

Индукция каллусогенеза и непрямого морфогенеза гибрида *Populus deltoides* Marshall × *Populus alba* L. в условиях *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., зав. лабораторией, ORCID: 0000-0002-1594-4181
лаборатория биотехнологий

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

Аннотация. Виды и гибриды *Populus* часто используются в качестве модельных объектов в биотехнологии и селекции лесных деревьев, а также активно применяются в защитном лесоразведении, благодаря таким качествам, как быстрые темпы роста и хорошая адаптация к условиям деградированных почв. Культура растительных клеток и тканей может использоваться в качестве инструмента для селекции растений путем разработки стратегий отбора соматоклональных вариаций и устойчивых к стресс-факторам генотипов. В статье представлены результаты исследования по индукции каллусогенеза и непрямого морфогенеза у гибрида *Populus deltoides* Marshall × *Populus alba* L. (*Populus* F₁). В качестве первичных эксплантов использовали листовые сегменты и побеги растений, выращенных в культуре *in vitro*. Индукцию каллусогенеза осуществляли на питательной среде Murashige и Scoog (MS), дополненную синтетическим ауксином 2,4-Д либо цитокинином ТДЗ в пяти концентрациях 0,5-2,5 мг/л с интервалом 0,5. Активная индукция и формирование компактного первичного каллуса были достигнуты при невысоких концентрациях (0,5-1 мг/л) ТДЗ на листовых эксплантах. Для остановки ростовых процессов каллусной культуры и формирования морфогенных зон в качестве стресс-фактора использовали 20 г/л полиэтиленгликоля 6000, с последующим переносом трансплантов каллуса на питательную среду MS для непрямого регенерации побегов. Полученные регенеранты активно росли и укоренялись после их отделения от каллуса и переноса на свежую питательную среду. По результатам проведенного исследования разработан простой и эффективный протокол регенерации гибрида *Populus* F₁ путем непрямого морфогенеза из каллусных тканей в культуре *in vitro*.

Ключевые слова: каллус, 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, тидиазурон, *Populus* F₁, непрямого морфогенез.

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. Индукция каллусогенеза и непрямого морфогенеза гибрида *Populus deltoides* Marshall × *Populus alba* L. в условиях *in vitro* // Научно-агрономический журнал. 2024. 2(125). С. 76-81. DOI: 10.34736/FNC.2024.125.2.011.76-81

Поступила в редакцию: 29.04.2024

Принята к печати: 11.06.2024

Введение. Виды и гибриды *Populus* интенсивно выращиваются для целлюлозной промышленности и производства биомассы. Поскольку растения данного вида отличаются быстрыми темпами роста и хорошо адаптируются к условиям деградированных почв, они активно применяются в защитном лесоразведении, рекультивации нарушенных ландшафтов и озеленении в регионах мира с умеренным климатом [2].

Тополь является одним из часто используемых модельных объектов в биотехнологии и селекции лесных деревьев. Однако длительность периода, необходимого для оценки наличия или отсутствия полезных признаков у растений, является серьезным ограничением для классической селекции [8]. Культура растительных клеток и тканей может использоваться в качестве инструмента для селекции растений, поскольку клетки под действием регуляторов роста претерпевают специфические

изменения в процессе культивирования. Таким образом, селекционеры могут разработать соответствующие стратегии отбора соматоклональных вариаций для получения улучшенных генотипов тополя по устойчивости к стресс-факторам и скорости роста [6; 15].

Метод культуры клеток и тканей, применяемый в биотехнологии растений, основывается на уникальном свойстве растительных клеток – тотипотентности. Это означает, что каждая клетка содержит полный генетический набор информации о структуре и функциях всего организма. Соответственно путем дифференцировки из одной клетки можно получить полноценное растение – регенерант [5; 10]. Исходя из этого основным аспектом в использовании культуры каллусной ткани является стимуляция морфогенеза и разработка эффективных протоколов регенерации целых растений. Опубликовано большое количество эксперимен-

тальных работ, посвященных изучению как образования каллусов *in vitro*, так и процессов морфогенеза у представителей многих семейств растений, в том числе и у видов и гибридов *Populus* [3; 13; 17]. Согласно литературным данным, на процесс индукции морфогенеза соматических клеток оказывают влияние различные экзогенные факторы (гормональный и минеральный состав питательной среды, условия культивирования *in vitro*, стресс-факторы и др.) и эндогенные (генотип донорного растения, его физиологический статус и др.) [10; 16; 18]. Оптимальный гормональный состав питательной среды, тип экспланта для индукции первичного каллуса, а также условия культивирования для получения растений-регенерантов необходимо подбирать эмпирическим путем индивидуально для каждого вида растения.

Цель нашего исследования – определить оптимальные условия для индукции каллусогенеза и способность к непрямому морфогенезу гибрида *Populus F₁* в условиях *in vitro*.

Материалы и методика исследования. Исследование проводилось в 3-кратной повторности в 2023 году на базе лаборатории биотехнологий селекционно-семеноводческого центра ФНЦ агроэкологии РАН. В качестве модельного объекта исследования был выбран гибрид тополя, который был получен в результате целенаправленного скрещивания *Populus deltoides* Marshall × *Populus alba* L. (*Populus F₁*).

Для индукции каллусогенеза использовали питательную среду, приготовленную по протоколу Murashige и Scoog (MS), дополненную синтетическими фитогормонами: ауксином 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) или цитокинином тидиазурон (ТДЗ), в пяти концентрациях от 0,5 до 2,5 мг/л, с интервалом 0,5. Инокуляцию первичных эксплантов осуществляли по той же методике, как и в предыдущем исследовании [5]. По истечении 28 дней культивирования на фитостеллажах СТЕЛЛАР-ФИТО LINE (Россия) с 16-ти часовым фотопериодом и температурой 22–24 °С осуществляли оценку свежей массы, морфологических характеристик первичного каллуса (цвет, структура) и индукции каллусогенеза (ИК), рас-

чет которой проводили по формуле [4]:

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

Оценку массы свежего первичного каллуса реализовывали при помощи лабораторных весов ВЛ-120С (Россия). Данные были обработаны с использованием программного обеспечения StatSoft Inc. (USA). Для выявления статистической значимости различий между количественными показателями использовался критерий Фишера (F-тест), по результатам которого различия считались статистически значимыми при значении $p < 0,05$. Полученные результаты представлены в виде средней арифметической с учетом ошибки среднего. Для наглядного представления данных и создания гистограмм использовали пакет программ Microsoft Excel.

Для остановки ростовых процессов и формирования морфогенных зон применяли осмотический стресс, для этого транспланты первичного каллуса в асептических условиях переносили на питательную среду MS, дополненную 20 г/л полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ 2 %), и культивировали при тех же условиях в течение 14 дней. После осуществляли отбор морфогенного каллуса с последующим его переносом на безгормональную питательную среду MS.

Результаты и обсуждение. При анализе полученных данных в ходе исследования было установлено, что *Populus F₁* обладает высокой способностью к каллусообразованию. На всех исследуемых вариантах питательных сред вне зависимости от гормона и его концентрации, а также от типа экспланта, индукция каллусогенеза составляла 91,7–100 % (таблица 1). Полученные данные согласуются с результатами ранее проводимых исследований у представителей рода *Populus*, 100 % индукция каллусогенеза была зафиксирована Erst A.A. с соавторами у *P. alba* и *P. nigra* на питательных средах MS с добавлением 2,4-Д [9], а в исследовании Maheshwari с соавторами аналогичные результаты активной индукции каллусных тканей (90–100 %) были получены у *P. angustifolia*, *P. balsamifera* и *P. deltoides* на питательных средах MS, дополненных зеатином и ТДЗ [14].

Таблица. Индукция каллусогенеза *Populus F₁* в зависимости от фитогормонов и их концентраций

мг/л	Индукция каллусогенеза, %	
	2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота	Тидиазурон
0,5	100±0,0 а	100±0,0 а
1	91,7±8,3 а	100±0,0 а
1,5	91,7±8,3 а	100±0,0 а
2	100±0,0 а	91,7±8,3 а
2,5	100±0,0 а	100±0,0 а

Примечание. В таблице представлены средние значения ± ошибка среднего, одинаковые буквы в столбце означают отсутствие статистических различий согласно F-тесту при $p < 0,05$.

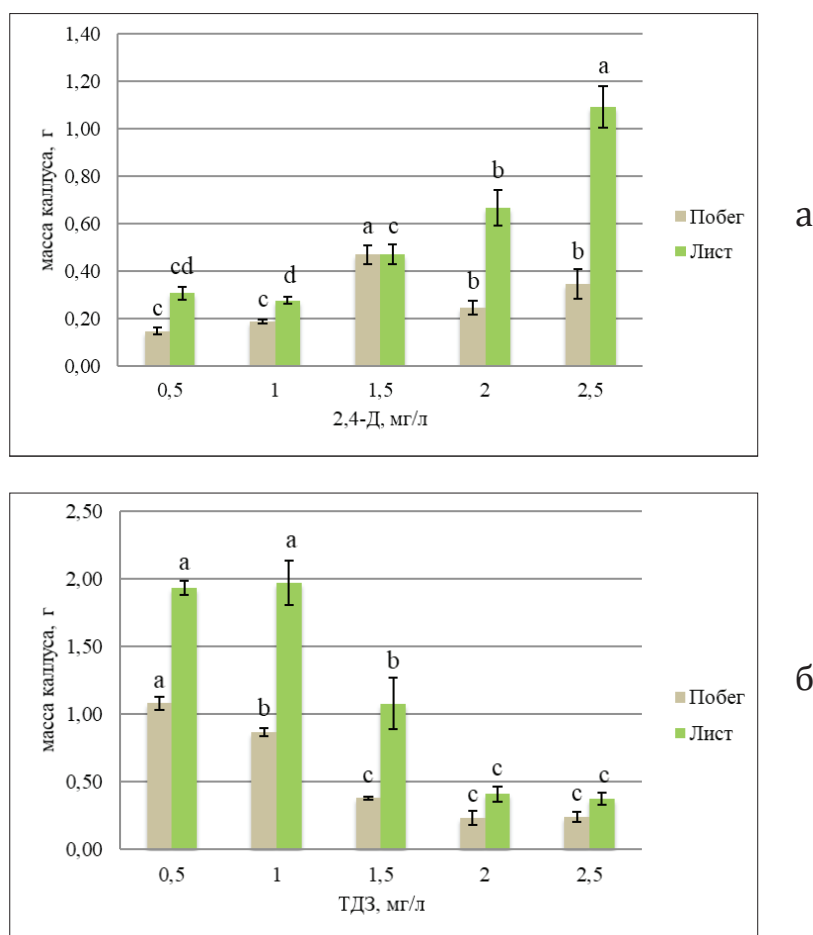


Рисунок 1. Прирост массы каллуса на эксплантах *Populus F₁* в зависимости от фитогормона и типа экспланта. На гистограммах представлены средние значения ± ошибка среднего. Разные строчные буквы (a-d) означают статистически значимые различия согласно F-тесту $p < 0,05$

Было отмечено, что на нарастание массы первичного каллуса оказывают влияние тип экспланта и концентрация фитогормона. Максимальные показатели массы каллусных тканей фиксировались на листовых эксплантах при концентрации ТДЗ 0,5-1 мг/л (1,93 и 1,97 г соответственно) и 2,4-Д 2,5 мг/л (1,09 г). О том, что лист является наиболее подходящим эксплантом для получения каллусных культур у представителей рода *Populus*, подтверждается и результатами исследования С. Билоус, согласно которым, было установлено, что фрагменты листовой пластины *Populus tremula* характеризуются более активным каллусогенезом, чем побеги [1]. Также была установлена прямая и обратная зависимость между массой образовавшегося каллуса и концентрацией 2,4-Д (рис. 1 а) и ТДЗ (рис. 1 б) соответственно.

При анализе морфологических особенностей каллусных тканей было установлено, что на структуру каллуса оказывает влияние концентрация и тип фитогормона, а также используемый первичный эксплант. На всех побеговых эксплантах вне зависимости от гормонального состава среды образовывался сильно обводненный рыхлый каллус белого и коричневого цвета (рис. 2 а, б). Аналогичный каллус формировался и на листо-

вых эксплантах в присутствии ауксина 2,4-Д на всех исследуемых концентрациях (рис. 2 в, г). Компактную, четко дифференцированную каллусную ткань удалось получить на питательной среде с низкими концентрациями ТДЗ (0,5 и 1 мг/л), при более высоких значениях цитокинина формировался плотный каллус (рис. 2 д, е). Данные согласуются с результатами Li Н. с соавторами, которые также определили, что низкие концентрации ТДЗ способствуют росту и пролиферации компактного каллуса у серого тополя (*P. tremula* × *P. alba*) [12].

После переноса полученных трансплантов первичного компактного каллуса на питательную среду с ПЭГ 2 % отмечалась остановка роста каллусных тканей, а по истечении 14 дней культивирования, фиксировались четко оформленные морфогенные зоны (рис. 3). Полученные данные согласуются с результатами исследования Heringer с соавторами [11], которые сообщили, что добавление 10 % PEG-3350 в культуральную среду увеличивало количество и качество морфогенных каллусов у *Carica papaya* L.

У отобранных морфогенных каллусов после переноса на безгормональную питательную среду MS отмечались активные ростовые процессы (рис. 4 а).

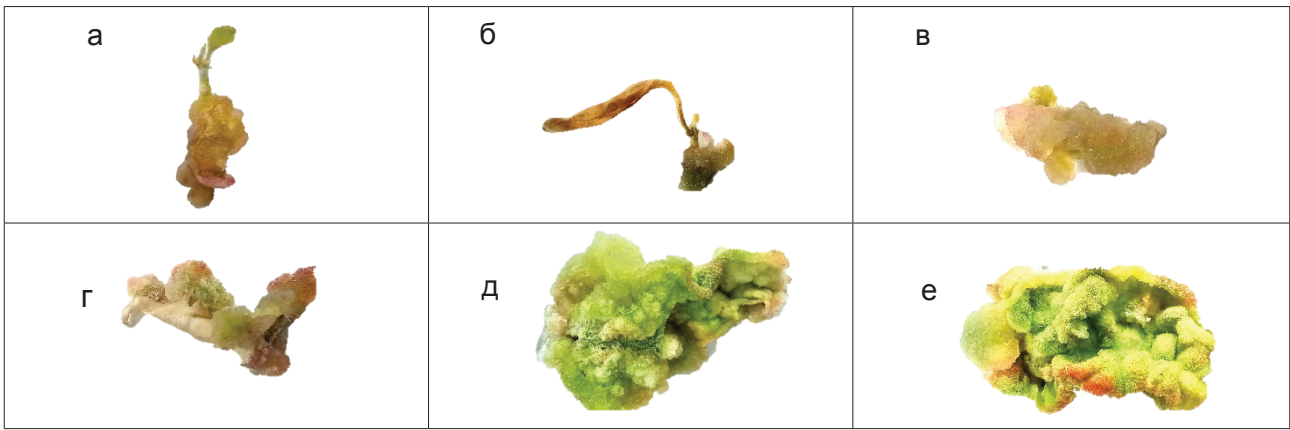


Рисунок 2. Морфологические особенности первичных каллусных тканей *Populus F₁* в зависимости от типа экспланта, фитогормона и его концентрации: а – 2,4-Д 1 мг/л; б – ТДЗ 2 мг/л; в – 2,4-Д 2,5 мг/л; г – 2,4-Д 1 мг/л; д – ТДЗ 0,5 мг/л; е – ТДЗ 2 мг/л. Масштаб 0,5 см

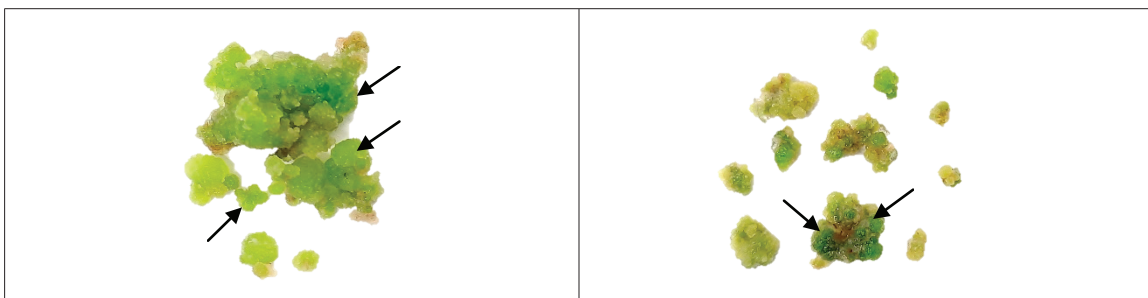


Рисунок 3. Формирование морфогенных зон первичного каллуса после 14 дней культивирования на питательной среде с ПЭГ 2 %. Стрелками обозначены морфогенные очаги. Масштаб 0,5 см

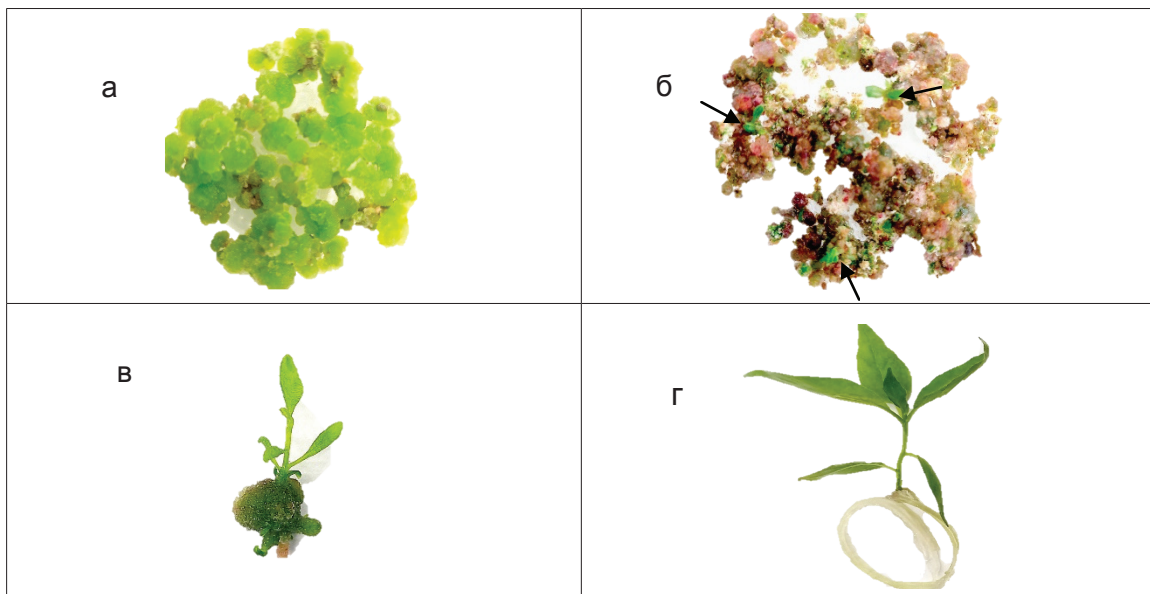


Рисунок 4. Непрямая регенерация *Populus F₁* на питательной среде MS из каллусных тканей: а – нарастание морфогенного каллуса после переноса на среду MS; б – начало непрямого регенерации из каллуса (стрелками показаны точки регенерации из каллуса); в – полученные регенеранты с признаками витрификации; г – *Populus F₁* через 3 недели после отделения от каллуса и переноса на среду MS. Масштаб 0,5 см

Разрастающийся каллус субкультивировали на свежую питательную среду каждые 3 недели. После 4 пассажа рост каллуса прекратился, и отмечались активные процессы непрямого морфогенеза из каллусных тканей (рис. 4 б). Формировавшиеся растения имели признаки обводненности листьев (рис. 4 в). Однако после их отделения от

каллуса и переноса на питательную среду MS, по истечении 4 недель признаки витрификации исчезали, а у растений отмечался активный рост и хорошее укоренение (рис. 4 г).

Заключение. По результатам проведенного исследования разработан простой и эффективный протокол регенерации гибрида тополя

Populus deltoides Marshall × *Populus alba* L. путем непрямого морфогенеза из каллусных тканей в культуре *in vitro*. Активная индукция и формирование компактного первичного каллуса были достигнуты при невысоких концентрациях (0,5-1 мг/л) ТДЗ на листовых эксплантах. Для остановки ростовых процессов и формирования морфогенных зон полученный каллус культивируется на среде MS, дополненной ПЭГ 2 % в течение 14 дней с последующим субкультивированием на безгормональной питательной среде для непрямого регенерации побегов. Полученные регенераты активно росли и укоренялись после их отделения от каллуса и переноса на свежую среду MS.

Данный протокол может быть использован для проведения дальнейших исследований по тканевой селекции и отбора устойчивых форм *Populus F₁* к различным абиотическим стресс-факторам.

Литература:

1. Билоус С. Особенности непрямого морфогенеза осины (*Populus tremula* L.) зеленокорой формы. ResearchGate. 2013;1(73):45-51. https://www.researchgate.net/publication/320016318_The_features_indirect_morphogenesis_of_aspen_Populus_tremula_L_green-bark_form
2. Зинатуллина А. Е. Структурные особенности клеток эксплантов *in vivo* и формирование морфогенных каллусов *in vitro* (обзор) // Биомика. 2021. Т. 13. № 1. С. 8-19. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-2
3. Круглова Н. Н. Органогенез *in vitro* как реализация свойства плюрипотентности стволовых клеток морфогенного каллуса // Экобиотех. 2023. Т. 6. № 2. С.104-112. DOI:10.31163/2618-964X-2023-6-2-104-112
4. Фоменко Н. Г., Жолобова О. О. Определение потенциала клонового подвоя ВСЛ-2 к каллусогенезу в условиях *in vitro* / X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов. 2023. С. 258-259. DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-139
5. 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
6. Чепурной В. С., Максимцов Д. В. Практическая агролесомелиорация: Методические указания по изучению эколого-биологических особенностей и морфологических признаков древесных видов для защитного лесоразведения. Краснодар: Кубанский ГАУ, 2016. 98 с.

DOI: 10.34736/FNC.2024.125.2.011.76-81

Induction of Callusogenesis and Indirect Morphogenesis in the *Populus deltoides* Marshall × *Populus alba* L. Hybrid *in vitro*

Nadezhda G. Fomenko✉, e-mail: fomenko-n@vfanc.ru, Postgraduate student, ORCID: 0000-0002-0783-6447
Olga O. Zholobova, Cand. Sci. (Biol.), Leader Researcher, ORCID: 0000-0002-1594-4181
Laboratories of Biotechnology

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

Abstract. *Populus* species and hybrids are often used as model objects in biotechnology and forest tree breeding, and are also actively used in protective afforestation, due to such qualities as fast growth rates and good adaptation to degraded soil conditions. The

7. Ayesh G., Pankaj K., Ajay K. T., Dinesh K. S. *In vitro* plant regeneration studies and their potential applications in *Populus spp.*: a review. *Israel Journal of Plant Sciences*. 2016;63(2):77-84. DOI: 10.1080/07929978.2015.1076982

8. Confalonieri M., Balestrazzi A., Bisoffi S. et al. *In vitro* culture and genetic engineering of *Populus spp.*: synergy for forest tree improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003;72:109-138. DOI: 10.1023/A:1022265504775

9. Erst A. A., Bakulin V. T., Erst A. S., Kuznetsov A. A., Bayahmetov E. Z. *In vitro* propagation of ornamental hybrids of *Populus L.* *Biosci. Biotech. Res. Asia*. 2014;11:69-77. DOI: 10.13005/bbra/1442

10. Feher A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? *Front. Plant Sci*. 2019;10:536. DOI: 10.3389/fpls.2019.00536

11. Heringer A. S., Vale E. M., Barroso T., Santa-Catarina C., & Silveira V. Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN 01 seeds. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. 2013;25:116-124. DOI: 10.1590/S2197-00252013000200004

12. Li H., Wang H., Guan L., Li Z., Wang H., Luo J. Optimization of High-Efficiency Tissue Culture Regeneration Systems in Gray Poplar. *Life*. 2023;13(9):1896. DOI: 10.3390/life13091896

13. Ma C., Goddard A., Peremysova E., Duan C., Jiang Y., Nagle M., Strauss S. H. Factors affecting *in vitro* regeneration in the model tree *Populus trichocarpa* L. Medium, environment, and hormone controls on organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2022;58(6):837-852. DOI: 10.1007/s11627-022-10301-9

14. Maheshwari P., Kovalchuk I. Efficient shoot regeneration from internodal explants of *Populus angustifolia*, *Populus balsamifera* and *Populus deltoides*. *New biotechnology*. 2011;28(6):778-787. DOI: 10.1016/j.nbt.2011.05.005

15. Orzechowska M., Stępień K., Kamińska T., Siwińska D. Chromosome variations in regenerants of *Arabidopsis thaliana* derived from 2- and 6-week-old callus detected using flow cytometry and FISH analyses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2013;112:263-273. DOI: 10.1007/s11240-012-0232-8

16. Su Y. H., Tang L. P., Zhao X. Y., Zhang X. S. Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. *Int. J. Plant Biol*. 2021;63(1):228-243. DOI: 10.1111/jipb.12972

17. Twaij B.M., Jazar Z.H., Hasan M.N. Trends in the Use of Tissue Culture, Applications and Future Aspects. *Int. J. Plant Biol*. 2020;11(1):8385. DOI: 10.4081/pb.2020.8385

18. Xu C., Hu Y. The molecular regulation of cell pluripotency in plants. *aBIOTECH*. 2020;1:169-177. DOI: 10.1007/s42994-020-00028-9

use of plant cell and tissue culture is an important tool for plant breeding, carried out by developing strategies for the selection of somaclonal variations and stress-resistant genotypes. An important step in the callusogenesis induction and indirect morphogenesis

is the selection of the optimal hormonal composition in the nutrient environment and the type of explant, as well as cultivation conditions for obtaining regenerating plants, which must be carried out empirically individually for each plant species. The aim of our study was to determine the optimal conditions for the callusogenesis induction and the ability to indirect morphogenesis in the *Populus deltoides* Marshall × *Populus alba* L. hybrid *in vitro* conditions. Leaf segments and shoots of plants which has been grown *in vitro* culture were used as primary explants. The induction of callusogenesis was carried out on Murashige and Scoog (MS) nutrient environment supplemented with synthetic auxin 2,4-D or cytokinin tiazuron (TDZ) at five concentrations of 0.5-2.5 mg/l with an interval of 0.5. Active induction and formation of a compact primary callus were achieved at low concentrations (0.5-1 mg/l) TDZ on leaf explants. To stop the growth processes of the callus culture and the formation of morphogenic zones, 20 g/l of polyethylene glycol 6000 was used as a stress factor, followed by the transfer of callus transplants to the MS nutrient environment for indirect regeneration of shoots. The resulting regenerants actively grew and took root after they were separated from the callus and transferred to a fresh nutrient environment. Simple and effective protocol for the *Populus F₁* hybrid regeneration by indirect morphogenesis from callus tissues *in vitro* culture has been developed based on the results of the study.

Keywords: callus, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, tiazuron, *Populus F₁*, indirect morphogenesis.

Funding. The work was carried out within the framework of the state task for the FSC of agroecology RAS No. 122020100427-1 «Develop the scientific foundations for the conservation and reproduction of valuable genotypes of woody and shrubby plants *in vitro*».

Citation. Fomenko N. G., Zholobova O. O. Induction of Callusogenesis and Indirect Morphogenesis in the *Populus deltoides* Marshall × *Populus alba* L. Hybrid *in vitro*. *Scientific Agronomy Journal*. 2024;2(125):76-81. DOI: 10.34736/FNC.2024.125.2.011.76-81

Received: 29.04.2024

Accepted: 11.06.2024

References:

1. Bilous S. Features of indirect morphogenesis of aspen (*Populus tremula* L.) with a green-bark form. 2013;1(73):45-51.
2. Zinnatullina A. E. Structural features of explant cells *in vivo* and the formation of morphogenic calli *in vitro* (review). *Biomika*. 2021;13(1):8-19. (In Russ.) DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-2
3. Kruglova N. N. Organogenesis *in vitro* as the realization of the pluripotency property of morphogenic callus stem cells. *E'kobiotech = Ecobiotech*. 2023;6(2):104-112. DOI:10.31163/2618-964X-2023-6-2-104-112 (In Russ.)
4. Fomenko N. G., Zholobova O. O. Determination of the potential of the VSL-2 clonal rootstock for callusogenesis *in vitro*. X International Conference of Young Scientists: Bioinformatics, Biotechnologists, Biophysicists, Virologists

and Molecular Biologists. 2023. pp. 258-259. (In Russ.) DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-139

5. Fomenko N. G., Zholobova O. O. Assessment of the ability to callus formation of some woody plants *in vitro* culture. *Nauchno-agronomicheskij zhurnal = Scientific Agronomy Journal*. 2023;3(122):75-80. (In Russ.) DOI: 10.34736/FNC.2023.122.3.011.75-80

6. Chepurnoy V. S., Maksimov D. V. Practical agroforestry: Methodological guidelines for the study of ecological and biological features and morphological features of woody species for protective afforestation. Krasnodar. Kuban State Agrarian University, 2016. 98 p. (In Russ.)

7. Ayesh G., Pankaj K., Ajay K. T., Dinesh K. S. *In vitro* plant regeneration studies and their potential applications in *Populus spp.*: a review. *Israel Journal of Plant Sciences*. 2016;63(2):77-84. DOI: 10.1080/07929978.2015.1076982

8. Confalonieri M., Balestrazzi A., Bisoffi S. et al. *In vitro* culture and genetic engineering of *Populus spp.*: synergy for forest tree improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003;72:109-138. DOI: 10.1023/A:1022265504775

9. Erst A. A. Bakulin V. T., Erst A. S., Kuznetsov A. A., Bayahmetov E. Z. *In vitro* propagation of ornamental hybrids of *Populus* L. *Biosci. Biotech. Res. Asia*. 2014;11:69-77. DOI: 10.13005/bbra/1442

10. Feher A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? *Front. Plant Sci*. 2019;10:536. DOI: 10.3389/fpls.2019.00536

11. Heringer A. S., Vale E. M., Barroso T., Santa-Catarina C., & Silveira V. Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN 01 seeds. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. 2013;25:116-124. DOI: 10.1590/S2197-00252013000200004

12. Li H., Wang H., Guan L., Li Z., Wang H., Luo J. Optimization of High-Efficiency Tissue Culture Regeneration Systems in Gray Poplar. *Life*. 2023;13(9):1896. DOI: 10.3390/life13091896

13. Ma C., Goddard A., Peremyslova E. Duan C., Jiang Y., Nagle M., Strauss S. H. Factors affecting *in vitro* regeneration in the model tree *Populus trichocarpa* I. Medium, environment, and hormone controls on organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2022;58(6):837-852. DOI:10.1007/s11627-022-10301-9

14. Maheshwari P., Kovalchuk I. Efficient shoot regeneration from internodal explants of *Populus angustifolia*, *Populus balsamifera* and *Populus deltoids*. *New biotechnology*. 2011;28(6):778-787. DOI: 10.1016/j.nbt.2011.05.005

15. Orzechowska M., Stępień K., Kamińska T. Siwińska D. Chromosome variations in regenerants of *Arabidopsis thaliana* derived from 2- and 6-week-old callus detected using flow cytometry and FISH analyses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2013;112:263-273. DOI: 10.1007/s11240-012-0232-8

16. Su Y.H., Tang L.P., Zhao X.Y., Zhang X.S. Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. *Int. J. Plant Biol*. 2021;63(1):228-243. DOI: 10.1111/jipb.12972

17. Twajj B.M., Jazar Z.H., Hasan M.N. Trends in the Use of Tissue Culture, Applications and Future Aspects. *Int. J. Plant Biol*. 2020;11(1):8385. DOI: 10.4081/pb.2020.8385

18. Xu C., Hu Y. The molecular regulation of cell pluripotency in plants. *aBIOTECH*. 2020;1(3):169-177. DOI: 10.1007/s42994-020-00028-9

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.