

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 630\*165.7:631.532

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-271-283>

Поступила в редакцию 06.03.2025

Received 06.03.2025

**В. Е. Падутов, Л. В. Можаровская, Д. В. Кулагин,  
А. В. Падутов, М. П. Кусенкова**

*Институт леса Национальной академии наук Беларуси, Гомель,  
Республика Беларусь*

## **МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЙ АНАЛИЗ ЭМБРИОГЕННЫХ ЛИНИЙ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ *PICEA ABIES* (L.) KARST.**

**Аннотация.** Соматический эмбриогенез (как метод микрклонального размножения) может быть использован для промышленного получения посадочного материала хвойных пород. По этой причине необходимо изучение различных генетических нарушений, возникающих в условиях *in vitro*, которые потенциально могут наследоваться получаемыми вегетативными потомками. В настоящей работе представлены результаты исследования соматической изменчивости и уровня миксоплоидности каллусных колоний и регенерантов шести эмбриогенных линий ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.). На различных этапах культивирования соответствующего растительного материала *in vitro* использовалась питательная среда ½ LM, которая дополнялась сахарозой и глутамином, а также, при необходимости, регуляторами роста 2,4-Д, 6-БАП, АБК, ИМК и активированным углем. Микросателлитный анализ образцов проводился с использованием пяти EST-SSR-маркеров: *Pa28*, *Pa33*, *Pa56*, *Pa47*, *Pa52*. Показано, что в образцах трех из шести эмбриогенных линий по локусу *Pa28* было выявлено более двух (три или четыре) аллельных вариантов. Кроме того, в ряде случаев изучаемые ткани имеют выраженные признаки миксоплоидии. Для сопоставления полученных данных проведен соответствующий микросателлитный анализ 33 естественно произрастающих средневозрастных деревьев ели европейской. Только у двух растений выявлены триплоидные клетки, что показывает значительно более низкий уровень геномных или хромосомных aberrаций, чем в культурах *in vitro*.

**Ключевые слова:** ель европейская, эмбриогенные линии, микросателлитный анализ, соматическая изменчивость, миксоплоидия

**Для цитирования:** Микросателлитный анализ эмбриогенных линий ели европейской *Picea abies* (L.) Karst. / В. Е. Падутов, Л. В. Можаровская, Д. В. Кулагин [и др.] // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 4. – С. 271–283. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-271-283>

**Vladimir E. Padutov, Ludmila V. Mozharovskaya, Dmitriy V. Kulagin,  
Alexandr V. Padutov, Marina P. Kusenкова**

*Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus*

## **MICROSATELLITE ANALYSIS OF EMBRYOGENIC LINES OF THE NORWAY SPRUCE *PICEA ABIES* (L.) KARST.**

**Abstract.** The method of somatic embryogenesis could be used for industrial production of clonal planting material. For this reason special attention is paid to the studies of various genetic disorders that arise *in vitro* because of their possibility to be inherited by the vegetative offsprings. In our investigation the levels of somaclonal variability and mixoploidy in callus colonies and plantlets of six embryogenic lines of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) were studied. ½ LM nutrient medium supplemented with sucrose and glutamine was used at different stages of plant tissues and plantlets *in vitro* cultivation. Growth regulators 2,4-D, 6-BAP, ABA, IMC and activated carbon were added to nutrient media if necessary. Microsatellite analysis of samples was carried out using five EST-SSR markers *Pa28*, *Pa33*, *Pa56*, *Pa47*, *Pa52*. It was shown that in samples of three of the six embryogenic lines, more than two (three or four) allelic variants were identified at the *Pa28* locus. In a number of cases, the tissues studied have pronounced signs of mixoploidy. Appropriate microsatellite analysis of samples collected from 33 middle-aged trees of Norway spruce from naturally formed forest stand was additionally carried out in order to compare the results with the data obtained earlier. Only two plants showed the presence of triploid cells, indicating a significantly lower level of genomic or chromosomal aberrations than observed in *in vitro* cultures.

**Keywords:** Norway spruce, embryogenic lines, microsatellite analysis, somaclonal variability, mixoploidy

**For citation:** Padutov V. E., Mozharovskaya L. V., Kulagin D. V., Padutov A. V., Kusenкова M. P. Microsatellite analysis of embryogenic lines of the Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. *Vesti Natsyional'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 4, pp. 271–283 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-271-283>

**Введение.** Диплоидный хромосомный набор ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.), как и у большинства хвойных, включает 24 хромосомы [1]. Размер генома оценивается на уровне  $2,0 \cdot 10^{10}$  п. н., частота встречаемости однонуклеотидных замен (SNP) составляет около 0,77 %, коротких инсерций и делеций – 0,05 % [2]. Несмотря на большой размер геномов у голосеменных, который в основном находится в диапазоне от  $2,0 \cdot 10^{10}$  до  $3,0 \cdot 10^{10}$  п. н. [3], он отличается высокой стабильностью в большинстве таксономических групп. Частота устойчивых хромосомных aberrаций среди представителей семейства Pinaceae относительно невелика, хотя в редких случаях обнаруживаются индивиды хвойных деревьев с повышенной пloidностью, достигшие взрослого состояния [4]. Растения, характеризующиеся как поли-, анеу- или миксоплоиды, в большинстве случаев отличаются сниженной жизнеспособностью по сравнению с диплоидами, обладают рядом аномальных признаков и способны расти обычно только в условиях культуры [5, 6]. При целенаправленном поиске тетраплоидов среди семенного потомства *Picea glauca* (Moench) Voss. и *P. mariana* (Mill.) Britt. они обнаруживались с частотой 0,008 и 0,004 % соответственно [7]. Схожие результаты были получены и для ели европейской. В исследовании С. L. Kiellander [8] среди 1,2 млн семян в лесном питомнике было выделено 93 растения, отличающиеся аномальной морфологией, которые включали 1 триплоид, 22 тетраплоида, 3 миксоплоида и 18 индивидов, хромосомный набор которых установить не удалось. В то же время повышение частоты хромосомных aberrаций среди представителей ели европейской в естественных условиях отмечается на границах видового ареала или при воздействии стрессовых факторов. Например, в Болгарии в условиях Рило-Родопского горного района при анализе метафазных клеток у проростков ели европейской из лесхоза «Гърмен» было выявлено 8,5 % полиплоидных клеток (триплоидные и тетраплоидные), лесхоза «Елешница» – 7 %, лесхоза «Якоруда» – 17,6 %, лесхоза «Добриниште» – 10,6 %. Авторы предполагают, что нарушение числа хромосом (миксоплоидия), появление В-хромосом и хромосомные перестройки в тканях семенного потомства ели европейской в Рило-Родопском горном регионе Болгарии могут быть связаны с адаптацией популяций данного вида, произрастающих в высокогорье на южной границе ареала в зоне естественной радиоактивности [9]. В целом в исследованиях популяций видов хвойных из семейств Pinaceae и Cupressaceae, произрастающих в экстремальных условиях, хромосомная изменчивость часто выявляется на границах ареала, в экологических пределах распространения, а также в антропогенно нарушенных экосистемах и в условиях интродукции [10].

Со значительно большей частотой хромосомные aberrации могут появляться в ходе культивирования тканей и органов хвойных *in vitro*. Это явление носит название «сомаклональная изменчивость» [11]. *In vitro*-индуцированным изменениям может способствовать процедура культивирования тканей растений, состав питательной среды, тип и происхождение эксплантов или количество пассажей в ходе субкультивирования [12]. Так, в исследованиях И. Н. Третьяковой и О. В. Горячкиной с соавторами [13, 14], выполненных на гаплоидных эмбрионных культурах лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), показано наличие выраженной сомаклональной изменчивости. Все шесть изученных линий имели какие-либо мутационные изменения в одном или нескольких из 11 использованных микросателлитных локусов. Результаты соответствующих наблюдений, полученные на эмбрионных линиях и клонально размноженных индивидах ели европейской, имеют противоречивый характер. Одни авторы отмечают высокую стабильность генома и полное соответствие наследственных характеристик вегетативных потомков исходной форме [15, 16]. Другие – выявляют хромосомные aberrации у эмбрионных клеточных линий, культивируемых *in vitro* [10, 14, 15], хотя отмечают, что получаемое в этом случае вегетативное потомство, как правило, генетически однообразно. Эти авторы предполагают наличие хромосомных aberrаций как адаптацию растительного материала к условиям культивирования на клеточном уровне, указывая при этом на то, что у линий, имеющих различное происхождение, частота появления сомаклональной изменчивости может в значительной мере отличаться, а увеличение продолжительности этапа мультипликации эмбрионной культуры приводит к увеличению генотипической и фенотипической изменчивости [11, 17, 18]. Согласно единичным исследованиям представителей рода *Picea* частота сомаклональной изменчивости в вегетативном потомстве по фенотипическим признакам не превышала 2,0 % [11]. Исследованию генетических

нарушений, которые возникают в процессе соматического эмбриогенеза и могут в дальнейшем наследоваться растениями-регенерантами, уделяется особое внимание, поскольку этот метод размножения используется для промышленного получения клонального посадочного материала.

Целью данной работы являлся анализ микросателлитного профиля и генотипической гетерогенности эмбриогенных линий *P. abies* и полученных на их основе регенерантов для определения статуса пloidности клеток в культурах *in vitro* ели белорусского происхождения.

**Объекты и методы исследования.** Эмбриогенные клеточные линии, используемые в экспериментальных исследованиях, были получены в 2019 (линия 3, происхождение семенного материала – территория ГЛХУ «Червенский лесхоз») и 2021 гг. (линии 1 и 2, ГЛХУ «Жлобинский лесхоз»; линии 4–6, ГЛХУ «Коренёвская экспериментальная лесная база Института леса Национальной академии наук Беларуси») из зрелых зиготических зародышей. Культивирование каллусной ткани осуществляли в термостате при температуре 24 °C на питательной среде ½ LM [19], дополненной 2,4-Д (2,0 мг · л<sup>-1</sup>), 6-БАП (0,5 мг · л<sup>-1</sup>), сахарозой (10,0 г · л<sup>-1</sup>) и глутамином (0,5 г · л<sup>-1</sup>), гелеобразующий агент – фитогель (5,0 г · л<sup>-1</sup>). Водородный показатель среды (pH) доводили до 5,8. Продолжительность пассажа составляла 10–14 дней. Созревание соматических зародышей состояло из двух фаз: (1) культивирование эмбриогенного каллуса в течение одной недели на питательной среде ½ LM без регуляторов роста с добавлением активированного угля (10,0 г · л<sup>-1</sup>) и (2) культивирование на питательной среде ½ LM с повышенным содержанием сахарозы (34,0 г · л<sup>-1</sup>) и фитогеля (6,0 г · л<sup>-1</sup>). В качестве регуляторов роста использовали абсцизовую кислоту (30,0 мМ) и ИМК (1,0 мМ) [20, 21]. На этой стадии культуры поддерживали при 16-часовом фотопериоде, интенсивности света 0,2–0,4 клк и температуре 24 °C. Количество зрелых (с развитыми семядолями) соматических эмбрионидов подсчитывали из расчета на 1,0 г свежей массы эмбриогенного каллуса. Продолжительность этапа составляла пять недель. После периода созревания эмбриониды на семядольной стадии отделяли и помещали на среду для прорастания (½ LM без регуляторов роста), дополненную активированным углем (5 г · л<sup>-1</sup>). Культивирование проходило при температуре 24 °C в течение двух недель в темноте, а в последующем на свету с интенсивностью освещения 0,5–2,0 клк до формирования проростков, имеющих выраженный побег и корень. В опытах использовали от 10 до 20 микрорастений на вариант. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программных средств Microsoft Excel 2007 и Statistica 10.0.

Выделение суммарной ДНК проводили СТАВ-методом [22]. Микросателлитный анализ образцов генотипов эмбриогенных линий ели европейской осуществляли с использованием пяти EST-SSR-маркеров: *Pa28*, *Pa33*, *Pa56*, *Pa47*, *Pa52* [23]. При ПЦР-диагностике применяли ПЦР-смесь на основе Taq/Pfu-ДНК полимераз. Один из праймеров для каждого из локусов на 5'-конце был мечен красителем Fam. Амплификацию проводили по стандартной программе для ПЦР-продуктов менее 300 п. о. [22]. Полученные ампликоны были проанализированы на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя. Анализ размера и количества ампликонов был произведен с помощью программного обеспечения Gene Mapper v.4.1 (Applied Biosystems, США).

Долю генотипической гетерогенности по SSR-маркерам рассчитывали на основе количественной оценки дисбаланса уровня амплификации аллельных вариантов по формуле:

$$AR = A_X / A_Y,$$

где  $AR$  – коэффициент титра аллелей (allele ratio);  $A_X$  – высота пика (титр) аллеля X на фореграмме;  $A_Y$  – высота пика (титр) аллеля Y на фореграмме.

Аллель с наибольшей высотой пика определяли как аллель X для получения значений  $\geq 1$  [23, 24]. При оценке хромосомных нарушений использовали коэффициент  $AR$ . Образцами с вероятной миксоплоидией при наличии двух аллелей косвенно могли считаться варианты в соотношении пиков, отличные от 1 : 1, 1 : 2 и 1 : 3, которые теоретически должны быть у ди-, три- и тетраплоидных клеток [24, 25].

**Результаты и их обсуждение.** В 2019 и 2021 гг. были получены линии ели европейской, которые характеризовались наличием полиэмбриогенных масс и способностью формировать полно-

ценные микрорастения. Культивирование осуществлялось в идентичных условиях. Для оценки морфогенного потенциала эмбриогенные линии субкультивировали на соответствующие каждому этапу среды и определяли продукцию соматических зародышей при созревании и последующее формирование микрорастений при прорастании. Обобщенные данные приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Морфометрические параметры микрорастений, полученные при созревании и прорастании соматических эмбриондов ели европейской

Table 1. Morphometric parameters of microplants obtained during the maturation and germination of somatic embryoids of Norway spruce

Этап созревания	Этап прорастания		
Количество эмбриондов на 1 г каллусной ткани, шт.	Доля проростков с нормальной морфологией от общего количества, %	Размер побега (среднее $\pm$ ст. откл.), см	размер корня (среднее $\pm$ ст. откл.), см
Л1			
23,0	55,6	1,7 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,3
Л2			
9,0	44,4	0,9 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,1
Л3			
25,0	50,0	1,0 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,2
Л4			
50,0	63,3	1,8 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,2
Л5			
35,0	55,0	1,2 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,1
Л6			
15,0	13,3	1,5 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2 Л1, Л2, Л3, Л4, Л5, Л6 – линии № 1–6 соответственно.

Анализ результатов, представленных в табл. 1, показал, что доля эмбриондов, развивающихся в жизнеспособные растения, подвержена значительным колебаниям и составляет от 13,3 до 63,3 %. На этапе созревания способность клеточных линий к формированию соматических зародышей сильно варьировала между генотипами (от 9,0 до 50,0 эмбриондов на 1,0 г сырой массы исходной каллусной ткани). Аналогичная тенденция к проявлению изменчивости наблюдалась и после четырех недель культивирования микрорастений: на этапе прорастания средние размеры их надземной части составляли от 0,9 до 1,8 см, подземной – от 0,2 до 0,7 см.

Для генотипов каллусных колоний и проростков эмбриогенных линий ели европейской был проведен микросателлитный анализ. Результаты полученного SSR-профиля представлены в табл. 2. Для образцов генотипов эмбриогенной линии № 1 выявлены однофракционные электрофоретические спектры со следующими размерами продукта: 161 п. н. (локус *Pa28*), 99 п. н. (локус *Pa33*), 131 п. н. (локус *Pa56*), 111 п. н. (локус *Pa47*), 154 п. н. (локус *Pa52*). Наличие однофракционного электрофоретического спектра свидетельствует о гомозиготности исследуемых генотипов по анализируемым SSR-маркерам.

Среди анализируемых образцов эмбриогенной линии № 2 выявлены как однофракционные (111 п. н., локус *Pa47*; 154 п. н., локус *Pa52*), так и двухфракционные (161/167 п. н., локус *Pa28*; 99/101 п. н., локус *Pa33*; 126/131 п. н., локус *Pa56*) спектры, что соответствует гомозиготным или гетерозиготным генотипам по данным SSR-локусам соответственно. Проведен расчет доли генотипической гетерогенности по SSR-маркерам (*Pa28*, *Pa33*, *Pa56*), представленным двумя аллелями, с использованием количественной оценки дисбаланса уровня амплификации аллельных вариантов по коэффициенту *AR* [24–26]. Для образцов каллусных колоний, проростков с нормальной и аномальной морфологией линии № 2 по локусам *Pa28* и *Pa56* значения коэффициента титра аллелей близки к соотношению 1 : 1. По локусу *Pa33* во всех исследованных образцах

был отмечен выраженный дисбаланс аллельных вариантов, при этом значение  $AR$  находилось в пределах от 1 : 1,4 до 4,1 : 1. Интересно, что был получен весь спектр значений: 1 : 2, 1 : 3 и 1 : 4. Аллельный дисбаланс для каллусных культур линии № 2 и регенерируемых ими проростков может быть обусловлен полиморфизмом в области отжига праймеров, что приводит к различающимся значениям коэффициентов амплификации [24], или вызван какими-либо хромосомными нарушениями (например, миксоплоидностью) исследуемых образцов, так как подобные явления наблюдаются в ходе соматического эмбриогенеза [27, 28]. Учитывая то, что дисбаланс был существенным (кратным) во всех образцах, такая разница в соотношении титров (высоты пиков) аллелей, в соответствии с литературными данными [29, 30], скорее свидетельствует о соматической изменчивости, которая проявляется у эмбриогенной линии № 2 и в каллусной культуре, и в растениях-регенерантах.

Таблица 2. SSR-профиль эмбриогенных линий ели европейской  
Table 2. SSR-profile of embryogenic lines of Norway spruce

Линия	Источник	SSR-маркер, размер продукта (п. н.)				
		<i>Pa28</i>	<i>Pa33</i>	<i>Pa47</i>	<i>Pa52</i>	<i>Pa56</i>
Л1	К1	161	99	111	154	131
	К2	161	99	111	154	131
	НП	161	99	111	154	131
	АП	161	99	111	154	131
Л2	К1	161/167	99/101	111	154	126/131
	К2	161/167	99/101	111	154	126/131
	НП	161/167	99/101	111	154	126/131
	АП	161/167	99/101	111	154	126/131
Л3	К1	161/164	99/101	111	154	120/131
	К2	161/164	99/101	111	154	120/131
	НП	161/164	99/101	111	154	120/131
	АП	161/164	99/101	111	154	120/131
Л4	К1	161/164/167	99	111	154	126/131
	К2	161/164/167	99	111	154	126/131
	НП	161/164/167	99	111	154	126/131
	АП	161/164/167	99	111	154	126/131
Л5	К1	155/161/164/167	99/101	111	154	126
	К2	155/161/164/167	99/101	111	154	126
	НП	155/161/164/167	99/101	111	154	126
	АП	155/161/164/167	99/101	111	154	126
Л6	К1	155/161/164/167	99	111	154	126/131
	К2	155/161/164/167	99	111	154	126/131
	НП	155/161/164/167	99	111	154	126/131
	АП	155/161/164/167	99	111	154	126/131

Примечание. К1 и К2 – каллусные колонии; НП – проростки с нормальной морфологией; АП – проростки с аномальной морфологией.

На основе микросателлитного анализа образцов эмбриогенной линии № 3, так же как и для линии № 2, детектированы однофракционные (111 п. н., локус *Pa47*; 154 п. н., локус *Pa52*) и двухфракционные (161/164 п. н., локус *Pa28*; 99/101 п. н., локус *Pa33*; 120/131 п. н., локус *Pa56*) спектры. Для всех образцов (каллусные колонии и проростки) эмбриогенной линии № 3 по локусам *Pa28*, *Pa33* и *Pa56* наблюдается соотношение дозы аллельных вариантов близкое к 1 : 1.

Микросателлитный анализ эмбриогенной линии № 4 по локусу *Pa28* показал наличие трех аллелей в изучаемых образцах, что говорит о триплоидном генотипе. Таким образом, в электро-



форетических спектрах присутствовали однофракционные (99 п. н., локус *Pa33*; 111 п. н., локус *Pa47*; 154 п. н., локус *Pa52*), двухфракционные (126/131 п. н., локус *Pa56*) и трехфракционные (161/164/167 п. н., локус *Pa28*) варианты. По локусу *Pa56* для образцов каллусных колоний и проростков отмечено соотношение близкое к 1 : 1. Для локуса *Pa28* у каллусных колоний (рис. 1) долевое участие среди аллелей (161/164/167 п. н.) соответствовало следующим соотношениям: для образца K1 – 3 : 1 : 1 (высоты пиков аллелей – 366 : 133 : 155), для образца K2 – 4 : 1 : 1 (высоты пиков аллелей – 465 : 117 : 122). В отличие от каллусных колоний для проростков с нормальной и аномальной морфологией отмечено значительное превалирование аллелей с размерами продукта 161 и 164 п. н. над аллелем 167 п. н.: 31 : 14 : 1 (высоты пиков аллелей – 1839 : 852 : 60) и 10 : 4 : 1 (высоты пиков аллелей – 667 : 252 : 67) соответственно (рис. 2). Не исключено, что наблюдаемое у проростков (рис. 2) проявление рецессивности аллеля длиной 167 п. н. микросателлитного локуса *Pa28* может быть связано с явлением «проскальзывания» полимеразы во время ПЦР-амплификации, которое приводит к образованию дополнительных ПЦР-продуктов (визуализируются как дополнительные пики («stutter» пики)), отличающихся от нужного продукта кратно длине повторяющейся единицы микросателлита [22, 31, 32]. «Stutter» пики могут давать 5–15 % погрешности в высоте и площади пиков, перекрывающихся с ними по размеру, а также могут диагностироваться до или после основного пика [31–33]. И если учитывать, что в каллусных культурах данный аллель встречается с частотой, сходной с аллелем 164 п. н., то, по-видимому, у проростков мы имеем дело не с появлением артефакта, а с проявлением какого-то варианта селективного отбора. В целом, принимая во внимание изменение дозы аллеля 167 п. н. в разных тканях, а также изменение в них же соотношений и других аллельных вариантов (161/164 п. н. – 2 : 1, 3 : 1, 4 : 1) по одному и тому же микросателлитному локусу, по всей видимости, эмбриогенную линию № 4 следует рассматривать как миксоплоид.

Для образцов эмбриогенных линий № 5 и 6 характерно наличие четырех аллелей по локусу *Pa28*, что свидетельствует о тетраплоидном генотипе. При анализе SSR-профиля локуса *Pa28*

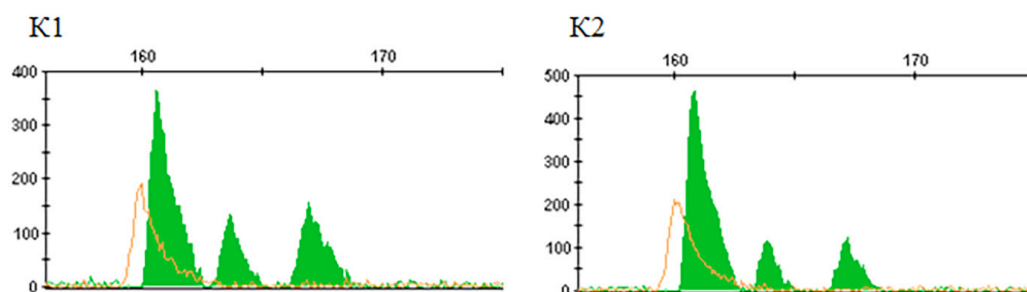


Рис. 1. Микросателлитный спектр по локусу *Pa28* каллусных колоний K1 и K2 эмбриогенной линии № 4 ели европейской

Fig. 1. Microsatellite spectrum for the *Pa28* locus of callus colonies K1 and K2 of embryogenic line No. 4 of Norway spruce

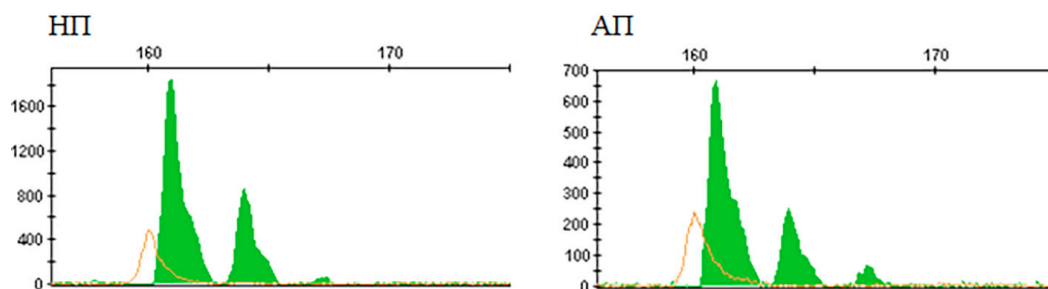


Рис. 2. Микросателлитный спектр по локусу *Pa28* проростков с нормальной (НП) и аномальной (АП) морфологией эмбриогенной линии № 4 ели европейской

Fig. 2. Microsatellite spectrum for the *Pa28* locus of seedlings with normal (NP) and abnormal (AP) morphology of embryogenic line No. 4 of Norway spruce

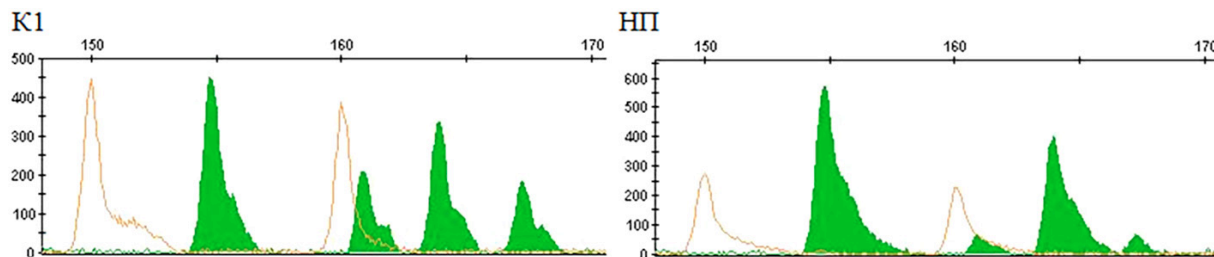


Рис. 3. Микросателлитный спектр по локусу *Pa28* каллусных колоний К1 и проростков с нормальной (НП) морфологией эмбрионной линии № 5 ели европейской

Fig. 3. Microsatellite spectrum for the *Pa28* locus of K1 callus colonies and seedlings with normal (NP) morphology of the embryogenic line No. 5 of Norway spruce

у обеих линий отмечено значительное превалирование аллелей с размерами продукта 155 и 164 п. н. над аллелями 161 и 167 п. н. – высота пиков электрофоретических спектров больше в 2–14 раз (рис. 3). Значительное варьирование в соотношении титров (высоты пиков) аллелей позволяет предположить миксплоидию для обеих эмбрионных линий. По локусу *Pa33*, который был полиморфен у линии № 5, наблюдается выраженный дисбаланс для аллельных вариантов 99 и 101 п. н. по всем проанализированным образцам: от 2 : 1 до 5 : 1. У линии № 6 еще одним (кроме *Pa28*) полиморфным локусом являлся *Pa56*, соотношение доз аллельных вариантов 126 и 131 п. н. для всех образцов было примерно 1 : 1.

В целом электрофоретические профили изучаемых локусов образцов эмбрионных линий № 1–3 содержали одно- и двухфракционные спектры, что соответствует диплоидному набору хромосом, в случае которого выявляются однофракционные (генотип  $A_xA_x$  или  $A_x0$ ) или двухфракционные SSR-спектры ( $A_xA_y$ ). Для проростков с аномальной морфологией эмбрионной линии № 2 соотношения высоты пиков по локусу *Pa33* аллелей в 99 и 101 п. н. сильно варьируют, что может быть связано с миксплоидностью, однако такие же различия в соотношении пиков не наблюдаются по другому локусу с двумя аллельными вариантами (по *Pa28* соотношения аллельных вариантов по всем образцам – приблизительно 1 : 1). Повышенное появление гомозигот в некоторых SSR-локусах косвенно подтверждает гипотезу о селективном давлении, которое может быть вызвано преимуществами рецессивных или доминантных гомозигот. Так, в работе S. Fluch с соавторами [23] при исследовании ели европейской положительный отбор был подтвержден для двух SSR-локусов, которые показали высокую частоту гомозигот.

Для эмбрионной линии № 4 отмечаются электрофоретические профили, представленные одной, двумя и тремя фракциями (локус *Pa28*). Схожие результаты были получены в работе Т. А. Гродецкой с соавторами [24] при молекулярно-генетической оценке растений клонов осины (*Populus tremula* L.) и тополя белого (*P. alba* L.), для которых на основе кариологического и микросателлитного анализов проведено определение пloidности. В данной работе электрофоретические профили генотипов тополя белого, содержащие три набора хромосом, были представлены одной (генотип  $A_xA_xA_x$  или  $A_x00$ ), двумя ( $A_xA_xA_y$  или  $A_xA_y0$ ) или тремя ( $A_xA_yA_z$ ) фракциями. Исходя из этого, можно предположить, что исследуемая нами эмбрионная линия № 4 может иметь триплоидный генотип. Эмбрионные линии № 5 и 6, кроме одно- и двухфракционных SSR-спектров, по локусу *Pa28* были представлены четырехаллельными вариантами – наличием электрофоретического спектра с четырьмя фракциями, что соответствует тетраплоидному числу хромосом. Как для эмбрионной линии № 4 с тремя аллелями по локусу *Pa28*, так и для линий № 5 и 6 с четырьмя аллельными вариантами по этому же SSR-маркеру отмечен выраженный дисбаланс аллелей, что позволяет предполагать наличие миксплоидии. Миксплоидность чаще встречается при генерировании каллусных культур, чем у растений, однако в исследованиях ели европейской естественного происхождения также отмечено наличие у проростков клеток с разной пloidностью, а также с хромосомными перестройками [9, 34]. Учитывая то, что из шести проанализированных линий ели европейской три имели клетки с отличающимся от диплоидного набором хромосом, нельзя однозначно утверждать об отсутствии хромосомных aberrаций

у линий № 1–3. Отсутствие у них трех- или четырехфракционных спектров может быть связано с ограниченным числом используемых SSR-маркеров для анализа. Для дальнейшей оценки однородности тканей таких эмбрионных линий необходимо использовать также и цитогенетические методы исследования.

Для проведения сравнительного анализа кроме эмбрионных линий нами был дополнительно изучен SSR-профиль (по аналогичным микросателлитным маркерам *Pa28*, *Pa33*, *Pa47*, *Pa52* и *Pa56*) 33 генотипов средневозрастных деревьев ели европейской (табл. 3) естественно произрастающих на территории Беларуси (ГОЛХУ «Осиповичский опытный лесхоз»). Для SSR-анализа использовались ткани хвои.

Как следует из табл. 3, по локусу *Pa28* встречалось пять аллелей (155, 161, 164, 167 и 173 п. н.). Для 11 деревьев было выявлено по одному аллельному варианту, для 20 – по два, для 2 – по три. Причем в случае трехаллельных образцов доленое участие вариантов было сходным: 1 : 1 : 1. По локусу *Pa33* у естественно произрастающих деревьев, как и у эмбрионных линий, встречалось два аллеля с размерами продукта 99 и 101 п. н. Среди исследуемых генотипов 29 были представлены одним аллельным вариантом, 5 являлись двухфракционными, среди которых присутствовал генотип с дисбалансом аллельных вариантов. В отличие от эмбрионных линий, для которых по локусам *Pa47* и *Pa52* были выявлены только однофракционные спектры (111 и 154 п. н. соответственно), для деревьев отмечены генотипы с двумя аллельными вариантами: размеры продукта 109/111 п. н. и 111/121 п. н. по локусу *Pa47*, 133/154 п. н. – по локусу *Pa52*. Для гетерозиготных деревьев по локусу *Pa47* идентифицированы образцы с соотношением аллелей 1 : 2 (два генотипа) и 1 : 3 (один генотип), по локусу *Pa52* – 1 : 3 (три генотипа). Анализ электрофоретического спектра SSR-локуса *Pa56* генотипов естественно произрастающих деревьев ели европейской, аналогично эмбрионным линиям, выявил три аллельных варианта (120, 126 и 131 п. н.) и присутствие генотипов с однофракционным и двухфракционным спектром. В целом по результатам микросателлитного анализа 33 деревьев из насаждений ели европейской по 5 EST-SSR маркерам число образцов с тремя аллелями составило 6,1 % (два генотипа), у нескольких деревьев выявлен дисбаланс аллельных вариантов.

Т а б л и ц а 3. SSR-профиль 33 генотипов естественно произрастающих деревьев ели европейской

Table 3. SSR-profile of 33 genotypes of naturally growing Norway spruce trees

$N_a$	SSR-маркер, размер продукта (п. н.) – число образцов				
	<i>Pa28</i>	<i>Pa33</i>	<i>Pa47</i>	<i>Pa52</i>	<i>Pa56</i>
1	155 – 1 161 – 6 164 – 2 167 – 2	99 – 28 101 – 1	111 – 28	154 – 22	126 – 3 131 – 8
2	155/161 – 3 155/164 – 4 161/164 – 8 161/167 – 2 164/167 – 1 167/173 – 2	99/101 – 4	109/111 – 4 111/121 – 1	133/154 – 11	120/131 – 5 126/131 – 17
3	155/161/164 – 1 161/164/167 – 1	–	–	–	–

П р и м е ч а н и е.  $N_a$  – число аллельных вариантов у генотипа.

Результаты сравнения SSR-профилей образцов эмбрионных линий и естественно произрастающих деревьев показывают, что они согласуются для локусов *Pa33*, *Pa47*, *Pa52*, *Pa56* как по размерам продукта, так и по оценке дисбаланса уровня амплификации аллельных вариантов. По локусу *Pa28* у эмбрионных линий установлено присутствие трех- (линия № 4) и четырехфракционных спектров (линии № 5 и 6), у естественно произрастающих деревьев выявлены генотипы с тремя аллелями. По локусам *Pa33*, *Pa47* и *Pa52* у ряда проанализированных образцов



выявлены спектры аллельных вариантов, кратно отличающиеся от соотношения 1 : 1, что может косвенно свидетельствовать о миксоплоидии.

**Заключение.** По результатам проведенного исследования установлено, что все проанализированные нами микросателлитные локусы ели европейской были полиморфны: *Pa33* и *Pa52* имели по два аллеля, *Pa47* и *Pa56* – по три, *Pa28* – по пять. Эмбрионные линии содержали основную часть аллельных вариантов, выявленных в природных популяциях (11 и 15 аллелей соответственно).

Среди 33 естественно произрастающих деревьев ели европейской были идентифицированы два генотипа (6,1 %) с тремя аллельными вариантами по локусу *Pa28*, при этом долевое участие вариантов в исследованных образцах было сходным, что говорит не только о наличии, но и преобладании триплоидных клеток. Как следует из литературных данных, при семенном размножении в лесных питомниках, а также в естественных популяциях среди хвойных видов в небольшом количестве встречаются миксоплоиды и полиплоиды, причем их число увеличивается в стрессовых условиях окружающей среды (край ареала, антропогенно нарушенные территории и т. д.), что авторы связывают с адаптацией растений к неблагоприятным и экстремальным условиям произрастания, интродукцией в новых условиях [9, 35–37].

Микросателлитный анализ каллусных колоний и проростков эмбрионных линий позволил предположить наличие разного уровня пloidности в культурах *in vitro* ели европейской. Изученные ткани линий № 1–3 идентифицированы как диплоидные, хотя наличие выраженного дисбаланса аллельных вариантов у линии № 2 по ряду локусов позволяет предположить наличие большого количества клеток с хромосомными aberrациями или разной пloidностью. Для линии № 4 выявлен триплоидный генотип, а для линий № 5 и 6 – тетраплоидный. Однако считать эти линии истинными полиплоидами затруднительно, поскольку высота пиков аллельных вариантов, и, следовательно, частота встречаемости клеток с теми или иными аллелями сильно различаются. Наиболее вероятным объяснением этого факта является миксоплоидность эмбрионных линий № 4–6, что составляет 50 % от проанализированных линий. Полученные нами данные показывают высокую вероятность возникновения соматоклональной изменчивости в культуре тканей *in vitro* у ели европейской.

Если в обсуждении выйти немного за пределы целевой установки исследования, то следует отметить следующее. Природа высокой частоты изменчивости данных линий может как иметь наследственный характер (зависеть от генотипа родительских деревьев), так и быть связана с условиями формирования эмбрионных линий и зиготических зародышей [38, 39]. Исследованные нами линии ели европейской культивировались в идентичных условиях, поэтому различия, выявленные между линиями, могут быть объяснены только влиянием генотипа, которое может обуславливаться не только степенью предрасположенности генома культивируемых клеток к повышенной мутабельности, но и генотипической гетерогенностью клеток родительских организмов, от которых происходят культуры *in vitro*. Для оценки последнего фактора необходимо проведение анализа родительских деревьев. Но и при этих условиях отцовский генотип может остаться скрытым от исследователя, если в работе используются семена, которые формируются в результате неконтролируемого опыления [40, 41]. Поэтому для оценки наследования дисбаланса аллельных вариантов необходимо получение каллусных культур из семян от контролируемого скрещивания родительских организмов, для которых известны их генетические паспорта.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список использованных источников

1. Козубов, Г. М. Современные голосеменные: (морфолого-систематический обзор и кариология) / Г. М. Козубов, Е. Н. Муратова. – Л.: Наука, 1986. – 192 с.
2. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution / B. Nystedt, N. R. Street, A. Wetterbom [et al.] // Nature. – 2013. – Vol. 497, N 7451. – P. 579–584. <https://doi.org/10.1038/nature12211>
3. Efficient Multi-Sites Genome Editing and Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis in *Picea glauca* / Y. Cui, J. Zhao, Y. Gao [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2021. – Vol. 12. – Art. 751891. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.751891>
4. Бородина, Н. А. Полиплоидия в интродукции древесных растений / Н. А. Бородина. – М.: Наука, 1982. – 176 с.
5. Мацкевич, Н. В. Охрана редких генотипов лесных деревьев и кустарников / Н. В. Мацкевич. – М.: Агропромиздат, 1987. – 207 с.

6. Ohri, D. Polyploidy in Gymnosperms-A Reappraisal / D. Ohri // *Silvae Genetica*. – 2021. – Vol. 70, N 1. – P. 22–38. <https://doi.org/10.2478/sg-2021-0003>
7. Winton, L. L. Natural polyploidy in juvenile white and black spruce / L. L. Winton // *Minnesota Forestry Notes*. – 1964, N 144. – 2 p.
8. Kiellander, C. L. Polyploidy in *Picea abies* / C. L. Kiellander // *Hereditas*. – 1950. – Vol. 36, N 3. – P. 513–516.
9. Ташев, А. Н. Число хромосом и хромосомные перестройки у ели обыкновенной *Picea abies* (L.) Н. Karst. в лесах Рило-Родопского горного массива Болгарии / А. Н. Ташев, Т. С. Седельникова, А. В. Пименов // *Сибирский лесной журнал*. – 2015, № 5. – С. 77–86.
10. Karyological and Cytogenetic Studies of Coniferous Plants Growing under Extreme Conditions / E. N. Muratova, T. S. Sedel'nikova, O. V. Goryachkina, A. V. Pimenov // *Contemporary Problems of Ecology*. – 2023. – Vol. 16, N 5. – P. 564–574. <https://doi.org/10.1134/S1995425523050074>
11. Гуляева, Е. Н. Соматическая изменчивость у хвойных в культуре *in vitro* / Е. Н. Гуляева, Р. В. Игнатенко, Н. А. Галибина // *Экологическая генетика*. – 2020. – Т. 18, № 3. – С. 301–315.
12. Sarmast, M. K. Somaclonal Variation in Conifers / M. K. Sarmast, Z. R. Ghaleh, M. Alizadeh // *Somaclonal Variation: Basic and Practical Aspects* / ed. C. Sánchez-Romero. – Cham, 2024. – P. 123–142. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-51626-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-031-51626-9_7)
13. Megagametophyte *in vitro* tissue culture of *Pinus sibirica* and *Larix sibirica* and somaclonal variation / I. Tretyakova, A. Ivanitskaya, M. Park [et al.] // *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02 on “Woody plant production integrating genetic and vegetative propagation technologies”*, Vitoria-Gasteiz, Spain, 8–12 September 2014 / eds.: Y. S. Park, J. M. Bonga. – 2015. – P. 45–57. – URL: <https://www.iufro.org/media/fileadmin/publications/proceedings-archive/20902-vitoria-gasteiz14-proceedings.pdf> (дата обращения: 10.02.2025).
14. Cytogenetic Stability of Young and Long-Term Embryogenic Cultures of *Larix sibirica* / O. V. Goryachkina, M. E. Park, I. N. Tretyakova [et al.] // *Cytologia*. – 2018. – Vol. 83, N 3. – P. 323–329. <https://doi.org/10.1508/cytologia.83.323>
15. Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis / L. Harvengt, J. F. Trontin, I. Reymond [et al.] // *Planta*. – 2001. – Vol. 213, N 5. – P. 828–832. <https://doi.org/10.1007/s004250100628>
16. Survival and genetic stability of *Picea abies* embryogenic cultures after cryopreservation using a pregrowth-dehydration method / T. Hazubska-Przybyl, P. Chmielarz, M. Michalak [et al.] // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC). – 2013. – Vol. 113. – P. 303–313. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0270-2>
17. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches / J. L. Fourre, P. Berger, L. Niquet, P. André // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1997. – Vol. 94. – P. 159–169. <https://doi.org/10.1007/s001220050395>
18. Genetic variation in microsatellite stability of somatic embryo plants of *Picea abies*: A case study using six unrelated full-sib families / A. Helmersson, G. Jansson, P. V. Bozhkov, S. Von Arnold // *Scandinavian Journal of Forest Research*. – 2008. – Vol. 23, N 1. – P. 2–11. <https://doi.org/10.1080/02827580701820043>
19. Litvay, J. D. 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.) / J. D. Litvay, D. C. Verma, M. A. Johnson // *Plant Cell Reports*. – 1985. – Vol. 4, N 6. – P. 325–328. <https://doi.org/10.1007/bf00269890>
20. Морфогенез эмбрионных культур ели европейской белорусского происхождения на различных этапах культивирования / М. П. Кусенкова, Т. Пшибул-Хазубска, Д. В. Кулагин [и др.] // *Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси*. – Гомель, 2020. – Вып. 80. – С. 55–62.
21. Кусенкова, М. П. Прорастание соматических эмбрионов ели европейской, полученных при различной продолжительности культивирования эмбрионного каллуса на питательных средах для созревания / М. П. Кусенкова // *Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси*. – Гомель, 2021. – Вып. 81. – С. 169–177.
22. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Мн.: Юнипол, 2007. – 176 с.
23. Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.) / S. Fluch, A. Burg, D. Kopecky [et al.] // *BMC Research notes*. – 2011. – Vol. 4. – Art. 401. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-401>
24. Молекулярно-генетический анализ размноженных *in vitro* клонов *Populus alba* L. и *Populus tremula* L. с использованием микросателлитных маркеров / Т. А. Гродецкая, О. Ю. Баранов, С. Г. Ржевский [и др.] // *Лесотехнический журнал*. – 2021. – Т. 11, № 3. – С. 16–30.
25. Баранов, О. Ю. Использование молекулярно-генетических маркеров для анализа плоидности осины и березы / О. Ю. Баранов, В. Балюцкас // *Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси*. – Гомель, 2009. – Вып. 69. – С. 129–135.
26. Development of novel EST-SSR markers for ploidy identification based on *de novo* transcriptome assembly for *Misgurnus anguillicaudatus* / B. Feng, S. V. Yi, M. Zhang, X. Zhou // *PloS one*. – 2018. – Vol. 13, N 4. – P. e0195829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195829>
27. Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn / A. Betekhtin, M. Rojek, J. Jaskowiak [et al.] // *PloS One*. – 2017. – Vol. 12, N 3. – P. e0173537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173537>
28. Somaclonal Variation – Advantage or Disadvantage in Micropropagation of the Medicinal Plants / G. Duta-Cornescu, N. Constantin, D.-M. Pojoga [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, N 1. – Art. 838. <https://doi.org/10.3390/ijms24010838>
29. Шестибратов, К. А. Лесная биотехнология: методы, технологии, перспективы / К. А. Шестибратов, В. Г. Лебедев, А. И. Мирошников // *Биотехнология*. – 2008. – № 5. – С. 3–22.
30. Соматическая изменчивость *Iris pseudacorus* L. По данным RAPD- и цитогенетического анализа / М. М. Козыренко, Е. В. Артюхова, Е. В. Болтенков, Л. С. Лауве // *Биотехнология*. – 2004. – № 2. – С. 13–23.

31. *Taq* DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis:  $(CA/GT)_n$  and  $(A/T)_n$  microsatellites / D. Shinde, Y. L. Lai, F. Z. Sun, N. Arnheim // *Nucleic Acids Research*. – 2003. – Vol. 31, N 3. – P. 974–980. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg178>
32. Галинская, Т. В. Предубеждения о микросателлитных исследованиях и как им противостоять / Т. В. Галинская, Д. М. Щепетов, С. Н. Лысенков // *Генетика*. – 2019. – Т. 55, № 6. – С. 617–632.
33. Hematopoietic chimerism monitoring based on STRs: quantitative platform performance on sequential samples / D. Kristt, M. Israeli, R. Narinski [et al.] // *Journal of Biomolecular Techniques*. – 2005. – Vol. 16, N 4. – P. 378–389.
34. Седельникова, Т. С. Изменчивость числа хромосом как фактор микроэволюции и адаптации хвойных / Т. С. Седельникова // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – 2016. – Т. 18. – С. 24–28.
35. Князева, С. Г. Кариологический обзор хвойных растений на основе базы данных по хромосомным числам / С. Г. Князева, Е. Н. Муратова // *Хвойные бореальной зоны*. – 2010. – Т. 27, № 1–2. – С. 97–101.
36. Горячкина, О. В. Цитогенетические реакции хвойных растений в антропогенно нарушенных районах г. Красноярска и его окрестностей / О. В. Горячкина, О. А. Сизых // *Хвойные бореальной зоны*. – 2012. – Т. 30, № 1–2. – С. 46–51.
37. Кунах, В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений / В. А. Кунах // *Биополимеры и клетка*. – 1995. – Т. 11. – № 6. – С. 5.
38. Kumar, P. S. Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum* / P. S. Kumar, V. L. Mathur // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2004. – Vol. 78, N 3. – P. 267–271. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000025669.11442.3e>
39. Mishiba, K.-I. Ploidy distribution in the explant tissue and the calluses induced during the initial stage of internode segment culture of *Asparagus officinalis* L. / K.-I. Mishiba, K.-I. Tawada, M. Mii // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. – 2006. – Vol. 42, N 1. – P. 83–88. <https://doi.org/10.1079/IVP2005724>
40. Шмаков, В. Н. Соматический эмбриогенез представителей рода *Larix*: состояние и перспективы / В. Н. Шмаков, Ю. М. Константинов // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2020. – Т. 24. – № 6. – С. 575–588.
41. Особенности соматического эмбриогенеза длительно пролиферирующих эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica* in vitro / И. Н. Третьякова, М. Э. Пак, А. С. Иваницкая, Н. В. Орешкова // *Физиология растений*. – 2016. – Т. 63, № 6. – С. 812–822.

## References

1. Kozubov G. M., Muratova E. N. *Modern gymnosperms: (morphological and systematic review and karyology)*. Leningrad, Nauka Publ., 1986. 192 p. (in Russian).
2. Nystedt B., Street N. R., Wetterbom A., Zuccolo A., Lin Y.-Ch., Scofield D. G., Vezzi F. [et al]. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature*, 2013, vol. 497, no. 7451, pp. 579–584. <https://doi.org/10.1038/nature12211>
3. Cui Y., Zhao J., Gao Y., Zhao R., Zhang J., Kong L. Efficient Multi-Sites Genome Editing and Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis in *Picea glauca*. *Frontiers in Plant Science*, 2021, vol. 12, art. 751891. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.751891>
4. Borodina N. A. *Polyploidy in the introduction of woody plants*. M., Nauka Publ., 1982. 176 p. (in Russian).
5. Matskevich N. V *Protection of rare genotypes of forest trees and shrubs*. M., Agropromizdat Publ., 1987. 207 p. (in Russian).
6. Ohri D. Polyploidy in Gymnosperms-A Reappraisal. *Silvae Genetica*, 2021, vol. 70, no. 1, pp. 22–38. <https://doi.org/10.2478/sg-2021-0003>
7. Winton L. L. Natural polyploidy in juvenile white and black spruce. *Minnesota Forestry Notes*, 1964, no. 144. 2 p.
8. Kiellander C. L. Polyploidy in *Picea abies*. *Hereditas*, 1950. vol. 36, no. 3, pp. 513–516.
9. Tashev A. N., Sedel'nikova T. S., Pimenov A. V. Chromosome number and chromosomal rearrangements in Norway spruce *Picea abies* (L.) H. Karst. in the forests of the Rila-Rhodope mountain range of Bulgaria. *Sibirskii lesnoi zhurnal* [Siberian Forest Journal], 2015, no. 5, pp. 77–86 (in Russian).
10. Muratova E. N., Sedel'nikova T. S., Goryachkina O. V., Pimenov A. V. Karyological and Cytogenetic Studies of Coniferous Plants Growing under Extreme Conditions. *Contemporary Problems of Ecology*, 2023, vol. 16, no. 5, pp. 564–574. <https://doi.org/10.1134/S1995425523050074>
11. Gulyaeva E. N., Ignatenko R. V., Galibina N. A. Somaclonal variability in conifers in vitro culture. *Ekologicheskaya genetika* [Ecological Genetics], 2020, vol. 18, no. 3, pp. 301–315 (in Russian).
12. Sarmast M. K., Ghaleh Z. R., Alizadeh M. Somaclonal Variation in Conifers. *Somaclonal Variation: Basic and Practical Aspects*. Cham, 2024, pp. 123–142. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-51626-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-031-51626-9_7)
13. Tretyakova I., Ivanitskaya A., Park M., Voroshilova E., Oreshkova N., Krutovsky K. Megagametophyte in vitro tissue culture of *Pinus sibirica* and *Larix sibirica* and somaclonal variation. *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02 on "Woody plant production integrating genetic and vegetative propagation technologies"*, Vitoria-Gasteiz, Spain, 8–12 September 2014. 2015, pp. 45–57. Available at: <https://www.iufro.org/media/fileadmin/publications/proceedings-archive/20902-vitoria-gasteiz14-proceedings.pdf> (accessed 10.02.2025).
14. Goryachkina O. V., Park M. E., Tretyakova I. N., Badaeva E. D., Muratova E. N. Cytogenetic Stability of Young and Long-Term Embryogenic Cultures of *Larix sibirica*. *Cytologia*, 2018, vol. 83, no. 3, pp. 323–329. <https://doi.org/10.1508/cytologia.83.323>
15. Harvengt L., Trontin J. F., Reymond I., Canlet F., Paques M. Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis. *Planta*, 2001, vol. 213, no. 5, pp. 828–832. <https://doi.org/10.1007/s004250100628>

16. Hazubska-Przybyl T., Chmielarz P., Michalak M., Dering M., Bojarczuk K. Survival and genetic stability of *Picea abies* embryogenic cultures after cryopreservation using a pregrowth-dehydration method. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2013, vol. 113, pp. 303–313. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0270-2>
17. Fourre J. L., Berger P., Niquet L., Andre P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, vol. 94, pp. 159–169. <https://doi.org/10.1007/s001220050395>
18. Helmersson A., Jansson G., Bozhkov P. V., Von Arnold S. Genetic variation in microsatellite stability of somatic embryo plants of *Picea abies*: A case study using six unrelated full-sib families. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 2008, vol. 23, no. 1, pp. 2–11. <https://doi.org/10.1080/02827580701820043>
19. 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 Reports*, 1985, vol. 4, no. 6, pp. 325–328. <https://doi.org/10.1007/bf00269890>
20. Kusenkova M. P., Pshibyl-Khazubska T., Kulagin D. V., Konstantinov A. V., Tret'yakova I. N., Pak M. E., Shuklina A. S., Pakhomova A. P., Padutov V. E. Morphogenesis of embryogenic cultures of Norway spruce of Belarusian origin at different stages of cultivation. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva: sbornik nauchnykh trudov* [Problems of forestry and silviculture: collection of scientific papers]. Gomel, 2020, iss. 80, pp. 55–62 (in Russian).
21. Kusenkova M. P. Germination of somatic embryoids of Norway spruce obtained with different duration of cultivation of embryogenic callus on nutrient media for maturation. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva: sbornik nauchnykh trudov* [Problems of forestry and silviculture: collection of scientific papers]. Gomel, 2021, iss. 81, pp. 169–177 (in Russian).
22. Padutov V. E., Baranov O. Yu., Voropaev E. V. *Methods of molecular genetic analysis*. Minsk: Yunipol Publ., 2007. 176 p. (in Russian).
23. Fluch S., Burg A., Kopecky D., Homolka A., Spiess N., Vendramin G. G. Characterization of variable EST-SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.). *BMC Research notes*, 2011, vol. 4, art. 401. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-401>
24. Grodetskaya T. A., Baranov O. Yu., Rzhetskii S. G., Fedulova T. P., Shabanova E. A., Konstantinov A. V., Mashkina O. S. Molecular genetic analysis of *in vitro* propagated clones of *Populus alba* L. and *Populus tremula* L. using microsatellite markers. *Lesotekhnicheskii zhurnal* [Forestry journal], 2021, vol. 11, no. 3, pp. 16–30 (in Russian).
25. Baranov O. Yu., Balyutskas V. Use of molecular genetic markers for ploidy analysis of aspen and birch. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva: sbornik nauchnykh trudov* [Problems of forestry and silviculture: collection of scientific papers]. Gomel, 2009, iss. 69, pp. 129–135 (in Russian).
26. Feng B., Yi S. V., Zhang M., Zhou X. Development of novel EST-SSR markers for ploidy identification based on de novo transcriptome assembly for *Misgurnus anguillicaudatus*. *PloS one*, 2018, vol. 13, no. 4, p. e0195829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195829>
27. Betekhtin A., Rojek M., Jaskowiak J., Milewska-Hendel A., Kwasniewska J., Kostyukova Y., Kurczynska E., Rymantseva N., Hasterok R. Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 3, p. e0173537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173537>
28. Duta-Cornescu G., Constantin N., Pojoga D.-M., Nicuta D., Simon-Gruita A. Somaclonal Variation – Advantage or Disadvantage in Micropropagation of the Medicinal Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 24, no. 1, art. 838. <https://doi.org/10.3390/ijms24010838>
29. Shestibratov K. A., Lebedev V. G., Miroshnikov A. I. Forest biotechnology: methods, technologies and perspectives. *Biotechnology in Russia*, 2008, no. 5, pp. 1–34 (in Russian).
30. Kozyrenko M. M., Artyukhova E. V., Boltenkov E. V., Lauve L. S. Somaclonal variability of *Iris pseudacorus* L. according to RAPD and cytogenetic analysis. *Biotechnology in Russia*, 2004, no. 2, pp. 11–22 (in Russian).
31. Shinde D., Lai Y. L., Sun F. Z., Arnheim N. *Taq* DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis:  $(CA/GT)_n$  and  $(A/T)_n$  microsatellites. *Nucleic Acids Research*, 2003, vol. 31, no. 3, pp. 974–980. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg178>
32. Galinskaya T. V., Shchepetov D. M., Lysenkov S. N. Prejudices against microsatellite studies and how to resist them. *Russian Journal of Genetics*, 2019, vol. 55, no. 6, pp. 657–671 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S1022795419060048>
33. Kristt D., Israeli M., Narinski R., Or H., Yaniv I., Stein J., Klein T. Hematopoietic chimerism monitoring based on STRs: quantitative platform performance on sequential samples. *Journal of Biomolecular Techniques*, 2005, no. 16, no. 4, pp. 378–389.
34. Sedel'nikova T. S. Variability of chromosome number as a factor of microevolution and adaptation of conifers. *Faktori eksperimental'noi evolyutsii organizmiv* [Factors of experimental evolution of organisms], 2016, vol. 18, pp. 24–28 (in Russian).
35. Knyazeva S. G., Muratova E. N. Karyological review of conifers based on the chromosome number database. *Khvoynye boreal'noi zony* [Conifers of the boreal zone], 2010, vol. 27, no. 1–2, pp. 97–101 (in Russian).
36. Goryachkina O. V., Sizykh O. A. Cytogenetic reactions of coniferous plants in anthropogenically disturbed areas of Krasnoyarsk and its environs. *Khvoynye boreal'noi zony* [Conifers of the boreal zone], 2012, vol. 30, no. 1–2, pp. 46–51 (in Russian).
37. Kunakh V. A. *Genomic variability of plant somatic cells. Biopolimery i kletka* [Biopolymers and the cell], 1995, vol. 11, no. 6, p. 5 (in Russian).
38. Kumar P. S., Mathur V. L. Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, vol. 78, no. 3, pp. 267–271. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000025669.11442.3e>



39. Mishiba K.-I., Tawada K.-I., Mii M. Ploidy distribution in the explant tissue and the calluses induced during the initial stage of internode segment culture of *Asparagus officinalis* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 2006. vol. 42, no. 1, pp. 83–88. <https://doi.org/10.1079/IVP2005724>

40. Shmakov V. N., Konstantinov Yu. M. Somatic embryogenesis of representatives of the genus *Larix*: status and prospects. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii* [Vavilov Journal of Genetics and Breeding], 2020, vol. 24, no. 6, pp. 575–588 (in Russian).

41. Tret'yakova I. N., Pak M. E., Ivanitskaya A. S., Oreshkova N. V. Features of somatic embryogenesis of long-term proliferating embryogenic cell lines of *Larix sibirica* in vitro. *Fiziologiya rastenii* [Plant Physiology], 2016, vol. 63, no. 6, pp. 812–822 (in Russian).

### Информация об авторах

*Падутов Владимир Евгеньевич* – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий отделом. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: forestgen@mail.ru

*Можаровская Людмила Валентиновна* – канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: milamozh@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9106-1877>

*Кулагин Дмитрий Валерьевич* – науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: aqua32@mail.ru

*Падутов Александр Владимирович* – науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: apadutov@yandex.by

*Кусенкова Марина Петровна* – науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: marinaggu@mail.ru

### Information about the authors

*Vladimir E. Padutov* – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: forestgen@mail.ru

*Ludmila V. Mozharovskaya* – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Senior Researcher. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: milamozh@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9106-1877>

*Dmitriy V. Kulagin* – Researcher. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: aqua32@mail.ru

*Alexandr V. Padutov* – Researcher. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: apadutov@yandex.by

*Marina P. Kusenкова* – Researcher. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: marinaggu@mail.ru