

4.1.2. – Селекция, семеноводство и биотехнология растений (сельскохозяйственные науки)

УДК: 631.532:581.143.6:581.192.7

DOI: 10.34736/FNC.2023.122.3.011.75-80

## Оценка способности к каллусообразованию некоторых древесных растений в культуре *in vitro*

Надежда Геннадьевна Фоменко✉, e-mail: fomenko-n@vfanc.ru, аспирант, м.н.с., ORCID: 0000-0002-0783-6447

Ольга Олеговна Жолобова, к.б.н., в.н.с., ORCID: 0000-0002-1594-4181

«Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук» (ФНЦ агроэкологии РАН), info@vfanc.ru, 400062, г. Волгоград, пр. Университетский, 97, Россия

**Аннотация.** Для достижения высокой мелиоративной эффективности защитных лесных насаждений в борьбе с опустыниванием и деградацией земель все чаще используются биотехнологические и селекционно-генетические методы. Многие представители древесных видов растений, имеющих важное значение в защитном лесоразведении, сложно размножаются традиционными способами, поэтому для решения данной задачи все чаще применяются биотехнологические подходы. В статье представлены результаты исследования способности *Robinia pseudoacacia* L. и гибрида *Ulmus* sp. к каллусообразованию в условиях *in vitro*. В качестве эксплантов использовались зеленые побеги и листья заранее асептически выращенных регенерантов. Культивирование эксплантов проводили в течение 28 дней, с фотопериодом 16 часов, на питательных средах Мурасига&Скуга, содержащих в своем составе синтетические фитогормоны: цитокинин TDZ и ауксин 2,4-D, в пяти различных концентрациях от 0,5 до 2,5 мг/л, с интервалом 0,5. В ходе проведения опыта было установлено, что исследуемые растительные объекты обладают способностью к каллусообразованию, эффективный фитогормон для активной индукции и нарастания четко оформленной каллусной ткани для *Ulmus* sp. является TDZ в невысоких концентрациях от 0,5 до 1,5 мг/л, на 2,4-D также формировался каллус, но он был не структурирован и сильно обводнен на всех концентрациях. У *R. pseudoacacia* на TDZ отмечалась высокочастотная регенерация побегов с незначительным формированием плотного каллуса в прикорневой зоне. Наиболее подходящим оказался ауксин 2,4-D в невысоких концентрациях от 0,5 до 1,5 мг/л, также на этих концентрациях отмечалось формирование почек ризогенеза.

**Ключевые слова:** каллус, ауксин 2,4-D, TDZ, *Robinia pseudoacacia*, *Ulmus* sp.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания НИР ФНЦ агроэкологии РАН № 122020100427-1 «Разработать научные основы сохранения и воспроизводства ценных генотипов древесных и кустарниковых растений в культуре *in vitro*».

**Цитирование.** Фоменко Н.Г., Жолобова О.О. Оценка способности к каллусообразованию некоторых древесных растений в культуре *in vitro*// Научно-агрономический журнал. 2023. 3(122). С. 75-80. DOI: 10.34736/FNC.2023.122.3.011.75-80

Поступила в редакцию: 09.08.2023

Принята к печати: 11.09.2023

**Введение.** В последнее время наблюдалось резкое усиление антропогенной нагрузки на биосферу, что в свою очередь привело к значительным изменениям климата, деструкции многообразия функциональных связей в природе, снижению или полной потере способности агроэкосистем к естественному восстановлению и саморегуляции. Для борьбы с опустыниванием и деградацией земель важнейшее место отводится применению защитных лесных насаждений в агрофере [1; 2].

Достижение высокого качества и мелиоративной эффективности защитных лесных насаждений осуществляется методом подбора пород и проведением комплекса лесохозяйственных мероприятий в насаждениях. Одним из главных условий по оптимизации породного состава защитных лесных насаждений является создание местной семенной и питомнической базы, маточных плантаций на основе использования биотехнологических и селекционно-генетических методов [3].

Однако многие виды древесных и кустарниковых пород, имеющих важное значение в агроле-

сомелиорации, трудно размножаются естественным путем. Поэтому перспективным методом для решения данной задачи является соматический эмбриогенез. Он позволяет не только за короткие сроки накопить большой объем растительного материала с полным использованием регенеративных способностей растительных клеток, но также проводить селекционные мероприятия и исследования по влиянию стрессовых факторов (засоление, засуха, низкие температуры) и устойчивости к ним на каллусных культурах растений [10; 14].

На сегодняшний день методы клеточной инженерии разработаны для многих растений, которые позволяют расширить генетическое разнообразие исходного селекционного материала. Одним из важнейших этапов данных биотехнологий является регенерация растений из каллусных тканей путем соматического эмбриогенеза [11; 16]. Индукция каллусогенеза в условиях *in vitro* во многом зависит от условий культивирования, а именно гормонального состава индукционной среды, светового режима, генотипа и физиологического

статуса экспланта в момент его инокуляции на питательную среду [13]. Исследования по соматическому эмбриогенезу проводились на различных видах растений: *Dioscorea alata* [6], *Bactris gasipaes* [15], *Theobroma cacao* [17] и др. Этот метод также был успешно применен при клональном размножении различных голосеменных растений, таких как *Picea* [5] и *Ephedra foliata* [9].

Цель исследования – выявление и оценка способности к каллусогенезу у *Robinia pseudoacacia* и гибрида *Ulmus sp.* в культуре *in vitro*.

**Материалы и методика исследования.** В качестве исследуемых объектов были выбраны 2 древесных вида: *Robinia pseudoacacia* L. и гибрид *Ulmus sp.* Эти виды растений широко используются в защитном лесоразведении, поскольку они быстрорастущие, не требовательны к почве, хорошо переносят засуху, низкие температуры и засоление почвы.

Индукцию каллусных тканей осуществляли на питательной среде, приготовленной по протоколу Мурасиге&Скуга (Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учеб. пособие. М.: ФБк-Пресс, 1999. 160 с.), дополнительно вносили синтетические фитогормоны: ауксин 2,4 – дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D) и цитокинин тидиазурон (TDZ), в пяти концентрациях от 0,5 до 2,5 мг/л, с интервалом 0,5.

В качестве эксплантов использовали сегменты зеленых побегов и листьев, которые были заранее выращены в условиях *in vitro*. Перенос эксплантов на индукционную питательную среду осуществляли в условиях ламинар-бокса БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2 (Россия), для этого с помощью стерильных пинцета и скальпеля нарезали сегменты частей асептически выращенных растений: зеленые побеги (1-2 междоузлия), лист длиной примерно 0,5-1 см [18].

Культивирование осуществляли в течении 4-х недель, на фитостеллажах СТЕЛЛАР-ФИТО LINE (Россия) с 16-ти часовым фотопериодом и температурой 22-24°C.

По завершению этапа культивирования, оценивалась индукция каллусогенеза (ИК) и морфологические особенности образовавшихся каллусных

тканей. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета программы Microsoft Excel и представлена в виде среднего арифметического с учетом ошибки среднего. Сравнение полученных результатов между собой проводилось по U-критерию Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при  $p < 0.05$ . Индукцию рассчитывали по формуле [4]:

$$\text{ИК} = \left( \frac{\text{кол-во каллуса индуцированное эксплантами}}{\text{общее кол-во инокулированных эксплантов}} \right) * 100\%$$

**Результаты и обсуждение.** В ходе проведенного исследования было установлено, что исследуемые растительные объекты способны к каллусогенезу. Однако отмечались существенные различия в структурных особенностях каллусных тканей.

При анализе полученных данных, была установлена видоспецифичная реакция на фитогормоны в питательной среде. У *Ulmus sp.* отмечалась активная индукция каллусообразования на всех концентрациях 2,4-D и TDZ и составляла от 92 до 100 %. Высокая индукционная способность рода *Ulmus*, подтверждается и в исследованиях Conde P. с соавторами [7], которые установили, что активный каллусогенез у *Ulmus minor* Mill происходит на питательных средах как с ауксином (2,4-D), так и на средах с цитокинином (кинетин).

У *Robinia pseudoacacia* прямой зависимости индукции от концентрации фитогормона установлено не было, однако наилучшая индукция наблюдалась на питательных средах с 2,4-D (от 89 до 100%). На средах с TDZ максимальная индукция отмечалась только на концентрации 1,5 мг/л и составляла 83%. Полученные данные подтверждаются ранее проведенным исследованием Rastogi S. и U. N. Dwivedi [19] где было определено, что для устойчивого каллусогенеза растений семейства *Fabaceae*, к которым также относится и *Robinia pseudoacacia*, более подходящим является ауксин 2,4-D. Подробные результаты представлены в таблице 1.

Разные строчные буквы (a-c) показывают статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ). На 28-30 день проводилась структурно-морфологическая оценка образовавшихся каллусных тканей (таблица 2).

Таблица 1. Индукция каллусогенеза *Robinia pseudoacacia* и *Ulmus sp.* в зависимости от фитогормонов и их концентраций

Индукция каллусогенеза, %				
мг/л	Robinia pseudoacacia		Ulmus sp.	
	TDZ	2,4-D	TDZ	2,4-D
0,5	58±8,4 <sup>a</sup>	100±0 <sup>c</sup>	100±0 <sup>c</sup>	100±0 <sup>c</sup>
1	58±8,4 <sup>a</sup>	89±11 <sup>bc</sup>	100±0 <sup>c</sup>	100±0 <sup>c</sup>
1,5	83±9,6 <sup>b</sup>	91,7±8,3 <sup>bc</sup>	100±0 <sup>c</sup>	100±0 <sup>c</sup>
2	67±13,6 <sup>ab</sup>	100±0 <sup>c</sup>	100±0 <sup>c</sup>	92±7,6 <sup>bc</sup>
2,5	67±23,6 <sup>ab</sup>	91,7±8,3 <sup>bc</sup>	100±0 <sup>c</sup>	100±0 <sup>c</sup>

Таблица 2. Морфологические особенности каллусных культур *R. pseudoacacia* и *Ulmus sp.* в зависимости типа экспланта и фитогормона

<i>Robinia pseudoacacia</i>					
Эксплант	2,4-D, мг/л				
	0,5	1	1,5	2	2,5
Побег	Белый <sup>4*</sup> , рыхлый	Белый с зелеными включениями <sup>4</sup> рыхлый	Белый <sup>3</sup> , рыхлый	Белый <sup>3</sup> , рыхлый	Белый с зелеными включениями <sup>4</sup> рыхлый
Лист	Светло-бежевый <sup>1</sup> , рыхлый	Светло-бежевый <sup>1</sup> , рыхлый	Светло-бежевый <sup>2</sup> , рыхлый	Светло-бежевый <sup>0</sup> , рыхлый	Светло-бежевый <sup>0</sup> , рыхлый
Эксплант	TDZ, мг/л				
	0,5	1	1,5	2	2,5
Побег	Зеленый <sup>1</sup> , плотный	Светло-коричневый <sup>1</sup> , плотный	Светло-коричневый с зелеными включениями <sup>2</sup> плотный	Светло-коричневый <sup>2</sup> , плотный, обводненный	Светло-коричневый с зелеными включениями <sup>3</sup> , плотный
Лист	Зеленый <sup>3</sup> , плотный	Зеленый <sup>4</sup> , плотный	Зеленый <sup>3</sup> , плотный	Зеленый <sup>3</sup> , плотный	Зеленый <sup>4</sup> , плотный
<i>Ulmus sp.</i>					
Эксплант	2,4-D, мг/л				
	0,5	1	1,5	2	2,5
Побег	Светло-коричневый <sup>2</sup> , плотный, обводненный	Коричневый, плотный <sup>2</sup> , обводненный	Серо-коричневый <sup>2</sup> , плотный, обводненный	Серо-коричневый <sup>2</sup> , плотный, обводненный	Коричневый, плотный <sup>2</sup> , обводненный
Лист	Бело-серый <sup>1</sup> , плотный	Бело-серый <sup>1</sup> , плотный	Бело-серый <sup>0</sup> , плотный, обводненный	Бело-серый <sup>1</sup> , плотный, обводненный	Бело-серый <sup>0</sup> , плотный, обводненный
Эксплант	TDZ, мг/л				
	0,5	1	1,5	2	2,5
Побег	Светло-коричневый <sup>4</sup> , ср. плотности*	Светло-коричневый <sup>3</sup> , ср. плотности	Светло-коричневый с красными включениями <sup>3</sup> ср. плотности	Светло-коричневый с красными включениями <sup>3</sup> ср. плотности	Светло-коричневый <sup>4</sup> , ср. плотности
Лист	Бело-серый <sup>2</sup> , ср. плотности	Бело-серый <sup>1</sup> , ср. плотности	Бело-серый <sup>1</sup> , ср. плотности	Бело-серый <sup>0</sup> , ср. плотности	Бело-серый <sup>0</sup> , ср. плотности

Примечание: \*покрытие эксплантов каллусом: 0 – 0%, 1 – 25%, 2 – 50%, 3 – 75%, 4 – 100%.  
\*\*Средней плотности

Было установлено, что образование каллусной ткани зависит от типа экспланта. На листовых эксплантах формирование каллуса было незначительное, при этом отмечалась его видоспецифичность, так лист *Robinia pseudoacacia* приобретал

плотную структуру, полностью покрытую тонким слоем плотного зеленого каллуса с адаксиальной стороны листа (рисунок 1а). У *Ulmus sp.* наблюдалось потемнение листовых эксплантов с формированием каллуса на жилках листа (рисунок 1б).

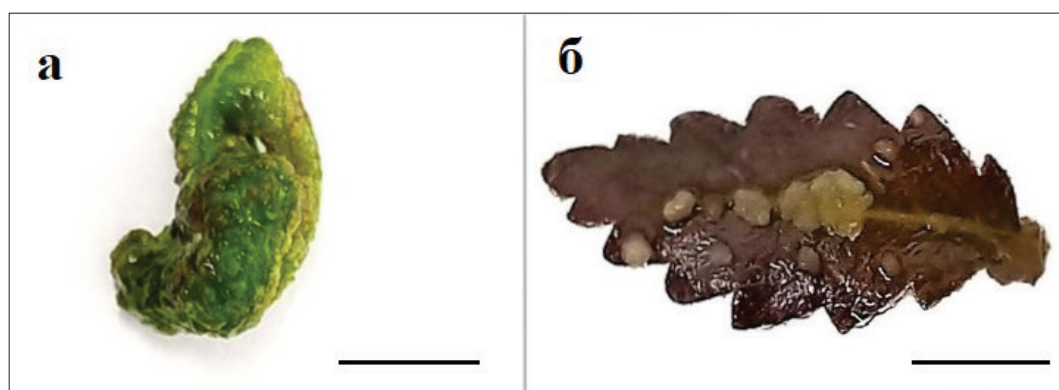


Рисунок 1. Структура каллуса на листовых эксплантах: а – *Robinia pseudoacacia*; б – *Ulmus sp.*, масштаб 0,5 см

У всех исследуемых образцов, вне зависимости от типа фитогормона и его концентрации, наибольшее нарастание каллуса отмечалось на сегментах побега. В прикорневой зоне побега *Ulmus* sp. на концентрациях TDZ от 0,5 до 1,5 мг/л образовывался каллус средней плотности светло-коричневого цвета с красными включениями и имел четко дифференцированную структуру клеток, также отмечалось утолщение побега, с активной регенерацией листьев, но при этом рост самого побега отсутствовал (рисунок 2а). На более высоких концентрациях (2 – 2,5 мг/л), каллус был более обводненным, без четкого деления на клеточные структуры, при этом как и на более низких концентрациях наблюдалось утолщение побега и активная регенерация листьев (рисунок 2б). На питательных средах с ауксином 2,4-D каллус был плотный и сильно обводненный, серого цвета, отмечалась некротизация исходного экспланта (рисунок 2в). Согласно данным исследования Conde P. с соавторами [7] для получения эмбрионного каллуса вяза требуются только низкие концентрации ауксина 2,4-D. В нашем исследовании присутствие в индукционной среде низких

концентраций 2,4-D не влияло на формирование морфогенного каллуса. С другой стороны, в исследовании *Corredoira* с соавторами [8] на *U. glabra* и *U. minor*, эмбрионные культуры были получены в среде, дополненной цитокинином (BA). Следовательно, мы можем выдвинуть гипотезу, что для устойчивого развития морфогенного каллуса в питательной среде необходимо присутствие комбинации цитокинина и ауксина.

У эксплантов зеленых побегов *Robinia pseudoacacia* в прикорневой зоне, на питательной среде с TDZ на всех исследуемых концентрациях формировался компактный, светло-коричневый и зеленый каллус. Как и в ранее проведенном исследовании М. Hosseini-Nasr и А. Rashid [12] у *Robinia pseudoacacia* отмечалась высокочастотная регенерация побегов (рисунок 2г). На ауксине 2,4-D формировался белый каллус рыхлой структуры, на невысоких концентрациях от 0,5 до 1,5 мг/л отмечалось образование почек ризогенеза и активное развитие побегов (рисунок 2д), на концентрациях 2 и 2,5 мг/л структура каллуса не изменилась, но наблюдался хлороз у регенерируемых побегов (рисунок 2е).

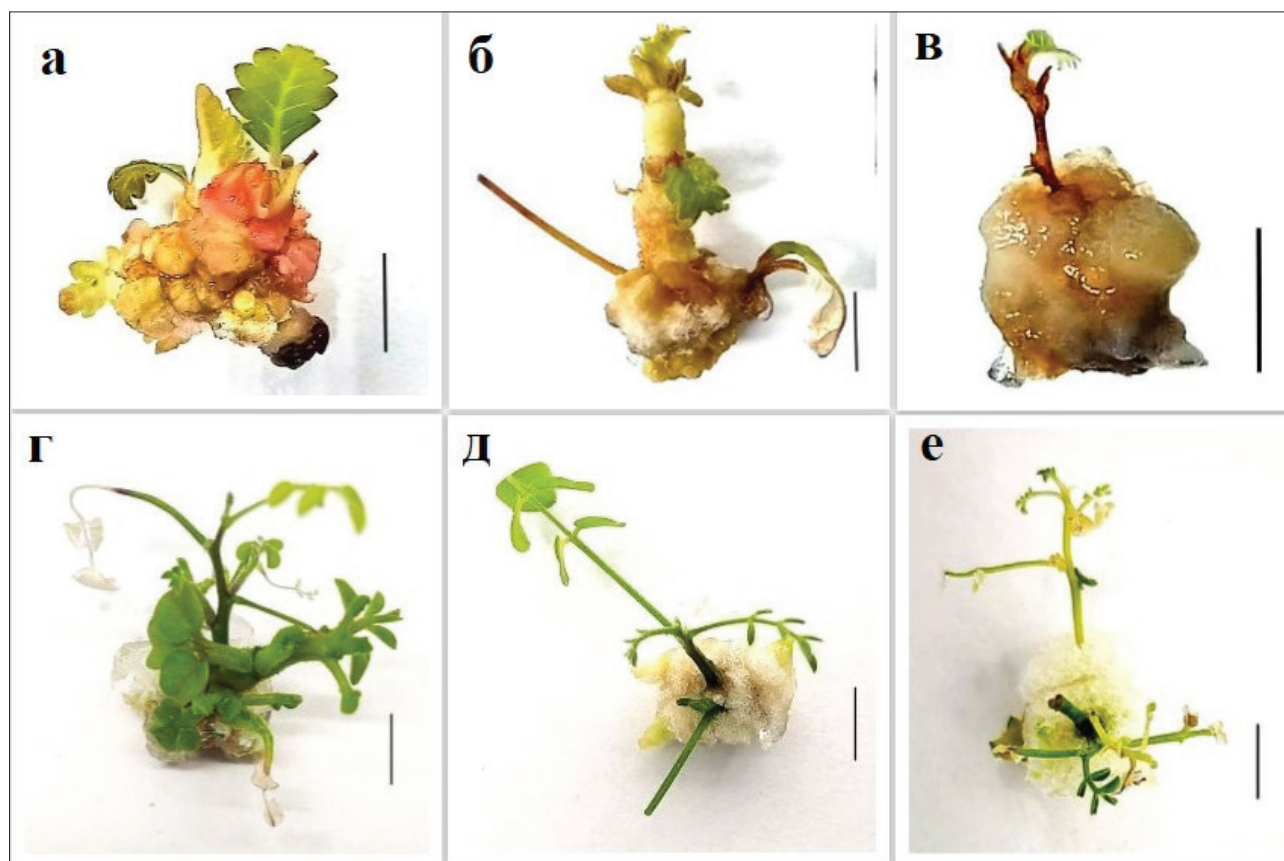


Рисунок 2. Структура каллусных тканей *Ulmus* sp. (а – TDZ – 1,5 мг/л; б – TDZ – 2,5 мг/л; в – 2,4-D – 0,5 мг/л), *Robinia pseudoacacia* (г – TDZ – 0,5 мг/л; д – 2,4-D – 0,5 мг/л; е – 2,4-D – 2,5 мг/л), масштаб – 0,5 см

**Заключение.** *Ulmus* sp. и *Robinia pseudoacacia* проявляли различную реакцию на вид фитогормона, так для *Ulmus* sp. наиболее эффективным для индукции и нарастания каллуса оказался TDZ в

невысоких концентрациях, до 1,5 мг/л, для *Robinia pseudoacacia* 2,4-D в концентрации до 1,5 мг/л. Также результаты показали, что при необходимости высокочастотного побегообразования у *Robinia*

*pseudoacacia* можно использовать TDZ в невысоких концентрациях от 0,5 до 1 мг/л.

#### Литература:

1. Глобальный климат и почвенный покров России: проявление засухи, меры предупреждения, борьбы, ликвидация последствий и адаптационные мероприятия (сельское и лесное хозяйство) / под ред. Р.С.Х. Эдельгериева. М.: ООО «Издательство МБА». 2021. Т. 3. 700 с. DOI: 10.52479/978-5-6045103-9-1
2. Кулик К.Н. Современное состояние защитных лесонасаждений в Российской Федерации и их роль в смягчении последствий засух и опустынивания земель // Научно-агрономический журнал. 2022. №. 3(118). С. 8-13. DOI: 10.34736/FNC.2022.118.3.001.08-13
3. Маттис Г.Я. Пути повышения качества и эффективности искусственных лесных насаждений в аридном регионе европейской территории России // Лесное хозяйство. 2003. № 2. С. 37-40.
4. Abd El-Hameid A.R., Abo El-kheir Z.A., Abdel-Hady M.S. Identification of DNA variation in callus derived from *Zingiber officinale* and anticoagulation activities of ginger rhizome and callus. *Bulletin of the National Research Centre*. 2020; 44:103-108. DOI: 10.1186/s42269-020-0281-9
5. Ahmad I., Johansson S., Andrade G., Dedicova B., Egertsdotter U. Somatic embryogenesis for mass propagation of elite Spruce families: effect of storage time on somatic embryogenesis initiation. *BMC Proceedings – BioMed Central*. 2011;5:1-3. DOI: 10.1186/1753-6561-5-S7-P127
6. Belarmino M.M., Gonzales J.R. Somatic embryogenesis and plant regeneration in purple food yam (*Dioscorea alata* L.). *Ann Trop Res*. 2008;30(2):22-33. DOI: 10.32945/atr3022.2008
7. Conde P., Loureiro J., Santos C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. *Plant Cell Reports*. 2004;22(9):632-639. – DOI: 10.1007/s00299-003-0735-1
8. Corredoira E., Vieitez A. M., Ballester A. Somatic Embryogenesis in Elm. *Annals of Botany*. 2002;89(5):637-644, DOI: 10.1093/aob/mcf080
9. Dhiman M., Sharma V., Moitra S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Ephedra foliata* Boiss a non-confif-

erous gymnosperm. *Plant tissue culture and Biotechnology*. 2010;20(2):133-143. DOI: 10.3329/ptcb.v20i2.6893

10. George E.F., Debergh P.C. Micropropagation: uses and methods. Plant propagation by tissue culture. Netherlands. *Springer Publ. house*. 2008;1:29-64. DOI: 10.1007/978-1-4020-5005-3\_2
11. Hosseini-Nasr M., Rashid A. Thidiazuron-induced high-frequency shoot regeneration from root region of *Robinia pseudoacacia* L. seedlings. *Biologia plantarum*. 2003;47: 593-596. DOI: 10.1023/B:BIOP.0000041068.19770.95
12. Luciani G.F., Mary A.K., Pellegrini C., Curvetto N.R. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. *Plant cell, tissue and organ culture*. 2006;87:139-143. DOI: 10.1007/s11240-006-9148-5
13. Maciel S.A., Fermino Junior P.C., Silva R.A., Scherwinski-Pereira J.E. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 2010; 32: 263-267. DOI: 10.4025/actasciagron.v32i2.3248
14. Quainoo A.K., Dwomo B.I. The effect of TDZ and 2,4-D concentrations on the induction of somatic embryo and embryogenesis in different cocoa genotypes. *Plant Studies*. 2012;1(1): DOI:10.5539/jps.v1n1p72
15. Ramírez-Mosqueda M.A. Somatic Embryogenesis. *Methods in Molecular Biology*. 2022:1-8. DOI: 10.1007/978-1-0716-2485-2
16. Rastogi S., Dwivedi U.N. Regeneration and genetic transformation of tree legumes with special reference to *Leucaena* species. *Applied Genetics of Leguminosae Biotechnology*. 2003:301-326. DOI: 10.1007/978-94-017-0139-6\_19
17. Isah T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2016;38:1-22. DOI: 10.1007/s11738-016-2134-6
18. Nic-Can G. I., Loyola-Vargas V. M. The role of the auxins during somatic embryogenesis. *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*. 2016. pp. 171-182. DOI: 10.1007/978-3-319-33705-0\_10
19. Germana M.A., Maurizio L.E. In vitro embryogenesis in higher plants. New York, Heidelberg: Humana Press. 2016. pp. 559. DOI: 10.1007/978-1-4939-3061-6

DOI: 10.34736/FNC.2023.122.3.011.75-80

## Assessment of the Ability to Callus Formation of Some Woody Plants in “in vitro” Culture

Nadezhda G. Fomenko<sup>✉</sup>, e-mail: fomenko-n@vfanc.ru, ORCID: 0000-0002-0783-6447

Olga O. Zholobova, Cand. Sci. (Biol.), ORCID: 0000-0002-1594-4181

“Federal Scientific Centre of Agroecology, Complex Melioration and Protective Afforestation of the Russian Academy of Sciences” (FSC of Agroecology RAS), e-mail: info@vfanc.ru, 400062, Universitetskiy Prospekt, 97, Volgograd, Russia

**Abstract.** Biotechnological and breeding-genetical methods are increasingly used to achieve high reclamation efficiency of protective forest plantations in the combating against desertification and land degradation. Many representatives of woody plant species that are important in protective afforestation are difficult to reproduce by traditional methods, so biotechnological approaches are increasingly being used to solve this problem. The article presents the

results of a study of the *Robinia pseudoacacia* L. and the hybrid *Ulmus sp.* to callus formation ability in vitro. Green shoots and leaves of aseptically grown regenerants were used as explants. Explants were cultured for 28 days, with a photoperiod of 16 hours, on Murashiga Skuga nutrient environment containing synthetic phytohormones: cytokinin TDZ and auxin 2,4-D, in five different concentrations from 0.5 to 2.5 mg/l, with an interval of 0.5. During the experiment,

it was found that the studied plant objects have the ability to callus formation, an effective phytohormone for active induction and growth of clearly formed callus tissue for *Ulmus sp.* It is TDZ in low concentrations from 0.5 to 1.5 mg/l, a callus was also formed on 2,4-D, but it was not structured and heavily watered at all concentrations. In *R. pseudoacacia*, high-frequency regeneration of shoots with insignificant formation of dense callus in the basal zone was observed on TDZ. Auxin 2,4-D turned out to be the most suitable in low concentrations from 0.5 to 1.5 mg/l, and the formation of rhizogenesis kidneys was also noted at these concentrations.

**Keywords:** callus, 2,4-D, TDZ, *Robinia pseudoacacia*, *Ulmus sp.*

**Funds.** The work was carried out within the framework of the state task of the Scientific Research Center of Agroecology of the Russian Academy of Sciences No. 122020100427-1 "Develop scientific foundations for the conservation and reproduction of valuable genotypes of woody and shrubby plants in in vitro culture".

**Citation.** Fomenko N.G., Zholobova O.O. Assessment of the Ability to Callus Formation of Some Woody Plants in "in vitro" Culture. *Scientific Agronomy Journal*. 2023;3(122):75-80. DOI:10.34736/FNC.2023.122.3.011.75-80

Received: 09.08.2023

Accepted: 11.09.2023

#### References:

1. National report "Global Climate and soil cover of Russia: drought manifestation, prevention and control measures, elimination of consequences and adaptation measures (agriculture and forestry)" / edited by R.S.-H. Edelgeriev. 2021; 3. M. IBA Publishing House LLC. 700 p (In Russ.)
2. Kulik K.N. The current state of protective forest plantations in the Russian Federation and their role in mitigating the effects of droughts and land desertification. *Nauchno-agronomicheskij zhurnal = Scientific Agronomy Journal*. 2022;3(118):8-13. (In Russ.) DOI: 0.34736/FNC.2022.118.3.001.08-13.
3. Mattis G.Ya. Ways to improve the quality and efficiency of artificial forest plantations in the arid region of the European territory of Russia. *Lesnoe khozyajstvo*. 2003;2:37-40. (In Russ.)
4. Abd El-Hameid A.R., Abo El-kheir Z.A., Abdel-Hady M.S. Identification of DNA variation in callus derived from *Zingiber officinale* and anticoagulation activities of ginger rhizome and callus. *Bulletin of the National Research Centre*. 2020; 44:103-108. DOI: 10.1186/s42269-020-0281-9
5. Ahmad I., Johansson S., Andrade G., Dedicova B., Egertsdotter U. Somatic embryogenesis for mass propagation of elite Spruce families: effect of storage time on somatic em-

bryogenesis initiation. *BMC Proceedings – BioMed Central*. 2011;5:1-3. DOI: 10.1186/1753-6561-5-S7-P127

6. Belarmino M.M., Gonzales J.R. Somatic embryogenesis and plant regeneration in purple food yam (*Dioscorea alata* L.). *Ann Trop Res*. 2008;30(2):22-33. DOI: 10.32945/atr3022.2008

7. Conde P., Loureiro J., Santos C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. *Plant Cell Reports*. 2004;22(9):632-639. DOI: 10.1007/s00299-003-0735-1

8. Corredoira E., Vieitez A. M., Ballester A. Somatic Embryogenesis in Elm. *Annals of Botany*. 2002; 89(5): 637-644. DOI: 10.1093/aob/mcf080

9. Dhiman M., Sharma V., Moitra S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Ephedra foliata* Boiss a non-coniferous gymnosperm. *Plant tissue culture and Biotechnology*. 2010; 20(2): 133-143. DOI: 10.3329/ptcb.v20i2.6893

10. George E.F., Debergh P.C. Micropropagation: uses and methods. Plant propagation by tissue culture. Netherlands. *Springer Publ. house*. 2008;1:29-64. DOI: 10.1007/978-1-4020-5005-3\_2

11. Hosseini-Nasr M., Rashid A. Thidiazuron-induced high-frequency shoot regeneration from root region of *Robinia pseudoacacia* L. seedlings. *Biologia plantarum*. 2003;47: 593-596. DOI: 10.1023/B:BIOP.0000041068.19770.95

12. Luciani G.F., Mary A.K., Pellegrini C., Curvetto N.R. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. *Plant cell, tissue and organ culture*. 2006;87:139-143. DOI: 10.1007/s11240-006-9148-5

13. Maciel S.A., Fermino Junior P.C., Silva R.A., Scherwinski-Pereira J.E. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 2010;32:263-267. DOI: 10.4025/actasciagron.v32i2.3248

14. Quainoo A.K., Dwomo B.I. The effect of TDZ and 2,4-D concentrations on the induction of somatic embryo and embryogenesis in different cocoa genotypes. *Plant Studies*. 2012;1(1): DOI:10.5539/jps.v1n1p72

15. Ramírez-Mosqueda M.A. Somatic Embryogenesis. *Methods in Molecular Biology*. 2022. pp. 1-8. DOI: 10.1007/978-1-0716-2485-2

16. Rastogi S., Dwivedi U.N. Regeneration and genetic transformation of tree legumes with special reference to *Leucaena* species. *Applied Genetics of Leguminosae Biotechnology*. 2003. pp. 301-326. DOI: 10.1007/978-94-017-0139-6\_19

17. Isah T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2016; 38: 1-22. DOI: 10.1007/s11738-016-2134-6

18. Nic-Can G. I., Loyola-Vargas V. M. The role of the auxins during somatic embryogenesis. *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*. 2016. pp. 171-182. DOI: 10.1007/978-3-319-33705-0\_10

19. Germana M.A., Maurizio L.E. In vitro embryogenesis in higher plants. New York, Heidelberg: Humana Press. 2016. pp. 559. DOI: 10.1007/978-1-4939-3061-6

**Авторский вклад.** Авторы настоящего исследования принимали непосредственное участие в планировании, выполнении и анализе данного исследования, ознакомились и одобрили представленный окончательный вариант.

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

**Author's contribution.** Authors of this research paper have directly participated in the planning, execution and analysis of this study. Authors of this paper have read and approved the final version submitted.

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest.