitko 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;50:655-664. DOI 10.1007/s11627-014-9619-z.
- Label P., Lelu M.-A. Influence of exogenous abscisic acid on germination and plantlet conversion frequencies of hybrid larch somatic embryos (*Larix × leptoeuropaea*) relation with in planta abscisic acid and abscisic acid glucose ester levels. *Plant Growth Regul.* 1994;15: 175-182. DOI 10.1007/BF00024107.
- Label P., Lelu M.-A. Exogenous abscisic acid fate during maturation of hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiologia Plantarum*. 2000;109:456-462. DOI 10.1034/j.1399-3054.2000.100413.x.
- Lelu M.A., Bastien C., Klimaszewska K., Ward C., Charest P.J. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*): Part 1. Somatic embryo maturation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1994a;36:107-115. DOI 10.1007/BF00048321.
- Lelu M.A., Bastien C., Klimaszewska K., Charest P.J. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*): Part 2. Control of germination and plantlet development. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1994b;36:117-127. DOI 10.1007/BF00048322.
- Lelu M.A., Klimaszewska K., Charest P.J. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix*. *Can. J. For. Res.* 1994c; 24:100-106. DOI 10.1139/x94-015.
- Lelu M.A., Klimaszewska K., Pflaum G., Bastien C. Effect of maturation duration on desiccation tolerance in hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea* Dengler) somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1995;31:15-20. DOI 10.1007/BF02632220.
- Lelu-Walter M.A., Pâques L.E. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix × eurolepis* and *Larix × marschlinii*). Perspectives for breeding. *Ann. For. Sci.* 2009;66:104. DOI 10.1051/forest/2008079.
- Lévéé V., Lelu M.A., Jouanin L., Cornu D., Pilate G. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of hybrid larch (*Larix kaempferi* × *L. decidua*) and transgenic plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 1997;16:680-685. DOI 10.1007/s002990050301.
- Li K., Sun X., Han H., Zhang S. Isolation, characterization and expression analysis of the *Baby Boom* (*BBM*) gene from *Larix kaempferi* × *L. olgensis* during adventitious rooting. *Gene*. 2014;551:111-118. DOI 10.1016/j.gene.2014.08.023.
- Li L., Zhang L., Qi L., Han S. Characterization and expression of the *Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase 1* (*SERK1*) gene during somatic embryogenesis of *Larix kaempferi*. *For. Res.* 2013;6: 673-680.
- Li S., Li W., Han S., Yang W., Qi L. Stage-specific regulation of four *HD-ZIP III* transcription factors during polar pattern formation in *Larix leptolepis* somatic embryos. *Gene*. 2013;522:177-183. DOI 10.1016/j.gene.2013.03.117.
- Li W., Zhang S., Han S., Wu T., Zhang J., Qi L. Regulation of *LaMYB33* by miR159 during maintenance of embryogenic potential and somatic embryo maturation in *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2013;113(1):131-136. DOI 10.1007/s11240-012-0233-7.
- Li W., Zhang S., Han S., Wu T., Zhang J., Qi L. The post-transcriptional regulation of *LaSCL6* by miR171 during maintenance of embryogenic potential in *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr. *Tree Genet. Genomes*. 2014;10(1):223-229. DOI 10.1007/s11295-013-0668-y.
- Li Z., Fan Y., Dang S., Li W., Qi L., Han S. *LaMIR166a*-mediated auxin biosynthesis and signaling affect somatic embryogenesis in *Larix leptolepis*. *Mol. Genet. Genomics*. 2018;293(6):1355-1363. DOI 10.1007/s00438-018-1465-y.
- Li Z., Li S., Zhang L., Han S., Li W., Xu H., Yang W., Liu Y., Fan Y., Qi L. Overexpression of miR166a inhibits cotyledon formation in somatic embryos and promotes lateral root development in seedlings of *Larix leptolepis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2016;127(2):461-473. DOI 10.1007/s11240-016-1071-9.
- Li Z., Li W., Han S., Qi L. Germination ability of somatic embryos in *Larix leptolepis*. *For. Res.* 2017a;6:999-1003.
- Li Z., Zhang L., Li W., Qi L., Han S. *MIR166a* affects the germination of somatic embryos in *Larix leptolepis* by modulating IAA biosynthesis and signaling genes. *Plant Growth Regul.* 2017b;36(4):889-896. DOI 10.1007/s00344-017-9693-7.
- 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;4:325-328. DOI 10.1007/BF00269890.
- Lloyd G., McCown B.H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. In: Proc. of the Int. Plant Propagators Soc. 1980;30:421-427.
- Lu S., Zhang S., Qi L., Sun X., Wang J. Somatic embryogenesis from immature embryos of *Larix kaempferi*. *Scientia Silvae Sinicae*. 2005;41(02):48-52.
- Ma Y., Weber M., Dumont-BéBoux N., Webber J., von Aderkas P. Megagametophytes of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and hybrid larch (*Larix × eurolepis*) in culture: multiplication of neck cells and the formation of binucleate cells. *Protoplasma*. 1998;204(3-4): 219-225. DOI 10.1007/BF01280325.
- Martinsson O. The Russian-Scandinavian Larch Project – Seed collection and seed quality. Integrating Tree Breeding and Forestry. In: Haapanen M., Mikola J. (Eds.). Proc. of the Nordic Group for Management of Genetic Resources of Trees, Meeting at Mekrijärvi, Finland, March 23–27, 2001. The Finnish Forest Research Institute Research Papers. 2002;107-108.
- Marum L., Rocheta M., Maroco J., Oliveira M.M., Miguel C. Analysis of genetic stability at SSR loci during somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*). *Plant Cell Rep.* 2009;28:673-682. DOI 10.1007/s00299-008-0668-9.
- Mathieu M., Lelu-Walter M.A., Blervacq A.S., David H., Hawkins S., Neutelings G. Germin-like genes are expressed during somatic embryogenesis and early development of conifers. *Plant Mol. Biol.* 2006;61:615-627. DOI 10.1007/s11103-006-0036-5.
- Mo L.H., Egertsdotter U., von Arnold S. Secretion of specific extracellular proteins by somatic embryos of *Picea abies* is dependent on embryo morphology. *Ann. Bot.* 1996;77:143-152.
- Munoz-Concha D. Clonal propagation, forest trees. In: Thomas B., Murray B.G., Murphy D.J. (Eds.). *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Acad. Press, 2017;433-436. DOI 10.1016/b978-0-12-394807-6.00148-9.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15: 473-497. DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Nagmani R., Bonga J.M. Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. *Can. J. For. Res.* 1985;15:1088-1091. DOI 10.1139/x85-177.

- Niskanen A.M., Lu J., Seitz S., Keinonen K., von Weissenberg K., Pappinen A. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Tree Physiol.* 2004;24(11):1259-1265. DOI 10.1093/treephys/24.11.1259.
- Ogita S., Sasamoto H., Kubo T. Maturation and plant recovery from embryogenic cells of Japanese larch: effect of abscisic acid in relation to their morphology. *J. For. Res.* 1999a;4(3):241-244. DOI 10.1007/BF02762255.
- Ogita S., Sasamoto H., Kubo T. Selection and microculture of single embryogenic cell clusters in Japanese conifers: *Picea jezoensis*, *Larix leptolepis* and *Cryptomeria japonica*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 1999b;35(5):428-431. DOI 10.1007/s11627-999-0061-6.
- Ozudogru E.A., Lambardi M. Cryotechniques for the long-term conservation of embryogenic cultures from woody plants. In: Germana M., Lambardi M. (Eds.). *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology.* Vol. 1359. New York, NY: Humana Press, 2016;537-550. DOI 10.1007/978-1-4939-3061-6_32.
- Ozudogru E.A., Previati A., Lambardi M. In vitro conservation and cryopreservation of ornamental plants. In: Jain S.M., Ochatt S.J. (Eds.). *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants. Methods in Molecular Biology.* Vol. 589. New York, NY: Humana Press, 2010;303-324. DOI 10.1007/978-1-60327-114-1_28.
- Pâques L.E., Foffová E., Heinze B., Lelu-Walter M.A., Liesebach M., Philippe G. Larches (*Larix* sp.). In: Pâques L.E. (Ed.). *Forest Tree Breeding in Europe: Current State-of-the-Art and Perspectives. Managing Forest Ecosystems.* Vol. 25. Springer Science+Business Media, Dordrecht, 2013;13-122. DOI 10.1007/978-94-007-6146-9_2.
- Park Y.S. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann. For. Sci.* 2002;59(5-6):651-656. DOI 10.1051/forest:2002051.
- Park Y.S., Barrett J.D., Bonga J.M. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 1998;34:231-239. DOI 10.1007/BF02822713.
- Park Y.S., Beaulieu J., Bousquet J. Multi-varietal forestry integrating genomic selection and somatic embryogenesis. In: Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. (Eds.). *Vegetative Propagation of Forest Trees.* Seoul, Korea: National Institute of Forest Science (NIFoS), 2016; 302-322.
- Park Y.S., Bonga J.M. Conifer micropropagation: its function in tree improvement programs. In: Ahuja M.R. (Ed.). *Micropropagation of Woody Plants.* Kluwer, Dordrecht: Acad. Publ., 1992;457-470. DOI 10.1007/978-94-015-8116-5-27.
- Pattanavibool R., Klimaszewska K., von Aderkas P. Interspecies protoplast fusion in *Larix*: comparison of electric and chemical methods. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 1998;34(3):212-217. DOI 10.1007/BF02822710.
- Pattanavibool R., von Aderkas P., Hanhijarvi A., Simola L.K., Bonga J.M. Diploidization in megagametophyte-derived cultures of the gymnosperm *Larix decidua*. *Theor. Appl. Genet.* 1995;90(5):671-674. DOI 10.1007/BF00222132.
- Pullman G.S., Frampton J. Fraser fir (*Abies fraseri* [Pursh] Poir.). In: Jain S.M., Gupta P. (Eds.). *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants.* Forestry Sciences. Vol. 84. Springer, Cham. 2018;33-48. DOI 10.1007/978-3-319-89483-6_3.
- Qi L., Han Y., Li L., Ewald D., Han S. The somatic embryogenesis and establishment of transformation experiment system in *Larix principis-rupprechtii*. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* 2000;33(4):357-365.
- Qi L., Han Y., Han S., Wang J., Ewald D. Effects of maltose, NAA and ABA on somatic maturation and radicle rooting of *Larix principis-rupprechtii*. *Scientia Silvae Sinicae.* 2004;40(1):52-57.
- Quoirin M., Lepoivre P. Étude de milleux adates aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Hort.* 1977;78:439-432.
- Rohr R., von Aderkas P., Bonga J.M. Ultrastructural changes in haploid embryoids of *Larix decidua* during early embryogenesis. *Am. J. Bot.* 1989;76(10):1460-1467. DOI 10.1002/j.1537-2197.1989.tb15127.x.
- Rupps A., Raschke J., Rümmler M., Linke B., Zoglauer K. Identification of putative homologs of *Larix decidua* to *BABYBOOM* (*BBM*), *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*), *WUSCHEL*-related *HOMEOBOX2* (*WOX2*) and *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR* like *KINASE* (*SERK*) during somatic embryogenesis. *Planta.* 2016; 243(2):473-488. DOI 10.1007/s00425-015-2409-y.
- Saly S., Joseph C., Corbineau F., Lelu M.A., Côme D. Induction of secondary somatic embryogenesis in hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*) as related to ethylene. *Plant Growth Regul.* 2002;37(3): 287-294. DOI 10.1023/A:1020856112765.
- Sarmast M.K. Genetic transformation and somaclonal variation in conifers. *Plant Biotechnol. Rep.* 2016;10(6):309-325. DOI 10.1007/s11816-016-0416-5t.
- Sarmast M.K. In vitro propagation of conifers using mature shoots. *J. For. Res.* 2018;29(3):565-574. DOI 10.1007/s11676-018-0608-7.
- Song Y., Li S., Bai X., Zhang H. Screening and verification of the factors influencing somatic embryo maturation of *Larix olgensis*. *J. For. Res.* 2018;29(6):1581-1589. DOI 10.1007/s11676-018-0694-6.
- Song Y., Zhen C., Zhang H.G., Li S.J. Embryogenic callus induction and somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Larix olgensis*. *Scientia Silvae Sinicae.* 2016;52(10):45-54.
- Teyssier C., Grondin C., Bonhomme L., Lomenech A.M., Vallance M., Morabito D., Label P., Lelu-Walter M.A. Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix × eurolepis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiologia Plantarum.* 2011;141(2):152-165. DOI 10.1111/j.1399-3054.2010.01423.x.
- Teyssier C., Maury S., Beaufour M., Grondin C., Delaunay A., Le Mette C., Ader K., Cadene M., Label P., Lelu-Walter M.A. In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix × eurolepis*): global DNA methylation and proteomic analyses. *Physiologia Plantarum.* 2014;150(2):271-291. DOI 10.1111/ppl.12081.
- Thompson R.G., von Aderkas P. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of western larch. *Plant Cell Rep.* 1992;11:379-385.
- 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;86(10):1373-1381.
- 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 Organ Cult.* 2019;136:511. DOI 10.1007/s11240-018-01533-y.
- Tretyakova I.N., Maria E.P., Alyona S.I., Alla S.S., Inga A.L. Reproduction and genetic stability of long-term proliferative embryogenic cell lines of *Larix sibirica in vitro*. *Int. J. Cell Sci. Mol. Biol.* 2017;2(4):555592. DOI 10.19080/IJCSMB.2017.02.555592.
- Trontin J.-F., Aronen T., Hargreaves C., Montalbán I.A., Moncaleán P., Reeves C., Quoniou S., Lelu-Walter M.-A., Klimaszewska K. International effort to induce somatic embryogenesis in adult pine trees. In: Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. (Eds.). *Vegetative Propagation of Forest Trees.* Seoul, Korea: National Institute of Forest Science (NIFoS), 2016a;211-260.
- Trontin J.-F., Klimaszewska K., Morel A., Hargreaves C., Lelu-Walter M.A. Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: a review of genome-wide approaches and recent insights. In: Germana M., Lambardi M. (Eds.). *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology.* Vol. 1359. New York: Humana Press, 2016b;167-209. DOI 10.1007/978-1-4939-3061-6-8.
- Umehara M., Ogita S., Sasamoto H., Kamada H. Inhibitory factor(s) of somatic embryogenesis regulated suspensor differentiation in suspension culture of Japanese larch (*Larix leptolepis* Gordon). *Plant Biotechnol.* 2004;21(2):87-94. DOI 10.5511/plantbiotechnology.21.87.
- Umehara M., Ogita S., Sasamoto H., Koshino H., Asami T., Fujioka S., Yoshida S., Kamada H. Identification of a novel factor, vanillyl benzyl ether, which inhibits somatic embryogenesis of Japanese larch (*Larix leptolepis* Gordon). *Plant Cell Physiol.* 2005;46(3):445-453. DOI 10.1093/pcp/pci041.
- Umehara M., Ogita S., Sasamoto H., Koshino H., Nakamura T., Asami T., Yoshida S., Kamada H. Identification of a factor that complementarily inhibits somatic embryogenesis with vanillyl benzyl ether

- in Japanese larch. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2007;43:203-208. DOI 10.1007/s11627-006-9016-3.
- Vendrame W.A. Cryopreservation. Orchid propagation: from laboratories to greenhouses. In: Lee Y.-I., Yeung E.C.-T. (Eds.). *Methods and Protocols, Springer Protocols Handbooks.* Springer Science+Business Media, 2018;283-302. DOI 10.1007/978-1-4939-7771-0_15.
- von Aderkas P. Embryogenesis from protoplasts of haploid european larch. *Can. J. For. Res.* 1992;22(3):397-402. DOI 10.1139/x92-052.
- von Aderkas P., Anderson P. Aneuploidy and polyploidization in haploid tissue cultures of *Larix decidua*. *Physiologia Plantarum.* 1993; 88:73-77. DOI 10.1111/j.1399-3054.1993.tb01762.x.
- von Aderkas P., Bonga J.M. Formation of haploid embryoids of *Larix decidua*: early embryogenesis. *Am. J. Bot.* 1988;75(5):690-700. DOI 10.1002/j.1537-2197.1988.tb13491.x.
- von Aderkas P., Bonga J.M. Plants from haploid tissue culture of *Larix decidua*. *Theor. Appl. Genet.* 1993;87:225-228.
- von Aderkas P., Bonga J.M. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiol.* 2000;20:921-928. DOI 10.1093/treephys/20.14.921.
- von Aderkas P., Bonga J.M., Nagmani R. Promotion of embryogenesis in cultured megagametophytes of *Larix decidua*. *Can. J. For. Res.* 1987;17:1293-1296. DOI 10.1139/x87-200.
- von Aderkas P., Klimaszewska K., Bonga J.M. Diploid and haploid embryogenesis in *Larix leptolepis*, *L. decidua*, and their reciprocal hybrids. *Can. J. For. Res.* 1990;20:9-14. DOI 10.1139/x90-002.
- von Aderkas P., Lelu M.A., Label P. Plant growth regulator levels during maturation of larch somatic embryos. *Plant Physiol. Biochem.* 2001;39:495-502. DOI 10.1016/S0981-9428(01)01271-2.
- 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 Culture.* 2003;75(1):27-34. DOI 10.1023/A:1024614209524.
- von Aderkas P., Rohr R., Sundberg B., Gutmann M., Dumont-BéBoux N., Lelu M.A. Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2002;69(2):111-120. DOI 10.1023/A:1015245627220.
- von Aderkas P., Teyssier C., Charpentier J.P., Gutmann M., Pâques L., Le Métte C., Ader K., Label P., Kong L., Lelu-Walter M.A. Effect of light conditions on anatomical and biochemical aspects of somatic and zygotic embryos of hybrid larch (*Larix × marschlinii*). *Ann. Bot.* 2015;115:605-615. DOI 10.1093/aob/mcu254.
- von Aderkas P., Thompson R.G., Zaki M., Benkrima L. Somatic embryogenesis in western larch (*Larix occidentalis*). In: Bajaj Y.P.S. (Ed.). *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II. Biotechnology in Agriculture and Forestry.* Springer, Berlin, Heidelberg, 1995; 30:378-387. DOI 10.1007/978-3-662-03091-2-25.
- von Arnold S. Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *J. Plant Physiol.* 1987;128: 233-244.
- Vondráková Z., Krajňáková J., Fischerová L., Vágner M., Eliášová K. Physiology and role of plant growth regulators in somatic embryogenesis. In: Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. (Eds.). *Vegetative Propagation of Forest Trees.* Seoul, Korea: National Institute of Forest Science (NIFoS), 2016;123-169.
- Vooková B., Kormuťák A. *Abies* biotechnology – research and development of tissue culture techniques for vegetative propagation. Global Science Books. Takamatsu, 2007;39-46.
- Wang X., Lu L., Hao H., Teng N., Guo Y., Yang Y., Guo Z., Lin J., Chen T. High-efficiency somatic embryogenesis and morphohistology and histochemistry of somatic embryo development in *Larix leptolepis* Gordon. *For. Stud. China.* 2007;9(3):182-188. DOI 10.1007/s11632-007-0029-8.
- Wang X., Yang Y. Study on the somatic embryogenesis of *Larix leptolepis*. *J. Anhui Agric. Sci.* 2010;4:2118-2121,2180.
- Wei X., Wang X. Phylogenetic split of *Larix*: evidence from paternally inherited cpDNA *trnT-trnF* region. *Plant Syst. Evol.* 2003;239: 67-77. DOI 10.1007/s00606-002-0264-3.
- Wendling I., Trueman S.J., Xavier A. Maturation and related aspects in clonal forestry. Part I: concepts, regulation and consequences of phase change. *New Forests.* 2014;45:449-471. DOI 10.1007/s11056-014-9421-0.
- Weng Y., Park Y.S., Krasowski M.J., Mullin T.J. Allocation of varietal testing efforts for implementing conifer multi-varietal forestry using white spruce as a model species. *Ann. For. Sci.* 2011;68:129. DOI 10.1007/s13595-011-0014-1.
- Yeung E.C., Thorpe T.A. Somatic embryogenesis in *Picea glauca*. In: Jain S.M., Gupta P.K. (Eds.). *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants.* Forestry Sciences. Vol. 77. Springer, Dordrecht, 2005;47-58. DOI 10.1007/1-4020-2985-3_5.
- Zang Q., Li W., Qi L. Regulation of *LaSCL6* expression by genomic structure, alternative splicing, and microRNA in *Larix kaempferi*. *Tree Genet. Genomes.* 2019;15:57. DOI 10.1007/s11295-019-1362-5.
- Zhang J., Zhang S., Han S., Wu T., Li X., Li W., Qi L. Genome-wide identification of microRNAs in larch and stage-specific modulation of 11 conserved microRNAs and their targets during somatic embryogenesis. *Planta.* 2012;236:647-657. DOI 10.1007/s00425-012-1643-9.
- Zhang L., Li W., Xu H., Qi L., Han S. Cloning and characterization of four differentially expressed cDNAs encoding *NFYA* homologs involved in responses to ABA during somatic embryogenesis in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2014; 117:293-304. DOI 10.1007/s11240-014-0440-5.
- Zhang S., Han S., Yang W., Wei H., Zhang M., Qi L. Changes in H₂O₂ content and antioxidant enzyme gene expression during the somatic embryogenesis of *Larix leptolepis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2010a;100:21-29. DOI 10.1007/s11240-009-9612-0.
- Zhang S., Zhou J., Han S., Yang W., Li W., Wei H., Li X., Qi L. Four abiotic stress-induced miRNA families differentially regulated in the embryogenic and non-embryogenic callus tissues of *Larix leptolepis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010b;398:355-360. DOI 10.1016/j.bbrc.2010.06.056.
- Zhang Y., Zhang S., Han S., Li X., Qi L. Transcriptome profiling and in silico analysis of somatic embryos in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Rep.* 2012;31:1637-1657. DOI 10.1007/s00299-012-1277-1.
- Zhao J., Li H., Fu S., Chen B., Sun W., Zhang J., Zhang J. An iTRAQ-based proteomics approach to clarify the molecular physiology of somatic embryo development in prince Rupprecht's larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr). *PLoS One.* 2015a;10(3):e0119987. DOI 10.1371/journal.pone.0119987.
- Zhao J., Wang B., Wang X., Zhang Y., Dong M., Zhang J. iTRAQ-based comparative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic tissues of prince Rupprecht's larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2015b;120:655-669. DOI 10.1007/s11240-014-0633-y.

ORCID ID

V.N. Shmakov orcid.org/0000-0003-2965-1758
Yu.M. Konstantinov orcid.org/0000-0002-0601-2788

Благодарности. Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта СИФИБР СО РАН № 0343-2019-0004 «Физиолого-генетический контроль функций клеточных органелл и разработка принципов их направленной модификации» (номер гос. регистрации AAAA-A17-117011810100-1).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.08.2019. После доработки 26.06.2020. Принята к публикации 06.07.2020.