

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ГИБРИДОВ ТОПОЛЯ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ В ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ

О. А. Федорова, П. М. Евлаков, Т. А. Гродецкая

ФГБОУ ВО Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова
Поступила в редакцию 05.09.2023 г.

Аннотация. Использование метода клонального микроразмножения ценных генотипов древесных культур дает возможность в сжатые сроки производить высококачественный посадочный материал для воспроизводства лесов. Среди преимуществ метода можно выделить следующие: сохранение генотипа и хозяйственно ценных признаков, преодоление проблем, связанных с гибелью растений на этапе прорастания, сокращение сроков получения растений, преодоление зависимости от сроков созревания семян и периодов низкого плодоношения. Анализ литературных данных по клональному микроразмножению видов *Populus* позволяет сделать вывод, что для его различных форм и даже генотипов необходимы специфические условия для стерилизации эксплантов, проведения процесса мультипликации, ризогенеза, а также укоренения и адаптации к почвенным условиям. Разработана технология клонального микроразмножения 5 перспективных генотипов тополя 'ЭС-38', 'Регенерата', 'Ведуга', 'Осокорь', 'Сакрау'. Установлено, что использование коммерческого препарата "Domestos" в сочетании с мертиолятом и раствором "Белизна" на этапе введения в культуру *in vitro* позволяет получать 66.7 – 100% стерильных эксплантов тополей. Наиболее полно морфогенные свойства растений проявляются на питательных средах WPM и MS, дополненных гормонами 6-БАП 0.3 мг/л, ГК 0.2 мг/л. Оптимизированы условия процесса мультипликации: при соотношениях БАП 0.2-0.5 мг/л коэффициент мультипликации изученных генотипов тополя колеблется от 5-10 побегов/эксплант. Использование более высоких концентраций цитокинина (БАП > 0.5 мг/л) приводит к витрификации побегов и соматоклональной изменчивости. Сформировавшиеся на стадии мультипликации пазушные или индуцированные дополнительные побеги, достигшие высоты 1.5 – 3 см, необходимо укоренить. Процесс ризогенеза у изученных генотипов тополя происходит на среде без добавления дополнительных гормонов за счет высокого уровня эндогенных ауксинов. На 20 сутки ведения процесса ризогенеза длина отдельных корней достигала 7-8 см. Согласно разработанной технологии для всех исследуемых генотипов тополя 'ЭС-38', 'Регенерата', 'Ведуга', 'Осокорь', 'Сакрау' были получены растения в культуре *in vitro*, которые могут быть использованы для получения посадочного материала.

Ключевые слова: тополь, *in vitro* коллекция, экспланты, питательная среда

В последние годы в связи с все более нарастающей проблемой усыхания древесных видов растений и потерей их продуктивности, остро встает вопрос создания новых лесов и улучшения состава древесных пород в уже существующих [1]. В связи с этим важной является проблема обоснованного с научной и практической точек зрения подбора ассортимента лесных древесных пород с улучшенными наследственными свойствами, отличающихся высокими темпами роста, накопления биомассы и потенциалом секвестрации углерода. Наиболее перспективным для плантационного выращивания является тополь (*Populus*

sp.) [2], который играет важную роль в процессе лесовосстановления, особенно на начальных стадиях. Использование древесины тополя может быть разнообразным: древесина тополя является достаточно прочной и долговечной для использования в строительстве, особенно в малоэтажном строительстве, где она может использоваться для изготовления каркасов зданий, балок, полов, стен, дверей и окон. Кроме того, растения тополя используются для укрепления оврагов, лесомелиорации пойм, полезащитного лесоразведения, озеленения городов (мужские экземпляры) и т.д.

В Воронежском Государственном Лесотехническом Университете на экспериментальной базе был создан большой генетический фонд, состо-

ящий из отечественных и интродуцированных (импортированных) видов, форм, селекционных сортов и гибридов тополя, предназначенных для использования в массивных, защитных и озеленительных насаждениях в Центрально-Черноземном регионе России. Современные биотехнологические подходы позволяют эффективно использовать результаты селекции и размножить высококачественный посадочный материал ценных генотипов древесных растений, которые трудно размножить в естественных условиях, с помощью методов клонального микроразмножения (культура *in vitro*) [3,4]. Этот материал используется для плантационного лесовыращивания, что позволяет получать высокие урожаи древесины.

Анализ литературных источников по росту и развитию видов *Populus* в культуре *in vitro* свидетельствует о том, что генотип растения оказывает значительное влияние на подбор специфических условий для индукции, регенерации побегов, их доращивания, укоренения и адаптации к почвенным условиям [5-7].

Цель настоящего исследования – отработка условий получения *in vitro* культуры наиболее перспективных хозяйственно-ценных генотипов тополя с целью дальнейшего получения посадочного материала для плантационного выращиваия.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объекты исследований - 5 генотипов тополя, отличающихся быстрыми темпами роста, секвестрации углекислого газа, зимостойкостью и засухоустойчивостью:

1. Тополь 'ЭС-38' ('Воронежский гигант'). Получен М. М. Вересиным от скрещивания тополя дельтовидного с тополем бальзамическим [8].
2. Тополь 'Регенерата'. Евроамериканский гибрид черных тополей, отобран А. П. Царевым [9].
3. Тополь 'Ведуга'. Гибрид *Populus alba* L. × *Populus alba* L. var. *bolleana* Lauche., получен в 1976 г. А. П. Царевым [9].
4. Тополь черный 'Осокорь'. *Populus nigra*
5. Тополь 'Сакрау' (*Populus* × *euram ericana* (Dode) Guinier cv. 'sacrau-59').

Источником материала для эксплантов являются однолетние недревесневшие побеги тополя, собранные с середины июня до середины августа. Процесс стерилизации побегов проводится согласно предложенной методики [10]. Подготовка побегов включает в себя предварительную стерилизацию с использованием коммерческого препарата "Domestos" и основного стерилизую-

щего агента - раствора мертиолята. Экспланты в асептических условиях помещаются в вертикальном или слегка наклонном положении по одному в культуральные сосуды с питательной средой. Были опробованы 6 вариантов сред: WPM (Woody Plant Medium), среда WPM с уменьшенным в два раза содержанием макросолей (1/2 WPM) [11], WPM с добавлением 6-БАП (6-бензиламинопурина) 0.3 мг/л, ГК (гибберелловой кислоты) 0.2 мг/л, MS (Murashige and Skoog Medium) [12], 1/2MS, MS с добавлением 6-БАП (6-бензиламинопурина) 0.3 мг/л, ГК (гибберелловой кислоты) 0.2 мг/л. Сосуды с растениями выставляются на стеллажи, на которых поддерживались следующие условия климатического режима: 16-ти часовой фотопериод при освещенности 2-3 клк, температура 24-26°C. Наблюдения проводятся в течение 4 недель, по прошествии которых из пазушной почки формируется основной побег. Оценивается число стерильных эксплантов, а также эксплантов, сформировавших основной побег из почки.

Для проведения процесса мультипликации (собственно размножение) используются базовые среды MS и WPM, дополненные регуляторами роста: 6-бензиламинопурина (6-БАП) в концентрации 0.2–0.5 мг/л, индоллил-3-уксусная кислота (ИУК) 0.2 мг/л. Укоренение побегов производится на безгормональных средах MS и WPM.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Введение в культуру *in vitro* взрослых древесных растений - это сложный и непредсказуемый процесс. Выбор экспланта в основном зависит от используемого способа размножения. Наиболее часто при введении в культуру *in vitro* используемый эксплант представляет собой: 1) апикальные или боковые почки интактного растения в состоянии покоя [13, 14]; 2) верхушку или узловыи сегменты, по крайней мере, с одной пазушной почкой активно растущего побега [15]. Вводимый в культуру *in vitro* материал древесных культур содержит на своей поверхности микроорганизмы – бактерии, актиномицеты, грибы; некоторые микроорганизмы способны колонизировать внутренние ткани растений (эндифитная микрофлора) [16]. Поскольку питательные среды, на которых культивируют растения *in vitro*, также идеальны для роста и развития микроорганизмов, культуры растительных тканей должны создаваться и поддерживаться в асептических условиях. Кроме того, с возрастом ткани растений теряют способность к регенерации [17]. Современные биотех-

нологические подходы позволяют успешно решать эти проблемы и получать высококачественный посадочный материал для плантационного лесовыращивания. Для этого используют побеги тополя, заготовленные в летние месяцы. Данные побеги имеют оптимальную обсемененность микроорганизмами, а также структуру, что повышает эффективность стерилизации и вероятность получения асептических жизнеспособных культур. Использование зимних одревесневших побегов менее эффективно, поскольку наличие большого количества эпифитной микрофлоры, а также низкой регенерационной способности эксплантов снижают способность получения *in vitro* растений [18].

Результаты исследований показали, что использование двухступенчатой стерилизации с применением раствора мертиолята [19] позволяет получить от 66,7% до 100% стерильных эксплантов у пяти исследуемых генотипов тополя. Отмечено, что эффективность стерилизации зависит от генотипа растений. Так, более низкие показатели по числу стерильных эксплантов у ‘Ведуги’ связаны с особенностями анатомической структуры растений – более опушенные побеги затрудняют процесс стерилизации.

Одной из специфических проблем при введении древесных растений в культуру является побурение эксплантов, вызванное выделением фенольных веществ. Экспланты тополей склонны выделять нежелательные фенольные вещества при первом размещении на питательной среде. Данные вещества могут быть фитотоксичными, что ведет к некрозу и в конечном итоге, гибели. Простым методом предотвращения побурения эксплантов является их частая пересадка (каждые 2–3 дня) на новое место в том же культуральном сосуде или в новый сосуд. Мы при введении в культуру *in vitro* тополей рекомендуем добавлять в состав питательной среды антиоксиданта - аскорбиновую кислоту в концентрации 5 -15 мг/л.

В процессе введения в культуру *in vitro* древесных растений помимо получения стерильной культуры необходимо провоцировать рост верхушечной или пазушной почек (меристем), поэтому важно оптимизировать состав питательной среды.

При введении в культуру тканей 5 генотипов тополя установлено, что наибольшее количество стерильных эксплантов, сформировавших основной побег, получено на средах WPM и MS, дополненных гормонами БАП и ГК (Таблица 1). При этом их число колеблется от 57.1 до 95.2 на среде WPM и от 47.6 до 95.2 на среде MS. Отмечено, что наибольшей регенерационной способностью обладают генотипы тополя ‘Сакрау’ и ‘ЭС-38’ – до 95.5% жизнеспособных эксплантов. Установлено, что добавление ГК способствует также элонгации индуцированных побегов, что приводит к формированию побегов с хорошим ростом и развитию листовых пластинок (Рисунок 1).

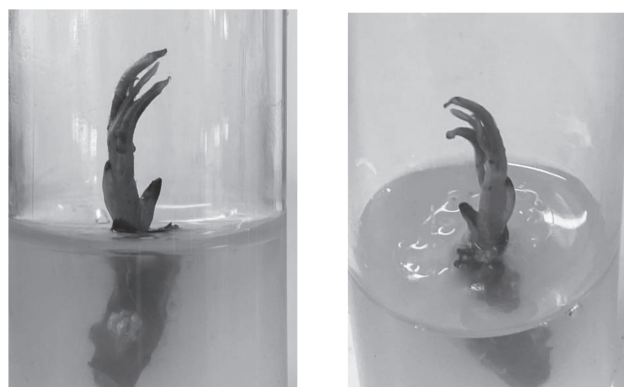


Рис. 1. Успешное введение в культуру *in vitro* тополя ‘Сакрау’ на среде WPM, дополненной БАП 0.3 мг/л, ГК 0.2 мг/л

На остальных изученных средах (1/2MS, 1/2 WPM, безгормональные среды MS и WPM) показатель регенерационной способности был низок, при этом число эксплантов, сформировавших побег составляло 38.1-57.1%.

Таблица 1

Число стерильных и жизнеспособных эксплантов различных генотипов тополя при введении в культуру *in vitro*

Генотип	Питательная среда			
	WPM (БАП 0.3 мг/л, ГК 0.2 мг/л)		MS (БАП 0.3 мг/л, ГК 0.2 мг/л)	
	Число стерильных эксплантов, %	Число стерильных эксплантов, сформировавших основной побег, %	Число стерильных эксплантов, %	Число стерильных эксплантов, сформировавших основной побег, %
‘Сакрау’	95.2	95.2	90.5	90.5
‘ЭС-38’	80.9	71.4	95.2	95.2
‘Регенерата’	100	71.4	95.2	66.7
‘Ведуга’	71.4	57.1	66.7	47.6
‘Осокорь’	100	66.7	90.5	66.7

На мультипликацию (собственно размножение) побеги, полученные на этапе введения, пересаживали в культуральные сосуды (10-15 шт/сосуд) со средой MS или WPM, дополненной 0.3 мг/л 6-БАП, 0.2 мг/л ИУК. Данные концентрации были рекомендованы сотрудниками ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН [5], а также проверены эмпирически. В процессе культивирования эксплантов тополя на питательных средах, содержащих одновременно цитокинины и ауксины, наблюдается высокий процент роста пазушных почек. Данный факт находит подтверждение в работах ученых их Турции, которые при изучении прямого органогенеза четырех видов тополей установили, для активации пазушных почек наиболее оптимальна среда WPM с 0.2 мг/л банзиладенина (БА) 0.01 мг/л α -нафилуксусной кислоты (НУК) [20]. Результаты наших исследований показали, что использование 6-БАП в составе питательных сред WPM и MS в концентрации выше 0,5 мг/л негативно сказывается на процессе мультипликации изучаемых гибридов тополя – появляются витрифицированные побеги, соматоклональная изменчивость. При оптимальных соотношениях БАП 0.2-0.5 мг/мл коэффициент мультипликации тополя колеблется от 5-10 побегов/эксплант.



Рис. 2. Культура *in vitro* тополя 'ЭС-38' на стадии мультипликации

Благодаря высокому уровню эндогенных ауксинов тополь способен укореняться на среде без добавления гормонов. Сформировавшиеся пазушные или индуцированные дополнительные побеги (достигшие высоты 1.5 – 3 см) изолируем и переносим на среду для спонтанного укоренения - WPM или MS без гормонов.

У всех испытываемых генотипов тополя процесс ризогенеза начинался на 4-10 сутки выращивания,

при этом на 20 сутки длина отдельных корней достигала 7-8 см. Для всех исследуемых генотипов тополя 'ЭС-38', 'Регенерата', 'Ведуга', 'Осокорь', 'Сакрау' были получены *in vitro* растения, пригодные для массового тиражирования и получения посадочного материала.



Рис. 3. Культура *in vitro* тополя 'Ведуга' на стадии укоренения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы. Двухстадийная система стерилизации позволяет получать 66.7 – 100% стерильных эксплантов тополей с высокой регенерационной способностью. В ходе исследований по введению в культуру пяти генотипов тополя было показано, что наиболее интенсивное развитие первичных пазушных побегов происходит в условиях сред WPM и MS, дополненных гормонами БАП 0.3 мг/л, ГК 0.2 мг/л. Полученные в *in vitro* культуре микропобеги растений тополя 'ЭС-38', 'Регенерата', 'Ведуга', 'Осокорь', 'Сакрау' пригодны для ведения дальнейших стадий мультипликации (собственно размножения) и укоренения с целью дальнейшего массового тиражирования и получения посадочного материала. Мультипликация побегов тополя оптимальна при содержании БАП 0.2-0.5 мг/мл, ризогенез – на среде без добавления гормонов.

Исследование проводилось в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 1023013000020-6-4.1.2 «Отбор хозяйственно ценных и устойчивых к изменению климата древесных культур, отличающихся высокой биологической продуктивностью»

и потенциалом секвестрации углерода с учетом региональных почвенно-климатических особенностей для реализации лесоклиматических проектов (FZUR-2023-0002)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лебедев В.Г., Булатова И.В., Шадрина Т.Е., Чурочкина О. А., Шестибратов К. А. // Лесохозяйственная информация. 2008. №3. С. 28-29.
2. Царев А. П., Царева Р. П., Царев В. А., Ленченкова О. Ю., Милигула Е. Н. // Лесотехнический журнал. 2019. №1 (33). С. 93-102. DOI: 10.12737/article_5c92016e6498a5.38774878.
3. Confalonieri M, Ballestrazzi A, Bisoffi S, Carbonera D. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2003. V. 72. P. 109–138 DOI:10.1023/A:1022265504775
4. Naapala T., Pakkanen A., Pulkkinen P. // Forest Ecol. and Management. 2004. Vol.193. N3. P.345-354.
5. Патент РФ № 2704839, МПК А01Н 4/00, опубл. 31.10.2019 <https://findpatent.ru/patent/270/2704839.html>
6. Kang B., Osburn L., Kopsell D., Tuskan G. A., Cheng Z.- M. // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2009. Vol. 99. P. 251–257.
7. Богинская Л. А., Кулагин Д.В. // Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений Сборник статей Международной научной конференции Минск, 18–20 августа 2014 г. с. 59-64
8. Царев А. П. Сортоведение тополя. Воронеж; Изд-во ВГУ, 1986. 152 с.
9. Царев А. П. Гибридизация тополей : монография /А. П. Царев, Р. П. Царева, В. А. Царев, П. М. Евлаков. – Воронеж, 2021. – 289 с.
10. Машкина О. С., Табацкая Т. М. Рекомендации по сохранению и воспроизводству метода-ми биотехнологии ценных генотипов карельской березы, осины, тополя белого и сереющего . Воронеж : НИИЛГиС, 2005. 29 с.
11. Lloyd G., McCown D. // Plant Ptopagators Soc. Comb. Proc. 1980. P. 421–427.
12. Murashige T., Scoog F. A. // Phisiol. Planetarium. 1962. V.15. N3. P. 473–497.
13. Erst A. A, Bakulin V. T, Erst A. S, Kuznetsov A. A, Bayahmetov E. Z. // Biosci Biotech Res Asia. 2014;11 DOI: 10.13005/bbra/1442
14. Ahuja M.R. // Cell and tissue culture in forestry. –1987. –Vol.3. –P.207-223
15. Родин А.Р., Калашникова Е.А. Использование методов клеточной и генной инженерии для получения посадочного материала древесных пород. – М.: МГУЛ, 1993. – 90 с.
16. Fedorova O., Grodetzkaya T., Evtushenko N., Evlakov P., Gusev A., Zakharova O. // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2021. V. 875. №. 1. P. 012048 DOI:10.1088/1755-1315/875/1/012048
17. Каримова В.К., Магзумова Г.К., Какимжанова А.А. //Biotechnology. Theory and Practice/ Биотехнология. Теория и практика. 2015. №1, С. 54-63 DOI: 10.11134/btp.1.2015.6
18. Панкова С. М., Федорова О. А., Гродецкая Т. А., Евлаков П. М., Холявка М. Г., Наквасина М. А., Путинцева О. В., Артюхов В. Г. // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. 2023. № 2 . с. 63-67
19. Шабанова, Е.А., Машкина, О.С. // Лесохозяйственная информация 2015. №4.
20. Cavusoglu A., Ipekci-Altas Z., Bajrovic K., Gozukirmizi N. and Zehir A. // African Journal of Biotechnology. 2011. Vol.10(16). P.3216-3221 DOI: 10.5897/AJB10.2400

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова»

Федорова О. А., к.б.н., научный сотрудник лаборатории анализа ПЦР НИИ ИТЛК

E-mail: fed-olga78@mail.ru

Евлаков П. М., к.б.н., главный научный сотрудник лаборатории анализа ПЦР НИИ ИТЛК

Гродецкая Т. А., научный сотрудник лаборатории анализа ПЦР НИИ ИТЛК

Voronezh State Forestry University named after G.F. Morozova

Fedorova O. A., PhD., Researcher, Laboratory of PCR Analysis, Research Institute ITLK

E-mail: fed-olga78@mail.ru

Evlakov P. M., PhD., Chief Researcher, PCR Analysis Laboratory, Research Institute ITLK

Grodetzkaya T. A., Researcher, PCR Analysis Laboratory, Research Institute ITLK

CLONAL MICROPROPIATION OF POPLAR HYBRIDS, PROMISING FOR GROWING IN THE VORONEZH REGION

O. A. Fedorova, P. M. Evlakov, T. A. Grodetskaya

Voronezh State Forestry University named after G.F. Morozova

Abstract. The use of the method of clonal micropropagation of valuable genotypes of tree crops makes it possible to quickly produce high-quality planting material for forest reproduction. Among the advantages of the method are the following: preservation of the genotype and economically valuable traits, overcoming problems associated with the death of plants at the germination stage, reducing the time required to obtain plants, overcoming the dependence on the timing of seed ripening and periods of low fruiting. Analysis of the literature data on clonal micropropagation of *Populus* species allows us to conclude that its various forms and even genotypes require specific conditions for sterilization of explants, the process of multiplication, rhizogenesis, as well as rooting and adaptation to soil conditions. A technology for clonal micropropagation of 5 promising poplar genotypes “ES-38”, “Regenerata”, “Veduga”, “Osokor”, “Sakrau” has been developed. It has been established that the use of the commercial preparation “Domestos” in combination with merthiolate and “Belizna” solution at the stage of introduction into in vitro culture allows one to obtain 66.7 – 100% sterile poplar explants. The most complete morphogenic properties of plants are manifested on WPM and MS nutrient media supplemented with the hormones 6-BAP 0.3 mg/l, GA 0.2 mg/l. The conditions for the multiplication process have been optimized: at BAP ratios of 0.2-0.5 mg/l, the multiplication coefficient of the studied poplar genotypes ranges from 5-10 shoots/explant. The use of higher concentrations of cytokinin (BAP>0.5 mg/l) leads to shoot vitrification and somaclonal variability. Axillary or induced additional shoots formed at the animation stage and reaching a height of 1.5–3 cm must be rooted. The process of rhizogenesis in the studied poplar genotypes occurs on the medium without the addition of additional hormones due to the high level of endogenous auxins. On the 20th day of the rhizogenesis process, the length of individual roots reached 7-8 cm. The technology of clonal propagation has been developed. According to the developed technology, plants were obtained in in vitro culture for all studied poplar genotypes “ES-38”, “Regenerata”, “Veduga”, “Osokor” and “Sakrau”, which can be used to obtain planting material.

Keywords: poplar, *in vitro* collection, explants, nutrient medium

REFERENCES

1. Lebedev V.G., Bulatova I.V., Shadrina T.E., Churochkina O.A., Shestibratov K.A. Forestry information, 2008, No. 3, pp. 28-29.
2. Tsarev A.P., Tsareva R.P., Tsarev V.A., Lenchenkova O.Yu., Miligula E.N. Forestry Journal, 2019, V1(33), pp. 93-102.
3. Confalonieri M, Ballestrazzi A, Bisoffi S, Carbonera D. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2003. V. 72. P. 109–138 DOI:10.1023/A:1022265504775
4. Haapala T., Pakkanen A., Pulkkinen P. Forest Ecol. and Management, 2004, Vol. 193, N3, pp. 345-354.
5. Patent RU 2704839, MPK A01H 4/00, publish. 31.10.2019 <https://findpatent.ru/patent/270/2704839.html>
6. Kang B., Osburn L., Kopsell D., Tuskan G. A., Cheng Z.- M. Plant Cell Tiss Organ Cult., 2009, Vol. 99, pp. 251–257.
7. Boginskaya L., Kulagin D. Proceedings of the International Scientific conference “Biotechnological techniques in the conservation of biodiversity and plant selection”, Minsk 18-19 august, 2014, pp 59-64.
8. Tsarev A. P. 1986 Poplar variety research. Voronezh, p 182.
9. Tsarev A.P., Tsareva R.P., Tsarev V.A., Evlakov P.M. 2021, Poplar hybridization, Voronezh, p 289
10. Mashkina O.S., Tabatskaya T.M. Recommendations for the conservation and reproduction by biotechnology methods of valuable genotypes of Karelian birch, aspen, white and gray poplar, Voronezh, 2005, p 29.
11. Lloyd G., McCown D. Plant Ptopagators Soc. Comb. Proc. 1980, pp. 421–427.
12. Murashige T., Scoog F.A. Phisiol. Planetarium, 1962, V.15, N3, pp. 473–497.
13. Erst A.A, Bakulin V.T, Erst A.S, Kuznetsov A.A, Bayahmetov E.Z. Biosci Biotech Res Asia, 2014:11 DOI: 10.13005/bbra/1442
14. Ahuja M.R. Cell and tissue culture in forestry, 1987, Vol. 3, pp.207-223.

15. Rodin A.R., Kalashnikova E.A. The use of cell and genetic engineering methods to obtain planting material for tree species. M.: MGUL, 1993, 90 p.
16. Fedorova O., Grodetzkaya T., Evtushenko N., Evlakov P., Gusev A., Zakharova O. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. OP Publishing, 2021, V. 875, №. 1, P. 012048 DOI:10.1088/1755-1315/875/1/012048
17. Karimova V.K., Magzumova G.K., Kakimzhanova A.A. Biotechnology. Theory and Practice, 2015, No. 1, pp. 54-63 DOI: 10.11134/btp.1.2015.6
18. Pankova S.M., Fedorova O.A., Grodetzkaya T.A., Evlakov P.M., Kholyavka M.G., Nakvasina M.A., Putintseva O.V., Artyukhov V.G. Proceeding of Voronezh State University, Series: Chemistry. Biology. Pharmacy, 2023, V.2, pp. 63-67.
19. Shabanova E.A., Mashkina O.S. Forestry information, 2015, V. 4 <https://cyberleninka.ru/article/n/klonalnoe-mikrorazmnozhenie-hozyaystvenno-tsennyh-form-topolya>
20. Cavusoglu A., Ipekci-Altas Z., Bajrovic K., Gozukirmizi N., Zehir A. African Journal of Biotechnology, 2011, Vol.10(16), pp. 3216-3221. DOI: 10.5897/AJB10.2400