DOI 10.21178/2079–6080.2021.2.4
УДК 630.165.43

Получение мутантов высокопродуктивных генотипов тополя сереющего с использованием метода индуцированного мутагенеза в условиях культуры *in vitro*

© Д.А. Шабунин, О.Ю. Бутенко

Obtaining mutants of highly productive genotypes of *Populus* × *canescens* using the method of induced mutagenesis *in vitro*

D.A. Shabunin, O.Yu. Butenko

Despite the fact that the North-West of the Russian Federation is well provided with timber resources, the demand for wood is constantly growing. Poplar is one of the most promising tree species for fast-growing plantations. However, since technologies for creating genetically modified organisms are prohibited in Russia, we used induced mutagenesis to obtain species with increased growth rates. In this work we studied the possibility of mutagenic effects in conditions of callus culture of *Populus* × *canescens* *in vitro*. The object of the study was callus cultures and microshoot cultures maintained *in vitro*. We used such methods of biotechnology, cytogenetics and molecular genetics as growing plants in sterile culture on an artificial nutrient medium (*in vitro*); setting up a polymerase chain reaction (PCR) followed by electrophoresis and detection of its products. The determination of cellulose was carried out by the nitrogen-alcohol method. As a result, a method for obtaining mutants was developed. The composition of phytohormones 1.0 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA provided the formation of callus, which retained morphogenic activity during subsequent passage on a suitable nutrient medium. The addition of BAP at a concentration of 0.4 mg/l to the nutrient medium and sodium nucleinate at a concentration of 1000 mg/l stimulated morphogenesis in callus. Thus, by alternating nutrient media, it is possible to carry out a mutagenic effect in a callus culture and, at the next stage, to obtain microshoots.

An analysis of the stability of the genome of plants subjected to mutagenic induction, carried out by the methods of molecular genetics, revealed changes in the genome. The obtained plants showed a phenotypic manifestation of mutagenic effects, as well as a change in the level of wood lignification. Promising groups of ramets with increased growth rates, with high and low lignin content in wood, and with increased libriform fiber length have been identified.

Keywords: *Populus*, mutagenesis, clon, hybrid, *in vitro*, north-west of the Russian Federation

Получение мутантов высокопродуктивных генотипов тополя сереющего с использованием метода индуцированного мутагенеза в условиях культуры *in vitro*

Д.А. Шабунин, О.Ю. Бутенко

Несмотря на то, что Северо-Запад РФ хорошо обеспечен лесными ресурсами, спрос на древесину постоянно растёт. Одной из наиболее перспективных древесных пород для быстрорастущих плантаций является тополь. Однако, поскольку в России запрещены технологии создания генетически модифицированных организмов, то для получения видов с повышенными темпами роста нами был применен индуцированный мутагенез. В настоящей работе была изучена возможность мутагенного воздействия в условиях каллусной культуры *in vitro* тополя сереющего. Объектом исследования являлись каллусные культуры и культуры микропобегов, поддерживаемые в условиях *in vitro*. Использовались такие методы биотехнологии, цитогенетики и молекулярной генетики, как выращивание растений в стерильной культуре на искусственной питательной среде (*in vitro*); постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим электрофорезом и детекцией ее продуктов. Определение целлюлозы производилось азотно-спиртовым методом. В результате была разработана методика получения мутантов. Композиция фитогормонов 1,0 мг/л TDZ + 0,1 мг/л НУК обеспечивала формирование каллуса, который сохранял морфогенную активность при последующем пассаже на подходящую питательную среду, а добавка БАП в концентрации 0,4 мг/л в питательную среду на фоне нуклеината натрия в концентрации 1000 мг/л стимулировала морфогенез в каллусе. Таким образом, чередуя питательные среды, можно проводить мутагенное воздействие в каллусной культуре и на следующем этапе получать микропобеги. Проведенный методами молекулярной генетики анализ стабильности генома растений, подвергнутых мутагенной индукции, выявил изменения в геноме. У полученных растений зарегистрировано фенотипическое проявление мутагенного воздействия, а также изменение в уровне лигнификации древесины. Выделены перспективные группы рамет с повышенными темпами роста, с высоким и низким содержанием лигнина в древесине, с увеличенной длиной волокон либриформа.

Ключевые слова: *Populus*, мутагенез, клон, гибрид, *in vitro*, Северо-Запад РФ, лигнин

Шабунин Дмитрий Александрович — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. НИО лесной селекции, воспроизводства и химического ухода за лесом

E-mail: ds1512@mail.ru

Бутенко Олеся Юрьевна — канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр. НИО лесной селекции, воспроизводства и химического ухода за лесом

E-mail: din_don@bk.ru

ФБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт лесного хозяйства»

194021, Санкт-Петербург, Институтский пр., 21

Телефон: +7 (812) 552-80-21

Введение

Северо-Запад европейской части РФ является регионом, достаточно обеспеченным лесными ресурсами. Однако спрос на древесину в традиционных отраслях народного хозяйства постоянно растет, особенно в связи с близостью европейских рынков сбыта. Также появляются новые направления, например, биоэнергетика, развитие которой повышает спрос на древесину быстрорастущих высокопродуктивных пород, в частности, тополя [9], который является одним из наиболее перспективных видов для плантационного лесовыращивания. В настоящее время в России он занимает примерно 19,75 млн га с запасом древесины 2 614,81 млн м³. Большая часть посадок сосредоточена в южных малолесных регионах, однако успешная организация быстрорастущих тополёвых плантаций возможна и гораздо севернее.

Наиболее эффективный путь получения растений с заданными свойствами — это технологии создания генетически модифицированных организмов. Тополь является традиционным объектом для таких манипуляций. Например, в Германии, Китае, Англии и России создано много сортов и разновидностей тополей, обладающих сверхвысокими темпами роста. Однако полученные таким образом организмы запрещено выращивать в лесах РФ [7]. При этом известно, что мутации постоянно происходят в природных популяциях, что позволяет использовать способ индуцированного мутагенеза, который активизирует этот процесс. Так, наличие мутаций в естественных клонах осины позволило исследователям найти подходы к оценке их возраста [15]. То есть некоторые из ныне растущих рамет являются мутантами по отношению к исходной форме. И хотя эта технология не является самой перспективной, но в условиях законодательных ограничений — это единственно возможная альтернатива, позволяющая быстро получать новые признаки (свойства) у лесных пород.

Многообещающим направлением исследований является совмещение техники асеп-

тического культивирования растительных тканей и органов на искусственной питательной среде с применением мутагенных веществ. Культивирование растений в условиях *in vitro*, особенно в виде культуры недифференцированных тканей (каллуса), само по себе, без дополнительных мутагенных воздействий, приводит геном растений в достаточно нестабильное состояние, что находит свое выражение в феномене соматической изменчивости. Последняя может быть источником ценных свойств культивируемых растений. Например, с ее помощью были получены: сорт нетемнеющего картофеля *White Baron* и сорт бесшипной ежевики *Lincoln Logan* [16]. Вероятность соматической изменчивости возрастает, если в ходе культивирования растений присутствует стадия каллуса [20, 23]. Так, учеными из симферопольского Института эфиромасличных и лекарственных растений [2] в результате генерации соматических вариантов в культуре каллусных тканей были получены новые формы, выделены перспективные образцы, превышающие исходные сорта по урожайности и сбору эфирного масла на 30–80 %. На сельскохозяйственных растениях индуцированный мутагенез с использованием аксенической культуры уже давно используется и дает значительные результаты в виде новых сортов и форм [14, 18, 19, 26].

Таким образом, применение мутагенных веществ в условиях культуры ткани является перспективным направлением получения растений с новыми свойствами.

Объекты и методы исследования

Для проведения экспериментов использована культуральная линия f.36.1 тополя сереющего *Populus × canescens*, сорт Приярский, поддерживаемая в условиях культуры микропобегов *in vitro* в коллекции ФБУ «СПбНИИЛХ».

Для работы с культурами *in vitro* была использована питательная среда LP [25] с микроэлементами по MS [21] и сахарозой 25 г/л. Она разливалась по 40 мл в конические колбы

объемом 100 мл. Выращивание культур осуществлялось на стеллажах в культуральном помещении ($t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$, освещенность – 1200 лк ФАР, фотопериод – 24 часа).

Получение каллуса из коллекционной культуры микропобегов осуществлялось на питательной среде LP + 1,0 мг/л TDZ + 0,1 мг/л НУК + 100 мг/л мезоинозита + 100 мг/л K_2CO_3 + 25 г/л сахарозы. В качестве эксплантов были использованы сегменты стволиков микропобегов.

Для проведения *мутагенного воздействия* в качестве эксплантов использовались сегменты полученных каллусов, которые были помещены на поверхность питательной среды LP, содержащей 1,0 мг/л TDZ + 0,1 мг/л НУК + 1000 мг/л нуклеината натрия + 100 мг/л мезоинозита + 100 мг/л K_2CO_3 + 25 г/л сахарозы. Через 3 дня в каждую колбу было внесено по 2 мл раствора мутагена – этилметилсульфоната (ЭМС), приготовленного в стерильных условиях и содержащего 24 мг/л ЭМС. Культивация проводилась в культуральном помещении ($t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$, освещенность – 1200 лк ФАР, фотопериод – 24 часа). Затем разросшиеся экспланты были пересажены на питательную среду LP + 0,4 мг/л БАП + 1000 мг/л нуклеината натрия + 100 мг/л мезоинозита + 100 мг/л K_2CO_3 + 25 г/л сахарозы, стимулирующей развитие микропобегов, которые были получены в большом количестве после нескольких пассажей.

Укоренение микропобегов выполнялось на безгормональной питательной среде LP + 100 мг/л мезоинозита + 100 мг/л K_2CO_3 + 25 г/л сахарозы.

Адаптация к условиям *ex vitro* проходила в микропарнике, после чего 150 регенерантов были высажены в пластиковых контейнерах (объем – 2 л) с торфяным субстратом в теплицу летнего типа с поликарбонатным покрытием (рис. 1), где они выращивались на протяжении вегетационного сезона.

Саженьцы были использованы для определения биометрических показателей, содержания лигнина в древесине и длины древесного волокна (либриформа).

Рис. 1. Посадки регенерантов тополя сереющего (сорт Приярский) в условиях теплицы

Среди растений, полученных из биологического материала тополя сереющего (сорт Приярский), подвергнутого мутагенному воздействию, была выявлена одна ракета с явным фенотипическим проявлением мутагенного воздействия: на листовых пластинках появилась мозаичность окраски (рис. 2). На этом примере видно, что могут получаться химерные организмы. Впоследствии такая окраска исчезла – произошло расхимеривание.

Рис. 2. Листовые пластинки ракеты с мозаичной окраской

Количество лигнина в древесине выращенных саженцев оценивалось по разнице массы древесины и массы, содержащейся в ней целлюлозы. Определение целлюлозы производилось азотно-спиртовым методом [13]. Применяемая смесь состояла из 1 объема концентрированной азотной кислоты (плотностью 1,4 г/см³) и 4 объемов 95 % этанола.

Тонко расщепленные (менее 0,5 мм) сегменты стволиков тополя помещались в 2-миллилитровые предварительно взвешенные полипропиленовые пробирки с крышкой, высушивались до абсолютно сухого веса в лиофильной сушилке и взвешивались вместе с пробиркой. По разности определялась абсолютно сухая масса образцов. Затем они заливались азотно-спиртовой смесью и выдерживались в твердотельном термостате (термошейкере) с постоянным помешиванием (260 об/мин) в течение 2 часов при температуре 52 °С; процедура повторялась троекратно. В конце каждого этапа пробирки центрифугировались в течение 5 минут при скорости 10000 об/мин для осаждения отделившихся фрагментов, и осторожно, не каса-

ясь осадка и сегментов древесины, жидкость удалялась пипеткой и заливалась свежая порция азотно-спиртовой смеси. Затем материал промывали 95 % этиловым спиртом и высушивали в лиофильной сушилке до абсолютно-сухого состояния. Пробирки взвешивались, освобождались от содержимого и снова взвешивались. По разнице с первоначальной массой образца оценивалось количество лигнина.

В ходе предварительных испытаний описанной выше методики получения целлюлозы процесс делигнификации контролировался путем постановки качественной цветной химической реакции с флороглюцином, который окрашивает образцы с лигнином в малиновый цвет (рис. 3). Мониторинг показал, что трех циклов обработки азотно-спиртовой смесью в течение 6 часов при температуре 52 °С достаточно для полного удаления лигнина.

Для изучения вариации длины древесных волокон в ксилеме мутантных растений применялась следующая методика дезинтеграции клеток ксилемы.

Рис. 3. Результат качественной цветной химической реакции с флороглюцином (а — образец древесины без обработки; б и в — после обработки азотно-спиртовой смесью в течение двух и шести часов, соответственно)

Со стволиков скальпелем удалялась кора. Затем они фрагментировались на отрезки длиной примерно 3–4 мм и не более 1 мм в торцевом сечении. Два отрезка или сегмента помещались в 1,5-миллилитровую полипропиленовую пробирку Эппендорфа, заливались 1 мл 65 % раствора азотной кислоты и закрывались. Далее они помещались в штатив и оставлялись на 2 суток при комнатной температуре (20 °C) в вытяжном шкафу. Затем центрифугировались 3 минуты при скорости 14000 об/мин. Надосадочная жидкость сливалась или удалялась методом пипетирования. К получившемуся осадку добавляли 300 мкл водного раствора 50 % глицерина и 3 % гидроксида натрия. Осадок ресуспендировался на встряхивающем устройстве. Полученная суспензия клеток в растворе глицерина наносилась на предметное стекло, накрывалась покровным и изучалась под микроскопом при 100-кратном увеличении в проходящем свете (рис. 4). Измерение длины волокон производилось с помощью окуляр-микрометра.

Рис. 4. Дезинтегрированные клетки ксилемы древесины

Для исследования растений, полученных из материала, подвергнутого мутагенному воздействию, изготавливались препараты ДНК с которыми проводились полимераз-

ные цепные реакции (ПЦР) с использованием ISSR-праймеров. Продукты ПЦР проходили электрофоретическую диффузию в агарозном геле, после чего изучалось распределение этих продуктов.

Для начала с верхушки растений были собраны молодые растущие листья, которые поместили в бумажные пакеты и высушили в лиофильной сушилке FreeZone Labconco. Хранение осуществлялось в комнатных условиях.

Для экстракции ДНК листья измельчали в гомогенизаторе Precellys 24 в следующем режиме: 5 секунд при скорости 5000 об/мин с предварительной подсушкой в лиофильной сушилке FreeZone Labconco в пластиковых 2-миллилитровых пробирках с винтовой крышкой. После гомогенизации в пробирки добавляли по 700 мкл буфера, их закрывали и тщательно встряхивали для перемешивания содержимого. Затем проводилась экстракция в течение 2 часов при 65 °C в термошейкере при постоянном перемешивании. После чего в охлажденные до комнатной температуры пробирки добавляли по 700 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта (в соотношении 24:1). И снова их интенсивно встряхивали. Затем проводилось центрифугирование в течение 10 минут при 14000 об/мин, и верхняя фракция переносилась в чистую 1,5-миллилитровую пробирку Эппендорфа, куда добавляли холодный изопропанол из расчета 70 % от содержимого пробирки. Далее проводилось центрифугирование в течение 10 минут при 14000 об/мин для precipitation осадка. Надосадочная жидкость сливалась. Осадок промывали 70 % этиловым спиртом и высушивали при комнатной температуре в течение суток. Растворение осадка производилось в 50 мкл ультрачистой воды. Полученные препараты ДНК хранились в морозильной камере при –20 °C.

ПЦР проводилась в 0,2 мл полипропиленовых пробирках в амплификаторе T100 фирмы Bio-Rad. В состав реакционной смеси для проведения ПЦР входили следующие ингредиенты: готовая смесь для ПЦР ScreenMix фирмы Евроген, вода и раствор праймера.

Объем реакционной смеси составлял 15 мкл. Проведение ПЦР осуществлялось по следующей программе: начальная денатурация 3 минуты при 95 °С, затем 35 циклов «денатурация

30 секунд при 95 °С, отжиг 30 секунд при специфической температуре для каждого праймера, удлинение 2 минуты при 72 °С» (табл.) и финальное удлинение 5 минут при 72 °С.

Таблица

Последовательности праймеров, использованных для проведения ПЦР

Название праймера	Последовательность праймеров (5'–3')	Температура отжига, °С
M13C	(AGC) ₄ C	54
M11G	(CA) ₆ G	52
M14	(GACA) ₄	54
M2	(AC)8YG	57

Примечание. Y = C или T

Электрофорез осуществлялся в 1 % агарозном геле при напряжении 90 В в течение 2 часов. Для окраски фрагментов ДНК использовали краситель этидий бромид в виде 1 % раствора, который добавляли в расплавленный гель из расчета 1,7 мкл раствора красителя на 100 мл геля. Для наблюдения и документирования распределения продуктов ПЦР в геле использовалась система гель-документирования Gel Doc фирмы Bio-Rad Laboratories.

Результаты и их обсуждение

Средняя высота саженцев, подвергнутых мутагенному воздействию, составила

84,9±2,0 см, средний диаметр – 6,4±0,1 мм. Эти показатели роста взаимосвязанно возрастают и убывают в изученной совокупности (рис. 5). Значимых отклонений не наблюдалось.

Ростовые параметры являются интегральными показателями, отражая суммарный эффект воздействия генетических факторов и факторов внешней среды. Ввиду этого на данном этапе исследования точно определить особи с генетически обусловленными повышенными темпами роста маловероятно. Для дальнейших наблюдений мы отобрали группу из 21 раметы, рост которых по высоте превышал 120 см.

Рис. 5. Биометрические показатели саженцев тополя Приярского, выращенных в условиях закрытого грунта

Определение количества лигнина показало, что в исследованных образцах его содержалось от 10,6 до 31,3 %. Полученные данные (рис. 6) в основном находятся в диапазоне обычных значений, приводимых в литературе

для уровня лигнификации древесины осины — 19–23 % [3, 10–12]. При этом наблюдается небольшая группа особей с повышенным содержанием и большая группа с низким и очень низким его количеством.

Рис. 6. Распределение рамет по уровню содержания лигнина

Как было сказано выше, используемый нами показатель — это неточная, несколько завышенная оценка содержания лигнина. Поэтому группа рамет (16 шт.) с высоким его содержанием (более 25 %) имеет относительную ценность, но представляет интерес для дальнейших исследований. Также замечено, что некоторые из выделенных выше экземпляров (4 шт.) имеют и повышенные темпы роста.

Особый интерес привлекает к себе группа рамет (20 шт.) с пониженным содержанием лигнина (10,5–14,0 %), поскольку такая древесина является ценным сырьем для получения целлюлозы. Поскольку снижение содержания лигнина было очень значительным: в некоторых образцах по завышенной оценке этот показатель составлял 10–12 %, в то время как по литературным данным уровень лигнификации древесины взрослых деревьев осины составляет 19–23 % [3, 10–12], то в ряде вариантов с наиболее низкими значениями содержания лигнина анализы были проведены повторно. В итоге, в большинстве случаев были получены более высокие показатели (на

2–6 %), а в некоторых — не изменились и оставались на очень низком уровне.

Оценивая проявившиеся различия, следует учитывать, что для повторного анализа были взяты другие части побега. Одним из вариантов объяснения полученных результатов сверхнизкого содержания лигнина может быть предположение, что во время срезки растения продолжали вегетацию, и лигнификация клеточных стенок была не завершена.

Существует немалый интерес к длине волокна либриформа, который представляет собой длинные клетки с заостренными концами, толстыми оболочками и узкими полостями и является главной частью древесины тополей. Содержание либриформа в общем объеме древесины составляет: по данным С.И. Ванина [1] — 60 %, болгарских исследователей [17] — 59 %, а Л.М. Перелыгина [6] — 55 %; в отдельных случаях достигает до 79 % [8, 24]. Длина либриформа взрослых деревьев осин по одним литературным источникам находится в пределах 0,546–0,719 мм [8, 24], по другим — 0,8–1,7 мм [4, 5].

Средние значения длины клеток либриформа у изученных нами образцов находились в диапазоне 0,371–0,582 мм. Размеры отдельных волокон составляли 0,286–1,037 мм.

Полученные значения длины волокна у мутантных растений находятся ниже значений, приводимых другими исследователями [8, 24], что можно объяснить тем, что нами анализировалась древесина однолетних побегов молодых растений. Известно, что длина либриформа с возрастом увеличивается и достигает максимума в 40 лет.

Анализируя наши данные, следует учитывать, что длина волокна однолетних саженцев одной линии (например, ранее была изучена линия f.4 из коллекции СПбНИИЛХ) может значительно отличаться, что не позволяет достоверно судить о различиях по этому показателю между ракетами, полученными из биологического материала, подвергнутого мутагенному воздействию. Тем не менее, установлено, что генетическая обусловленность длины либриформа с возрастом падает [8, 24], поэтому сравнение в молодом возрасте имеет достаточную ценность, а группа ракет с его наибольшей длиной (более 0,5 мм) заслуживает дальнейшего изучения в опытных лесных культурах.

Детектирование мутаций производилось путем сравнения картины распределения ампликонов ПЦР на электрофореграммах. Изменения распределения ампликонов (отсутствие определенных длин, или появление дополнительных полосок, или смещение полосок на дорожке распределения) фиксировались как мутации. Пример такого анализа можно проследить на рисунке 7.

Детектирование мутаций производилось путем сравнения картины распределения ампликонов ПЦР на электрофореграммах. Изменения распределения ампликонов (отсутствие определенных длин, или появление дополнительных полосок, или смещение полосок на дорожке распределения) фиксировались как мутации. Пример такого анализа можно проследить на рисунке 7.

Рис. 7. Электрофореграммы распределения продуктов ПЦР с разными праймерами

Явные изменения видны на дорожках проб 110 и 117 при использовании праймера М14 и на дорожке пробы 110 — с праймерами М2 и М11G. Во всех отмеченных случаях появились дополнительные ампликоны при сохранении всех других ампликонов, характерных для электрофореграфического спектра изучаемого клона, что может свидетельствовать о химерном характере рамет, полученных в результате мутагенного воздействия.

Всего детектировано 10 мутаций. 3 мутации выявлено в реакциях с праймером М2, 2 мутации — с праймером М11G и 5 мутаций — с праймером М14. Наибольшее количество мутаций обнаружено у раметы Мt.110. При постановке ПЦР со всеми тремя праймерами у этой раметы во всех случаях детектированы мутации.

Размер генома исследованного тополя Приярского неизвестен, но приблизительный размер генома осины, которая является одной из составляющих этого гибридного тополя, составляет 500×10^6 пар нуклеотидов [22, 27]. В исследованных с помощью ПЦР с одним праймером локусах содержится приблизительно 3×10^3 пар нуклеотидов. Таким образом, тремя праймерами нами исследовано приблизительно 0,018 % генома. При этом следует учитывать, что в этой обследованной части гено-

ма примененным нами методом выявлялись не все мутации, а только достаточно большие делеции и инсерции в основной части ампликона и все остальные мутации, происходящие в местах взаимодействия с праймером. В обследованной таким образом части генома обнаружено 2,1 % мутаций (в расчете на общее число проведенных анализов). Выявлено 8 мутантных особей, что составляет 5,0 % от общего числа обследованных особей.

Таким образом, при обследовании 0,018 % генома выявило 2,1 % мутантных особей. С большой долей вероятности можно полагать, что и в неисследованной части генома также присутствуют мутации, то есть все растения, подвергнутые мутагенному воздействию в наших опытах, являются мутантами.

Как свидетельствуют результаты исследования, с помощью предложенной процедуры можно достаточно эффективно получать генетические мутации тополей в условиях культуры *in vitro*.

Настоящая публикация подготовлена по результатам проведенных исследований в рамках исполнения государственного задания, установленного ФБУ «СПбНИИЛХ» Федеральным агентством лесного хозяйства согласно приказу № 1061 от 25.12.2018.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ванин, С.И. Древесиноведение / С.И. Ванин. — М.-Л.: Гослесбумиздат, 1949. — 472 с.
2. Егорова, Н.А. Морфогенез и получение соматоклональных вариантов в каллусных культурах у эфиромасличных растений / Н.А. Егорова, И.В. Ставцева // IX Международная конференция «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». Тезисы, Звенигород, 8–12 сентября 2008 г. / ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. — М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. — С. 120.
3. Кузнецова, С.А. Состав и превращения основных компонентов автогидролизованной древесины сосны, ели и осины / С.А. Кузнецова, Н.Б. Александрова, Б.Н. Кузнецов // Химия в интересах устойчивого развития. — 2001. — № 9. — С. 655–665.
4. Машкина, О.С. Полевые испытания размноженных *in vitro* клонов осины (*Populus tremula* L.): рост, продуктивность, качество древесины, генетическая стабильность / О.С. Машкина, Е.А. Шабанова, И.Н. Вариводина, Т.А. Гродецкая // ИВУЗ «Лесной журнал». — 2019. — № 6. — С. 25–38.
5. Никитин, Н.И. Химия древесины и целлюлозы / Н.И. Никитин. — М.-Л.: Академия наук СССР, 1962. — 711 с.
6. Перелыгин, Л.М. Строение древесины / Л.М. Перелыгин. — М.: Академия наук СССР, 1960. — 240 с.

7. Российская Федерация. Законы. Об охране окружающей среды: федер. закон от 10.01.2002 № 7-ФЗ: измен. и доп. 18.04.2006: (принят ГД ФС РФ 20.12.2001) // КонсультантПлюс: офиц. сайт / Компания «КонсультантПлюс». – Электрон. справ. правовая система. – URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_34823/ (дата обращения: 25.09.2020)
8. Смилга, Я.Я. Изменчивость анатомических элементов древесины осины / Я.Я. Смилга // Генетические исследования древесных в Латвийской ССР. – Рига: Зинатне, 1975. – С. 68–79.
9. Соколов, Д.Л. Использование лесных ресурсов на Северо-Западе / Д.Л. Соколов // Портал лесопромышленника. – Электрон. дан. – 23.06.2005. – URL: <http://www.drevesina.com/materials.htm/a5/b236/> (дата обращения: 20.10.2020)
10. Судакова, И.Г. Оптимизация процесса делигнификации древесины осины пероксидом водорода в присутствии сернокислотного катализатора / И.Г. Судакова, Н.В. Гарынцева, О.В. Яценкова, Б.Н. Кузнецов // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2013 – Т. 1 (6). – С. 76–84.
11. Судакова, И.Г. Состав и связующие свойства лигнинов, полученных окислительной делигнификацией древесины пихты, осины и березы в среде уксусной кислоты / И.Г. Судакова, Б.Н. Кузнецов, Н.В. Гарынцева, И.В. Королькова // Химия растительного сырья. – 2010. – № 3. – С. 55–60.
12. Фаустова, Н.М. Химический состав коры и древесины осины *Populus tremula* L.: автореф. дис. ... канд. хим. наук / Наталья Михайловна Фаустова. – СПб., 2005. – 20 с.
13. Химия древесины и физико-химические анализы целлюлозы: методические указания к лабораторным работам по дисциплинам «Химия древесины» и «Физика и химия природных полимеров» для студентов, обучающихся по направлению подготовки 18.03.02 «Энерго- и ресурсосберегающие процессы в химической технологии, нефтехимии и биотехнологии» / сост. Э.И. Евстигнеев. – СПб.: СПбГЛТУ, 2016. – 40 с.
14. Fang, J.-Y. *In vitro* mutation induction of Saintpaulia using ethyl methanesulfonate / Jong-Yi Fang, Siguina Traore // Hort Science. – 2011. – Vol. 46, no. 7. – P. 981–984.
15. Heinze, B. Somatic mutations as a useful tool for studying clonal dynamics in trees / B. Heinze, B. Fussi // Molecular Ecology. – 2008. – Vol. 17. – P. 4779–4781.
16. Jain, S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement / S.M. Jain // Euphytica. – 2001. – Vol. 118. – P. 153–166.
17. Калинков, В. Изучения върху анатомичния строеж на дървесината при някои клонове на треперлика-та (*Populus tremula* L.) в НР България // В. Калинков, И. Добринов // Науч. тр. Висш. лесотехн. ин-т. – 1964. – Т. 12. – С. 41–56.
18. Kumar, B. *In vitro* mutation induction and selection of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzelev) lines with improved resistance to *Septoria obesa* Syd. / B. Kumar, S. Kumar, M. Thakur // International Journal of Plant Research. – 2012. – Vol. 2(4). – P. 103–107.
19. Maluszynski, M. Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement / Miroslaw Maluszynski, Beant S. Ahloowalia, Björn Sigurbjörnsson // Euphytica. – 1995. – Vol. 85. – P. 303–315.
20. 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 and Developmental Biology*. – Plant, 2006. – Vol. 42. – P. 83–88.
21. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog. – DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x // *Physiologia plantarum*. – 1962. – Vol. 15, Iss. 3. – P. 473–497. – ISSN 1399-3054.
22. Neale, D.B. Open access to tree genomes: the path to a better forest / D.B. Neale, Ch.H. Langley, S.L. Salzberg, J.L. Wegrzyn // *Genome Biology*. – 2013. – Vol. 14 (6). – P. 120.

23. Nehra, N.S. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry / N.S. Nehra, K.K. Kartha, C. Stushnott, K.L. Giles // *Plant Cell Tissue Organ Culture*. – 1992. – Vol. 29. – P. 257–268.
24. Smilga, J. Apses koksnes šķiedru garums / J. Smilga. – Jaun. Mežsaimn. – 1976, 19 laid. – lpp. 22–27.
25. Quoirin, M. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp. / M. Quoirin, P. Lepoivre. – DOI 10.17660/ActaHortic.1977.78.54 // Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes / *Acta Horticulturae*, N 78. – 1977. – Vol. 1. – P. 437–442. – ISSN 2406-6168.
26. Velmurugan, M. *In vitro* mutation in horticultural crops – a review / M. Velmurugan, K. Rajamani, P. Paramaguru, R. Gnanam, J.R. Kannan Bapu, C. Harisudan, P. Hemalatha // *Agricultural Review*. – 2010. – Vol. 31 (1). – P. 63–67.
27. Wulschleger, S.D. Genomics and Forest Biology: *Populus* Emerges as the Perennial Favorite / S.D. Wulschleger, S. Jansson and G. Taylor // *The Plant Cell*. – 2002. – Vol. 14 (11). – P. 2651–2655.

REFERENCES

1. Vanin S.I. Drevesinovedenie. Moscow-Leningrad. 1949, 472 p. (In Russian)
2. Egorova N.A., Stavtseva I.V. Morfogenez i poluchenie somaklonal'nykh variantov v kallusnykh kul'turakh u ehfiromaslichnykh rastenij. IX Mezhdunarodnaya konferentsiya «*Biologiya kletok rastenij in vitro i biotekhnologiya*». Abstracts of Papers, Zvenigorod. Moscow, 2008. p. 120. (In Russian)
3. Kuznetsova S.A., Aleksandrova N.B., Kuznetsov B.N. Sostav i prevrashheniya osnovnykh komponentov avtogidrolizovannoy drevesiny sosny, eli i osiny. *Khimiya v interesakh ustojchivogo razvitiya*. 2001, no. 9, pp. 655–665. (In Russian)
4. Mashkina O.S., Shabanova E.A., Varivodina I.N., Grodetzkaya T.A. Polevye ispytaniya razmnozhenykh *in vitro* klonov osiny (*Populus tremula* L.): rost, produktivnost', kachestvo drevesiny, geneticheskaya stabil'nost'. *Lesnoj zhurnal*, 2019, no. 6, pp. 25–38. (In Russian)
5. Nikitin N.I. Khimiya drevesiny i tsellyulozy. Moscow-Leningrad, 1962, 711 p. (In Russian)
6. Pereygin L.M. Stroenie drevesiny. Moscow, 1960. – 240 p. (In Russian)
7. Rossijskaya Federatsiya. Zakony. Ob okhrane okruzhayushhej sredy: feder. zakon ot 10.01.2002 № 7-FZ, izmen. i dop. 18.04.2006. Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_34823/
8. Smilga, Ya.Ya. Izmenchivost' anatomicheskikh ehlementov drevesiny osiny. *Geneticheskie issledovaniya drevesnykh v Latvijas SSR*. Riga, 1975, pp. 68–79. (In Russian)
9. Sokolov D.L. Ispol'zovanie lesnykh resursov na Severo-Zapade. Available at: <http://www.drevesina.com/materials.htm/a5/b236/>
10. Sudakova I.G., Garyntseva N.V., Yatsenkova O.V., Kuznetsov B.N. Optimizatsiya protsessa delignifikatsii drevesiny osiny peroksidom vodoroda v prisutstvii sernokislotojnogo katalizatora. *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Khimiya*. 2013, vol. 1 (6), pp. 76–84. (In Russian)
11. Sudakova I.G., Kuznetsov B.N., Garyntseva N.V., Korol'kova I.V. Sostav i svyazuyushhie svoystva ligninov, poluchennykh okislitel'noj delignifikatsiej drevesiny pikhty, osiny i berezy v srede uksusnoj kisloty. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2010, no. 3, pp. 55–60. (In Russian)
12. Faustova N.M. Khimicheskij sostav kory i drevesiny osiny *Populus tremula* L. Extended abstract of candidate's thesis. Sankt-Peterburg. 2005, 20 p. (In Russian)
13. Khimiya drevesiny i fiziko-khimicheskie analizy tsellyulozy: metodicheskie ukazaniya k laboratornym rabotam po distsiplinam «Khimiya drevesiny» i «Fizika i khimiya prirodnykh polimerov» dlya studentov, obuchayushhikhsya po napravleniyu podgotovki 18.03.02 «Ehnergo-i resursosberegayushhie protsessy v

- khimicheskoy tekhnologii, neftekhimii i biotekhnologii». Sost. Eh.I. Evstigneev. Sankt-Peterburg, 2016, 40 p. (In Russian)
14. Fang J.-Y., Traore Siguina *In vitro* mutation induction of Saintpaulia using ethyl methanesulfonate. *Hort Science*, 2011, vol. 46, no. 7, pp. 981–984.
  15. Heinze B., Fussi B. Somatic mutations as a useful tool for studying clonal dynamics in trees. *Molecular Ecology*, 2008, vol. 17, pp. 4779–4781.
  16. Jain S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 2001, vol. 118, pp. 153–166.
  17. Калинков В., Добринов И. Изучения върху анатомичния строеж на дървесината при някои клонове на треперликата (*Populus tremula* L.) в НР България. *Науч. тр. Вуси. лесотехн. ин-т*, 1964, т. 12, с. 41–56. (In Bulgarian)
  18. Kumar B., Kumar S., Thakur M. *In vitro* mutation induction and selection of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzelev) lines with improved resistance to *Septoria obesa* Syd. *International Journal of Plant Research*, 2012, vol. 2 (4), pp. 103–107.
  19. Maluszynski M., Ahloowalia Beant S., Sigurbjörnsson Björn. Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. *Euphytica*, 1995, vol. 85, pp. 303–315.
  20. 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 and Developmental Biology, Plant.*, 2006. vol. 42. pp. 83–88.
  21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 1962, vol. 15, iss. 3, pp. 473–497.
  22. Neale D.B., Langley Ch.H., Salzberg S.L., Wegrzyn J.L. Open access to tree genomes: the path to a better forest. *Genome Biology*, 2013, vol. 14 (6), p. 120.
  23. Nehra N.S., Kartha K.K., Stushnott C., Giles K.L. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1992, vol. 29, pp. 257–268.
  24. Smilga J. Apses koksnes šķiedru garums. *Jaun. Mežsaimn.* 1976, 19 laid., lpp. 22–27. (In Latvian)
  25. Quoirin M., Lepoivre P. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp. *Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes. Acta Horticulturae*, N 78, 1977, vol. 1, pp. 437–442.
  26. Velmurugan M., Rajamani K., Paramaguru P., Gnanam R., Kannan Babu J.R., Harisudan C., Hemalatha P. *In vitro* mutation in horticultural crops – a review. *Agricultural Review*, 2010, vol. 31 (1), pp. 63–67.
  27. Wulschleger S.D., Jansson S., Taylor G. Genomics and Forest Biology: *Populus* Emerges as the Perennial Favorite. *The Plant Cell*. 2002, vol. 14(11), pp. 2651–2655.

Статья поступила в редакцию 27.04.2021