

УДК 635:631.532:58.084.1

UDC 635:631.532:58.084.1

DOI 10.30679/2219-5335-2021-5-71-96-115

DOI 10.30679/2219-5335-2021-5-71-96-115

**КЛЮЧЕВЫЕ ВОПРОСЫ  
БИОТЕХНОЛОГИИ  
В РАЗМНОЖЕНИИ  
И ОЗДОРОВЛЕНИИ  
САДОВЫХ КУЛЬТУР**

**KEY ISSUES  
OF BIOTECHNOLOGY  
IN REPRODUCTION  
AND IMPROVEMENT  
OF HORTICULTURAL CROPS**

Супрун Иван Иванович  
канд. биол. наук  
зав. ФНЦ «Селекции  
и питомниководства»

Suprun Ivan Ivanovich  
Cand. Biol. Sci.  
Head of Breeding  
and Nursery FSC

Винтер Марина Александровна  
канд. с.-х. наук  
зав. лабораторией вирусологии

Vinter Marina Aleksandrovna  
Cand. Agr. Sci.  
Head of Virology Laboratory

Лободина Елена Вадимовна  
мл. научный сотрудник  
селекционно-биотехнологической  
лаборатории

Lobodina Elena Vadimovna  
Junior Research Associate  
of Breeding and Biotechnology  
Laboratory

Аль-Накиб Екатерина Аделевна  
мл. научный сотрудник  
селекционно-биотехнологической  
лаборатории

Al-Nakib Ekaterina Adelevna  
Junior Research Associate  
of Breeding and Biotechnology  
Laboratory

Авакимян Анастасия Олеговна  
мл. научный сотрудник  
селекционно-биотехнологической  
лаборатории

Avakimyan Anastasia Olegovna  
Junior Research Associate  
of Breeding and Biotechnology  
Laboratory

Федорович Святослав Валерьевич  
мл. научный сотрудник  
лаборатории вирусологии

Fedorovich Svyatoslav Valer'evich  
Junior Research Associate  
of Laboratory of Virology

*Федеральное государственное  
бюджетное научное учреждение  
«Северо-Кавказский федеральный  
научный центр садоводства,  
виноградарства, виноделия»,  
Краснодар, Россия*

*Federal State Budget  
Scientific Institution  
«North Caucasian Federal  
Scientific Center of Horticulture,  
Viticulture, Wine-making»,  
Krasnodar, Russia*

Вопрос получения посадочного материала плодовых культур, свободного от патогенов, включая вирусы и фитоплазмы обладает высоким уровнем актуальности в настоящее время. Использование современных методов

The issue of obtaining planting material for fruit crops, free from pathogens, including viruses and phytoplasma, is of high relevance at the present time. The use of modern methods

биотехнологии и молекулярной генетики является важным элементом при производстве оздоровленного посадочного материала так как позволяет не только получать растения в культуре меристем *in vitro* и производить их ускоренное микроклонирование, но также позволяет контролировать наличие вирусных и фитоплазменных патогенов, идентификация которых по внешним симптомам может быть затруднительной в связи с наличием латентной формы заболеваний. В статье приведены результаты выполнения комплексных исследований по микроклональному размножению различных культур плодовых культур, а также приводится анализ современной научной литературы по данной тематике. Кроме того, приведены результаты молекулярно-генетических исследований в части анализа генетической стабильности растений, получаемых в условиях *in vitro* и идентификацию вирусов. Отмечено, что на всех этапах микроклонального размножения, в том числе с использованием культуры меристем, зачастую необходима разработка сортоспецифичных протоколов. Разработаны оптимальные протоколы стерилизации эксплантов семечковых и косточковых культур с использованием дезинфицирующих таблеток «ОКА-ТАБ» и антимикробного препарата «БИО-ПАК». Выявлена зависимость интенсивности выделения фенольных соединений эксплантами и их дальнейшей некротизации при введении в культуру *in vitro* от фаз развития, возраста растений доноров. Установлены оптимальные концентрации компонентов питательных сред, а также фитогормонов для ряда сортов и подвоев семечковых и косточковых культур отечественной селекции. В части анализа генетической стабильности растений, получаемых в условиях *in vitro* выявлены ISSR и IRAP ДНК-маркеры, перспективные для использования в этих целях на подвоях яблони (ISSR: UBC 811, UBC 841 и UBC 843; IRAP: Cass 1 и Cass 2). При анализе генетической стабильности подвоев крупнокосточковых культур

of biotechnology and molecular genetics is an important element in the production of improved planting material, since it allows not only to obtain plants in the culture of meristems *in vitro* and to produce their microclonal propagation, but also allows control the presence of viral and phytoplasmic pathogens, the identification of which by external symptoms can be difficult due to the presence of a latent form of disease. The article presents the results of the implementation of complex studies on microclonal reproduction of various crops of fruit crops, as well as an analysis of modern scientific literature on this topic. In addition, the results of molecular genetic studies in the part of the analysis of the genetic stability of plants obtained *in vitro* and the identification of viruses are presented. It was noted that at all stages of micropropagation, including the use of a culture of meristems, it is often necessary to develop variety-specific protocols. Optimal protocols for sterilization of explants of pome and stone fruit cultures using disinfecting tablets "OKA-TAB" and antimicrobial preparation «BIO-PAK» have been developed. The dependence of the intensity of the release of phenolic compounds by explants and their further necrotization upon introduction into culture *in vitro* on the phases of development and the age of donor plants was revealed. The optimal concentrations of nutrient media components, as well as phytohormones, have been established for a number of varieties and rootstocks of pome and stone fruit crops of domestic breeding. As part of the analysis of the genetic stability of plants obtained under *in vitro* conditions, ISSR and IRAP DNA markers have been identified that are promising for use for these purposes on apple stocks (ISSR: UBC 811, UBC 841 and UBC 843; IRAP: Cass 1 and Cass 2).

с использованием ISSR ДНК-маркеров была выявлена идентичность ДНК-профилей, что свидетельствует в пользу сохранения генетической стабильности для данного подвоя при использовании разработанных протоколов микроклонирования. На основе использования комплекса биотехнологических и молекулярногенетических методов были получены генетически однородные подвои косточковых культур, свободные от вируса Шарки сливы. Данные растения, после тестирования на другие вирусы косточковых культур и при отсутствии таковых будут переведены в категорию «кандидаты в исходные» и, после повторного ретестирования, могут быть переведены в категорию «исходные растения» и послужить основой для дальнейшего массового получения безвирусных подвоев.

*Ключевые слова:* САДОВЫЕ КУЛЬТУРЫ, КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ, СТЕРИЛИЗАЦИЯ, ДИАГНОСТИКА, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ

When analyzing the genetic stability of the rootstocks of large-stone cultures using ISSR DNA markers, the identity of the DNA profiles was revealed, which testifies to the preservation of genetic stability for this rootstock using the developed micropropagation protocols. Based on the use of a complex of biotechnological and molecular genetic methods, genetically homogeneous rootstocks of stone fruit cultures, free from the virus pox disease of plum, were obtained. These plants, after testing for other viruses of stone crops and in the absence of such, will be transferred to the category of «candidates for initial» and, after retesting, can be transferred to the category of «initial plants» and serve as a basis for further mass production of virus-free rootstocks.

*Key words:* HORTICULTURAL CROPS, CLONAL MICROPROPAGATION, DESINFECTATION, DIAGNOSTICS, GENETIC STABILITY

**Введение.** Приоритетным направлением развития питомниководства в настоящее время является производство здорового посадочного материала. Согласно действующим нормативным документам на посадочный материал плодовых культур, в нем не допускается наличие широкого перечня вирусов и фитоплазм.

Система производства оздоровленного посадочного материала невозможна без применения современных методов биотехнологии и молекулярной генетики. В частности, применение метода клонального микроразмножения растений позволяет получить за короткое время большое количество здорового, однотипного материала.

В процессе производства оздоровленного посадочного материала с использованием одного из современных методов вегетативного размножения растений – клональное микроразмножение, необходимо решать некоторые вопросы, такие как:

– видо- и сортоспецифические реакции растений на компоненты питательных сред, условия культивирования, особенности подготовки эксплантов и т.д.;

– идентификация вирусных и фитоплазменных патогенов, разработка и усовершенствование методов их диагностики;

– контроль генетической стабильности и элиминация соматклонов с использованием оценки фенотипических признаков растений и методов ДНК-маркирования, связанная с этим необходимость поиска эффективных ДНК-маркеров.

В данной работе представлены результаты в области получения оздоровленного посадочного материала с использованием методов биотехнологии и анализ современных направлений исследований, состояние изученности вопросов в области клонального микроразмножения с учетом видо- и сортоспецифичности садовых культур; диагностики вирусных и фитоплазменных патогенов; генетической стабильности растений.

**Объекты и методы исследований.** Объектами исследований были подвои яблони: М9, СК 2, СК 7, ММ 106 и сорта яблони Кубанское багряное, Прикубанское, подвои косточковых культур ПК СК 1, ПК СК 2, АИ 1, Gisela 5. Исследования в части клонального микроразмножения растений проводились в лаборатории вирусологии и селекционно-биотехнологической лаборатории ФГБНУ СКФНЦСВВ по общепринятым методикам [1].

С целью изучения ключевых вопросов микроклонального размножения, диагностики растений на наличие вирусов, фитоплазм и генетической стабильности растений проанализированы научные публикации зарубежных и отечественных ученых.

**Обсуждение результатов.** Анализ результатов научных исследований отечественных и иностранных ученых показывает, что проблемы в

ключевых вопросах биотехнологии одни и те же. При использовании метода клонального микроразмножения растений можно выделить несколько проблемных направлений:

- введение эксплантов в культуру *in vitro* (возраст растения-донора эксплантов, фаза развития растения, орган изоляции, период отбора, стерилизаторы и режимы стерилизации, размер меристем);

- подбор оптимального минерального и гормонального состава среды для каждого этапа размножения с учетом видо- и сортоспецифичности растений;

- перевод растений в нестерильные условия.

Начиная с первого этапа клонального размножения растений возникают первые трудности: получение асептической культуры, регенерация меристем, выделение фенолов в среду [2-5].

Для успешной регенерации меристемы и стабилизации растений в культуре *in vitro* важно подобрать период вегетации, когда приживаемость меристем наиболее высокая. Кроме этого, время отбора – этап вегетации, как и возраст растений-доноров, влияет на уровень экссудации фенольных соединений из эксплантов после их введения в *in vitro*, что может существенно влиять на витальность микропобегов при введении их в культуру *in vitro*. Обычно лучшим сроком для введения является период активного роста побегов [6]. По результатам наших исследований для введения подвоев косточковых в культуру *in vitro* лучшим сроком является период активного роста побегов – вторая декада мая, тогда приживаемость эксплантов составляет 78,2-94,6 % [7]. Кроме этого, значение имеет возраст растений, используемых для отбора эксплантов. При выборе протокола стерилизации растительного материала необходимо учитывать множество факторов, которые могут оказывать положительное или отрицательное влияние на размножение в условиях *in vitro*. Важное значение имеет место отбора материала (полевые условия или теплица), генотип растений, тип

эксплантов, возраст и физиологическое состояние материнского растения, процедура дезинфекции (концентрация и экспозиция) [2, 3, 8, 9].

В наших исследованиях было выявлено, что при введении эксплантов, отбираемых с растений возраста 10-15 лет в промышленном саду, даже при соблюдении оптимальных сроков отбора, гибель эксплантов на первом этапе может достигать 90-95 % и даже более по причине усиленного выделения фенольных соединений после стерилизации и высадки на питательную среду. При этом добавление в среду антиоксидантов (аскорбиновой и лимонной кислот, PVP, активированного угля), применение этиоляции эксплантов (3 суток) для предотвращения выделения фенолов (в рекомендуемых в литературе количествах) не оказывает положительного эффекта. При экссудации фенольных соединений происходит потемнение и последующая некротизация экспланта, сопровождающаяся потемнением питательной среды (рис. 1).



Рис. 1. Фенольная активность у эксплантов сорта Ренет Кубанский

Решением данной проблемы может быть использование в качестве доноров эксплантов одно-двухлетних саженцев и их содержание в контролируемых условиях. В ходе выполнения эксперимента, в котором двухлетние саженцы сортов Кубанское багряное, Ренет Симиренко, Флорина и Прикубанское выращивали в мини фитотроне при температуре 22 °С, влажности 60-75 %, освещенности 1500 Лк при введении эксплантов отобранных

с растений в условиях фитотрона, было отмечено значительно более низкое выделение фенолов. Приживаемость составляла от 34,3 до 50,0 % [10].

Снижения окисления тканей и выделения фенолов добиваются путем определения оптимальных сроков отбора эксплантов, добавления антиоксидантов в питательную среду (аскорбиновая кислота, активированный уголь, поливинилпирролидон (PVP)) отдельно или в комбинации [11, 12]. Эта проблема особенно актуальна для сортов и подвоев семечковых культур. Иногда, из-за сильного окисления тканей не удается стабилизировать экспланты в культуре *in vitro*.

Для получения стерильных эксплантов используются стерилизующие вещества различной химической природы. Чаще всего для дезинфекции применяли 0,1 % раствор сулемы ( $\text{HgCl}_2$ ) в различной экспозиции, в зависимости от культуры [6, 11, 13], нитрат серебра [14]. Кроме того, для предварительной обработки используют обработку различными фунгицидами [2, 15] в комбинации с основной обработкой, добавляют в среду антибиотики [3, 16].

В настоящее время для безопасности исследователей ртутьсодержащие стерилизаторы не применяют. В связи с этим необходимы альтернативные протоколы обработки, поэтому большое применение имеют различные хлорсодержащие препараты. Для каждой культуры и сорта растения эмпирическим путем подбирается оптимальный вариант обработки. Для обработки эксплантов земляники, винограда [17, 18] применяют гипохлорит натрия от 0,5 % до 1,5 % раствора в экспозиции 7-20 мин. в зависимости от сорта, иногда в комбинации с этанолом (70 %, 30 сек.) [4, 19].

В нашей работе мы выявили высокий уровень эффективности при использовании для дезинфекции эксплантов таблеток «ОКА-ТАБ», содержащих в одной таблетке 1,41-1,87 г активного хлора. По результатам их использования было выявлено, что применение 0,5 % раствора дезинфицирующих таблеток «ОКА-ТАБ» в экспозиции 5 минут обеспечивает эффективность санации эксплантов подвоев яблони на уровне 75-98 % [20]. Также в

ходе наших исследований было испытано применение антимикробного препарата «БИОПАК», использование которого в концентрации 0,1 % р-ра и экспозиции 3 минуты позволило получить до 75 % стерильных эксплантов при введении подвоя Gisela 5 и 64 % при введении подвоя М9 [21].

Оптимальное соотношение питательных веществ в среде, необходимое для роста и развития растений, также специфично не только для культур, но и зачастую для сортов. В целом, по результатам многолетних работ определены основные особенности развития культур на тех или иных средах. Так, среда по прописи Мурасиге-Скуга подходит для размножения винограда [13, 17, 18, 22], земляники [4, 19, 23], среда DKW – для размножения вишни и ее подвоев ЛЦ-52 и Gisela-6 [6, 24], для размножения сливы – модифицированная среда МС [11, 25], для размножения яблони используют среды Кворина-Лепуавра, среду Мурасиге-Скуга, половинную среду по прописи Мурасиге-Скуга или среда WPM [8, 15, 26].

Чаще всего среды модифицируют, варьируя количеством тех или иных компонентов, особенно гормонов. На этапе микроразмножения используют различные концентрации цитокининов 6-БАП, кинетина, TDZ [19, 23]. Для мультипликации земляники чаще используют 6-БАП в количестве 0,5 мг/л [27], для яблони – 0,5-1,5 мг/л [15], для винограда – 0,5 мг/л [18], для сливы – 0,5-1 мг/л [11, 25]. На этапе ризогенеза процессы корнеобразования регулируют ауксинами ИМК, ИУК, НУК в концентрации 0,5-1,5 мг/л [6, 11, 15, 27].

При промышленном производстве посадочного материала главной проблемой остается завершающий этап клонального микроразмножения растений – адаптация к нестерильным условиям. Листовые пластинки выращенных в условиях *in vitro* растений лишены воскового слоя, который защищает растения от чрезмерной потери влаги. Неразвитые корневые волоски не могут обеспечить необходимую всасывающую способность корней [28].



Для адаптации плодовых, ягодных культур и винограда используют различные почвенные смеси, содержащие торф, перлит, вермикулит, кокосовое волокно, лесную почву и т.д. в различном соотношении [28-31]. Л.В. Иванова-Ханина [32] добавляет к смеси субстратов абсорбент TERAWET, который повышает приживаемость винограда до 95-100 %. И.Д. Бородулина и др. [33] предлагают использовать для адаптации гидропонную установку, обработку ультразвуком и растворами низкомолекулярного биологически активного соединения – сульфата хитозана, что повышает адаптируемость земляники в 1,5-2 раза.

Перспективным направлением также является использование биологических активных вещества – препаратов на основе бактерий и грибов и их производных, позволяющих повысить устойчивость растений к водному стрессу, улучшить минеральное питание, ускорить процесс образования корневых волосков и в целом повысить адаптационную способность растений [34, 35].

Кроме того, для успешной адаптации растений требуются контролируемые условия влажности, температуры, освещения. Причем важна не только интенсивность освещения, но и качественный состав света, так как он является важным регуляторным фактором процессов корнеобразования и роста надземной части [36].

В связи с тем, что вследствие влияния различных факторов в процессе клонального микроразмножения растений (концентрации цитокининов в питательной среде, длительности культивирования и др.) у растений может индуцироваться генетическая (сомаклональная) изменчивость, необходим контроль генотипа полученных микрорастений по сравнению с исходным материалом.

Использование ДНК-маркерного анализа является самым прецизионным методом выявления сомаклональных изменений, так как некоторые изменения, возникающие в *in vitro* культуре, не являются очевидными, по-

тому что структурное изменение гена и его продукта не всегда изменяет соматклоны до такой степени, которая может наблюдаться в фенотипе [37].

В настоящее время доступны различные молекулярные методы для обнаружения вариаций последовательности между близкородственными геномами, такими как геномы растений-источников и соматклоны. При этом наиболее целесообразно использование мультилокусных ДНК-маркеров: случайно амплифицированная полиморфная ДНК (RAPD), анализ полиморфизма межмикросателлитных последовательностей (inter simple sequence repeat) ISSR, ДНК-маркеры, основанные на анализе полиморфизма ретротранспозонов (RBIP, IRAP), комбинация ISSR-праймера и праймеров к участкам ретротранспозонов (REMAP) и ряд других. Использование молекулярных маркеров для выявления изменений на уровне геномной ДНК в растении было опубликовано большим количеством исследователей [38-42].

Высокоинформативные мультилокусные ДНК-маркеры, характеризующиеся высоким насыщением спектра амплифицированных фрагментов (не менее 4-5 фрагментов и до 10-12), позволяют анализировать стабильность генома растений, полученных в условиях *in vitro*.

В современной научной литературе существует целый ряд примеров успешного применения мультилокусных ДНК-маркеров для идентификации генетических отклонений у растений, полученных путем микроклонального размножения. Так, с использованием 18 ISSR ДНК-маркеров проводили скрининг полученных растений-регенерантов лилии восточной при размножении в условиях *in vitro*. При этом было выявлено, что при прямой регенерации уровень проявления соматклональной изменчивости минимален [42]. В работе Q.M. Wang с соавторами [43] с использованием ISSR маркеров также проводили анализ генетической стабильности растений-регенерантов при микроклональном размножении вида *Clivia miniata*.

Наглядным примером информативности ISSR ДНК-маркеров для идентификации мутаций может послужить работа группы исследователей из лаборатории лесной генетики и биотехнологии Нанкинского университета (Китай). В процессе *in vitro* размножения вида *Lilium longiflorum* Thunb. была выполнена обработка адвентивных почек гамма-облучением с целью получения мутантных форм. У полученных растений-регенерантов проводили анализ генетических различий с исходными растениями с использованием ISSR ДНК-маркеров, которые позволили эффективно идентифицировать мутантные образцы, у которых в процессе последующей оценки по комплексу морфолого-анатомических признаков были выявлены отличия от исходной формы [44]. Следует отметить, что в работе, на предварительном этапе, при отборе ISSR-маркеров, из 50 маркеров отобрали только 7 наиболее информативных. Это подтверждает необходимость апробации зачастую значительных количеств ДНК-маркеров для отбора наиболее информативных.

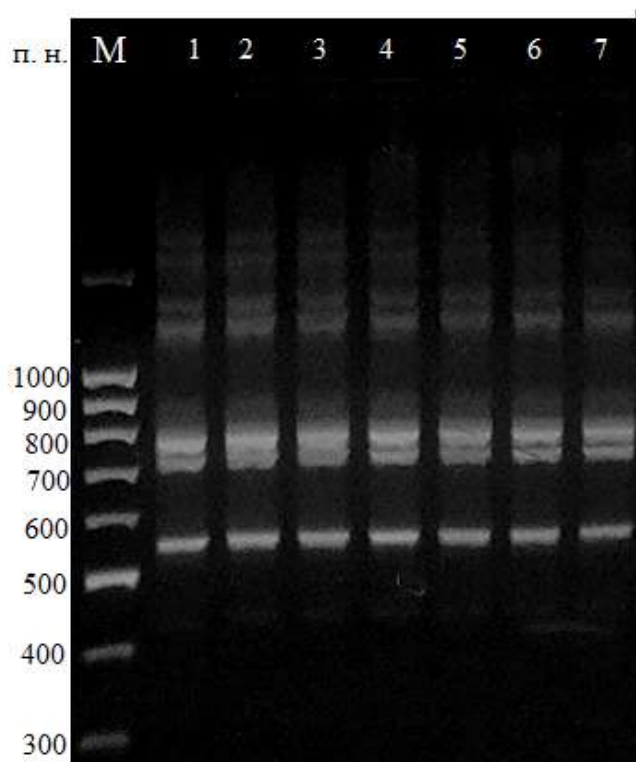
Очевидно, что ДНК-маркерный анализ является эффективным методическим инструментарием для поиска образцов, имеющих генетические отличия от исходного растения, и может быть использован в комплексе с фенотипической выбраковкой нестандартных растений, имеющих отклонения по морфолого-анатомическим характеристикам от исходных форм. Поэтому поиск новых информативных ДНК-маркеров позволяет дополнить методическую базу для ДНК-маркерного анализа, совершенствование которой также обладает высоким уровнем научной актуальности.

В связи с этим нами был выполнен ряд исследований, направленных на поиск эффективных мультилокусных ДНК-маркеров, перспективных для анализа генетической стабильности растений, полученных при микроклональном размножении. Так, в исследовании эффективности использования ISSR и IRAP ДНК-маркеров для анализа генетической стабильности

подвоев яблони при микроклонировании было выявлено два перспективных IRAP ДНК-маркера (Cass 1 и Cass 2) из пяти использованных (Cass 1, Cass 2, LTR 3, LTR 23, IRAP TDK2F). В свою очередь, из восьми ISSR-маркеров (UBC 811, UBC 813, UBC 818, UBC 825, UBC 841, UBC 843, 3A59, ASSR02) было выделено три маркера (UBC 811, UBC 841 и UBC 843), перспективных для использования при генотипировании образцов подвоев. Отобранные IRAP и ISSR ДНК-маркеры могут быть эффективно использованы для различных целей, включая генетическую идентификацию образцов, анализ генетической однородности растений, получаемых в процессе микроклонального размножения, а также для выполнения исследования по изучению генетических взаимосвязей образцов. [45]. В эксперименте по анализу генетической стабильности подвоев косточковых культур с использованием шести ISSR ДНК-маркеров нами было выявлено, что растения, полученные после 2-го и 4-го субкультивирования, сохранили генетическую однородность и идентичность с растением-доноров эксплантов. На рисунке 2 приведена электрофореграмма продуктов амплификации с ISSR маркером UBC 818.

Исходя из выполненной работы, можно сделать вывод, что использованные в работе ISSR маркеры дают стабильные и достоверные результаты, свидетельствующие о генетической идентичности регенерантов, полученных после третьего и четвертого цикла субкультивирования, с маточным растением.

Наряду с анализом генетической стабильности ДНК-маркерные технологии могут быть эффективно использованы для идентификации фитопатогенов. В системе питомниководства особую актуальность имеет идентификация вирусных и фитоплазменных патогенов, которые могут иметь и латентную форму – затруднительно диагностируемую по внешним признакам.



Примечание: донор эксплантов – 1, растения-регенеранты – 2-7, М – маркер молекулярной массы ДНК

Рис. 2. Генотипирование донора эксплантов и регенерантов подвоя ПКСК 1 маркером UBC 818

Однородность ДНК-профилей, полученная по ISSR ДНК-маркерам, свидетельствует в пользу сохранения генетической стабильности для данного подвоя при использовании принятых протоколов микроклонирования.

В настоящее время ряд факторов препятствует широкому внедрению методов ПЦР-диагностики вирусных и фитоплазменных патогенов в систему питомниководства плодовых растений. Это в первую очередь отсутствие на рынке РФ тест-систем для ПЦР-диагностики значительного количества вирусов и фитоплазм, а также необходимость разработки экспериментальных алгоритмов в ряду – отбор образца-экстракция пробы-хранение пробы-диагностика. Данные факторы актуализируют выполнение исследований по разработке и усовершенствованию методов ПЦР-диагностики вышеуказанных патогенов. Кроме того, необходим поиск оптимального алгоритма отбора и хранения проб перед проведением диагностики в целях исключения случаев получения ложных результатов по причине низкого качества пробы.

В проведенном нами на примере вируса Шарки сливы эксперименте было выявлено, что наилучший результат его ПЦР-идентификации наблюдался в случае, когда выделенная в день получения образцов РНК была переведена в форму кДНК, непосредственно перед проведением ПЦР-диагностики, и в одной пробе, в случае, когда выделенная РНК вируса переводилась в кДНК в день получения материала. Кроме этого, одним из решений вопроса длительного хранения может быть хранение симптомированного биоматериала, а также проб РНК при температуре  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  и ниже.

На основе использования комплекса биотехнологических и молекулярно-генетических методов нами были получены генетически однородные подвой косточковых культур, свободные от вируса Шарки сливы. Проводится их диагностика на наличие других вредоносных вирусов. Данные растения, после тестирования на другие вирусы косточковых культур и при отсутствии таковых, будут переведены в категорию «кандидаты в исходные» и, после повторного ретестирования, могут быть переведены в категорию «исходные растения».

Очевидно, что получение оздоровленных растений плодовых культур является сложным многоступенчатым процессом, каждый из этапов которого предполагает использование современных методов культуры клеток и тканей, методов молекулярной генетики. При этом зачастую, несмотря на наличие унифицированных экспериментальных протоколов, требуется проведение совершенствования элементов методик с учетом сортовой специфичности, а также специфики организации процессов питомниководства. Это позволяет эффективно решать проблемы, возникающие на разных этапах получения оздоровленного посадочного материала.

**Выводы.** На основе анализа современных достижений в области культуры клеток и тканей, а также результатов, полученных в результате проведения собственных исследований, может быть сделан вывод о высоком уровне влияния генотипических особенностей на развитие микрорас-

тений при размножении в условиях *in vitro*. Важным этапом является поиск оптимальных условий по всем этапам микроклонирования: введение эксплантов, мультипликация, первичное укоренение и адаптация в *ex vitro* условиях.

Для оценки соматклональной изменчивости, возникновение которой возможно при использовании метода клонального микроразмножения, наиболее эффективно использовать метод ДНК-маркерного анализа с использованием мультилокусных ДНК-маркеров. Данный метод позволяет еще на стадии пробирочных растений, до укоренения растений-регенерантов проводить анализ на наличие генетических отклонений. Также возможно выполнение анализа значительных количеств образцов за относительно короткий промежуток времени.

#### Литература

1. Джигадло Е.Н. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / под ред. Е.Н. Джигало. Орёл: ГНУ ВНИИСПК, 2005. 50 с.
2. Ghasheem N., Stănică F., Peticilă A.G., Venat O. *In vitro* effect of various sterilization techniques on peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) explants // Scientific Papers. Series B, Horticulture. 2018. Vol. LXII. P. 227-234.
3. Kay Thi Oo, Kyaw Swar Oo, Yin Yin Mon. Establishment of Efficient Surface Sterilization Protocol on Different Types of Field Grown Strawberry Explants (*Fragaria x ananassa* Duch.) // Journal of Scientific and Innovative Research. 2018. Vol. 7(3). P. 70-74.
4. Jan Aarifa, Bhat K. M., Bhat, S. J. A., Mir M. A., Bhat M. A., Imtiyaz A., Rather W., Rather J. A. Surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown strawberry explants intended for *in vitro* culture // African Journal of Biotechnology. 2013. Vol. 12(39). P. 5749-5753. DOI:10.5897/AJB2013.12918.
5. Yadav S., Yadav P. K., Sharma K., Yadav J., Yadav P. et. al. Meristem cultur for Crop Improvement: An overview // International Journal of Advanced Research in Science, Engineering and Technology. 2019. Vol. 6. I. 6. P. 9632-9637.
6. Doric D., Ognjanov V., Barać G., Ljubojević M., Pranjić A. et al. Use of *in vitro* propagation of "Oblačinska" sour cherry in rootstock breeding // Turkish Journal of Biology. 2015. V. 39. P. 575-581. DOI:10.3906/biy-1412-85.
7. Vinter M.A., Fedorovitch S., Karpushina M., Gridnev S. Micropropagation of rootstocks of stone fruit cultures *in vitro* // BIO Web of Conferences. 2020. №. 25. P. 12. DOI:10.1051/bioconf/20202505001.
8. Teixeira da Silva J. A., Gulyás A., Tábori K. M., Wang M. R., Wang Q.Ch. et al. *In vitro* tissue culture of apple and other *Malus* species: recent advances and applications // Planta. 2019. Vol. 249. P. 975-1006. DOI:10.1007/s00425-019-03100-x.
9. Juárez M.C.V., López D.E., Espino L. F. D., Pérez E. G. *Ex vitro* acclimation of *Fragaria x ananassa* Duch seedlings // Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2019. Vol. 10. №1. P. 91-100. DOI:10.29312/remexca.v10i1.1633.

10. Лободина Е.В., Супрун И.И., Авакимян А.О., Аль-Накиб Е.А. Влияние компонентного состава питательных сред при введении в культуру *in vitro* эксплантов яблони сортов Прикубанское и Кубанское Багряное // Садоводство и виноградарство. 2020. № 5. С. 18-23. <https://doi.org/10.31676/0235-2591-2020-5-18-23> .
11. Kassaye E., Bekele B.D. *In vitro* optimization of the protocol for micropropagation of plum (*Prunus salicina* L. var. *methley*) from nodal explants // Biotechnology International. 2015. V. 8(4). P. 137-148.
12. Soni M., Thakur M., Modgil M. *In vitro* multiplication of Merton I. 793—An apple rootstock suitable for replantation// Indian Journal of Biotechnology. – 2011. Vol. 10. P. 362-368.
13. Yancheva S., Marchev P., Yaneva V. et al. *In vitro* propagation of grape cultivars and rootstocks for production of pre-basic planting material // Bulgarian Journal of Agricultural Science. 2018. V.24 (№ 5). P. 801-806.
14. Mihaljević, I. K. Dugalić, Tomaš V. [et al.] *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of «Oblaćinska» sour cherry // Journal of Agricultural Sciences. 2013. Vol. 58. №2. P. 117-126. DOI:10.2298/JAS1302117M.
15. Ghanbari A. Impacts of plant growth regulators and culture media on *in vitro* propagation of three apple (*Malus domestica* Borkh.) rootstocks // Iranian journal of genetics and plant breeding. 2014. Vol. 3. (1). P. 11-20.
16. Сулейманова С.Д. Эффективность антибиотиков в оздоровлении микроклонов подвоев Махма 14, GF 677, Мугобалан 29С от инфекций различной этиологии // Аграрная наука. 2019. № 5. С. 75-78.
17. Surakshitha N.C., Soorianathasundaram K., Ganga M., Raveendran M. Alleviating shoot tip necrosis during *in vitro* propagation of grape cv. Red Globe // Scientia Horticulturae. 2019. Vol. 248. P. 118-125. DOI:10.1016/j.scienta.2019.01.013.
18. Kinfe B., Feyssa T., Bedada G. *In vitro* micropropagation of grape vine (*Vitis vinifera* L.) from nodal culture // African Journal of Biotechnology. 2017. Vol. 16(43). P. 2083-2091. DOI:10.5897/AJB2016.15803.
19. Munir M., Iqbal S., Baloch J.U.D., Khakwani A.A. *In vitro* explant sterilization and bud initiation studies of four strawberry cultivars // Journal of Applied Horticulture. 2015. V. 17(3). P. 192-198. DOI:10.37855/jah.2015.v17i03.36.
20. Санация эксплантов подвоев яблони при введении в культуру *in vitro* [Электронный ресурс] / М.А. Винтер [и др.] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2019. № 60(6). С. 84-90. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/19/06/09.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2019-6-60-84-90 (дата обращения: 14.09.2021).
21. Винтер М.А., Федорович С.В., Тхамокова И.Х. Эффективность антисептика «БИОПАК» при санации эксплантов в ходе клонального микроразмножения плодовых культур [Электронный ресурс] // Научный журнал КубГАУ. 2020. №162(08). С. 1-9. URL: <http://ej.kubagro.ru/2020/08/pdf/07.pdf> (дата обращения: 24.08.2021 г.)
22. Anupa T., Sahijram L., Samarth R., Madhusudhana B. *In vitro* shoot introduction of three grape (*Vitis vinifera* L.) varieties using nodal and axillary explants // The Bioscan. 2016. V.11(1). P. 201-204.
23. Ben Mahmoud K. Najar A. Jedid E. et.al Tissue culture techniques for clonal propagation, viral sanitation and germplasm improvement in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) // Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology. 2017. №47(2). P. 2564-2576.
24. Khamurzaev S.M., Vamatov I.M., Butsaeva E.M., Sibiryatkin S.V. The use of the Driver-Kuniyuki nutrient medium for micropropagation of rootstocks of LC-52 (*Cerasus vulgaris* x *Cerasus fruticosa*) and Gizela 6 (*Peisica vulgaris* x *Cerasus canescens*) stone fruit crops // Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences. 2018. V. 6(3). P. 623-627. DOI:10.18006/2018.6(3).623.627.
25. Коваленко Н.Н. Медведева Н.И. Совершенствование этапов клонального микроразмножения сливы домашней // Современное садоводство. 2015. № 2 (14). С. 99-104. DOI:10.35547/ИМ.2020.21.1.001.



26. Meneguzzi A., Gonçalves M.J., Camargo S.S., Grimaldi F., et al. Micropropagation of the new apple rootstock 'G. 814' // *Ciência Rural*, Santa Maria. 2017. № 47. DOI:10.1590/0103-8478cr20160615.

27. Ashrafuzzaman, M., Faisal S. M., Yadav D., Khanam D., Raihan F. Micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa*) through runner culture // *Bangladesh J. Agril. Res.* 2013. Vol. 38(3). P 467-472. DOI:10.3329/bjar.v38i3.16973.

28. Иванова-Ханина Л.В. Адаптация растений-регенерантов ежевики к условиям *ex-vitro* // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. 2019. Том 5 (71). № 1. С. 30-39.

29. Kaur A., Singh D., Gupta V. N., Kumar A. *In vitro* propagation of important rootstocks of apple for rapid cloning and improvement // *Biotechnologies of Crop Improvement*. 2018. Vol. 1. P. 215-240. DOI:10.1007/978-3-319-78283-6\_6.

30. Podwyszyńska M., Cieślińska M. Rooting shoots of apple varieties and their tetraploids obtained by the *in vitro* technique // *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*. 2018. Vol. 17(1). P. 49-62. DOI:10.24326/asphc.2018.1.5.

31. Lizárraga A., Fraga M., Ascasíbar J., González M.L. *In vitro* propagation and recovery of eight apple and two pear cultivars held in a germplasm bank // *American Journal of Plant Sciences*. 2017. Vol. 8. P. 2238-2254. DOI:10.4236/ajps.2017.89150.

32. Иванова-Ханина Л. В. Влияние состава субстрата на приживаемость микро-растений *Vitis vinifera* L. *in vivo* // Экосистемы. 2018. № 13 (43). С. 84-88.

33. Бородулина, И.Д., Плаксина Т.В. Адаптация растений-регенерантов земляники садовой сорта московский деликатес к условиям *ex-vitro* // *Acta Biologica Sibirica*. 2015. №1-2. С. 74-84. DOI:10.14258/abs.v1i1-2.832.

34. Hosseini A., Gharaghani A. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of apple rootstocks in calcareous soil // *International Journal of Horticultural Science and Technology*. 2015. Vol. 2(2). P. 173-185.

35. Яблонская М.И., Гинс М.С., Молчанова М.А. Биотизация растений *in vitro* // Вестник РУДН, серия Агронимия и животноводство. 2016. № 1. С. 15-20. DOI: <https://doi.org/10.22363/2312-797X-2016-1-15-20>.

36. Мороз Д.С., Шпак М.Ю., Петровская Е.А., Медведик С.Е. Особенности адаптации меристемных растений земляники садовой *Fragaria x ananassa* Duch. в условиях светодиодного освещения // Вестник БарГУ. Серия: Биологические науки. Сельскохозяйственные науки. Общая биология. 2019. № 7. С. 73-92.

37. Bello-Bello J., Iglesias-Andreu L., Avilés-Viñ S. et al. Somaclonal Variation in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) as Assessed ISSR Molecular Markers // *HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science*. 2014. № 49. P481-485. DOI:10.21273/HORTSCI.49.4.481.

38. Andreev O., Spiridonova K.V., Solovyan V.T., Kunakh V.A. Variability of ribosomal RNA genes in *Rauwolfia* species: Parallelism between tissue culture-induced rearrangements and interspecies polymorphism // *Cell Biol. Intl*. 2005. № 2. P. 92-127. DOI:10.1016/j.cellbi.2004.11.002.

39. Gernand D., Golczyk H., Rutten T. et al. Tissue culture triggers chromosome alterations, amplification, and transposition of repeat sequences in *Allium fistulosum* // *Genome*. 2007. № 50. P.435-442. DOI:10.1139/g07-023.

40. Jin S., Mushke R., Zhu H., et al. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers // *Plant Cell Rpt*. 2008. №27. P.1303-1316. DOI: 10.1007/s00299-008-0557-2.

41. Li X., Yu X., Wang N. et al. Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley [*Hordeum brevisubulatum* (Trin.)] // *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2007. №90. P.153-168. DOI:10.1007/s11240-007-9224-5.

42. Liu X., Yang G. Adventitious shoot regeneration of oriental lily (*Lilium orientalis*) and genetic stability evaluation based on ISSR marker variation // *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 2012. № 48. P.172-179. DOI:10.1007/s11627-012-9429-0.

43. Wang Q.M., Gao F., Gao X. Regeneration of *Clivia miniata* and assessment of clonal fidelity of plantlets // *Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult.* 2012. Vol. 109. P. 191-200. DOI:10.1007/s11240-011-0085-6 .

44. Xi M., Sun L., Qiu S. *In vitro* mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*) // *Plant Cell Rep.* 2012. № 31. P. 1043-1051. DOI:10.1007/s00299-011-1222-8.

45. Степанов И.В., Супрун И.И., Токмаков С.В., Лободина Е.В. Поиск эффективных IRAP и ISSR маркеров для генетического анализа подвоев яблони [Электронный ресурс] // *Плодоводство и виноградарство Юга России.* 2019. № 60(6). С. 11-20. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/19/06/02.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2019-6-60-11-20 (дата обращения: 14.09.2021).

### References

1. 1. Dzhigadlo E.N. Metodicheskie rekomendacii po ispol'zovaniyu biotekhnologicheskikh metodov v rabote s plodovymi, yagodnymi i dekorativnymi kul'turami / pod red. E.N. Dzhigalo. Oryol: GNU VNIISPK, 2005. 50 s.

2. Ghasheem N., Stănică F., Peticilă A.G., Venat O. *In vitro* effect of various sterilization techniques on peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) explants // *Scientific Papers. Series B, Horticulture.* 2018. Vol. LXII. P. 227-234.

3. Kay Thi Oo, Kyaw Swar Oo, Yin Yin Mon. Establishment of Efficient Surface Sterilization Protocol on Different Types of Field Grown Strawberry Explants (*Fragaria x ananassa* Duch.) // *Journal of Scientific and Innovative Research.* 2018. Vol. 7(3). P. 70-74.

4. Jan Aarifa, Bhat K. M., Bhat, S. J. A., Mir M. A., Bhat M. A., Imtiyaz A., Rather W., Rather J. A. Surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown strawberry explants intended for *in vitro* culture // *African Journal of Biotechnology.* 2013. Vol. 12(39). R. 5749-5753. DOI:10.5897/AJB2013.12918.

5. Yadav S., Yadav P. K., Sharma K., Yadav J., Yadav P. et. al. Meristem cultur for Crop Improvement: An overview // *International Journal of Advanced Research in Science, Engineering and Technology.* 2019. Vol. 6. I. 6. P. 9632-9637.

6. Doric D., Ognjanov V., Barać G., Ljubojević M., Pranjić A. et al. Use of *in vitro* propagation of "Oblačinska" sour cherry in rootstock breeding // *Turkish Journal of Biology.* 2015. V. 39. P. 575-581. DOI:10.3906/biy-1412-85.

7. Vinter M.A., Fedorovitch S., Karpushina M., Gridnev S. Micropropagation of rootstocks of stone fruit cultures *in vitro* // *BIO Web of Conferences.* 2020. №. 25. P. 12. DOI:10.1051/bioconf/20202505001.

8. Teixeira da Silva J. A., Gulyás A., Tábori K. M., Wang M. R., Wang Q.Ch. et al. *In vitro* tissue culture of apple and other Malus species: recent advances and applications // *Planta.* 2019. Vol. 249. P. 975-1006. DOI:10.1007/s00425-019-03100-x.

9. Juárez M.C.V., López D.E., Espino L. F. D., Pérez E. G. *Ex vitro* acclimation of *Fragaria x ananassa* Duch seedlings // *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 2019. Vol. 10. №1. R. 91-100. DOI:10.29312/remexca.v10i1.1633.

10. Lobodina E.V., Suprun I.I., Avakimyan A.O., Al'-Nakib E.A. Vliyanie komponentnogo sostava pitatel'nyh sred pri vvedenii v kul'turu *in vitro* eksplantov yablони sortov Prikubanskoe i Kubanskoe Bagryanoe // *Sadovodstvo i vinogradarstvo.* 2020. № 5. S. 18-23. <https://doi.org/10.31676/0235-2591-2020-5-18-23> .

11. Kassaye E., Bekele B.D. *In vitro* optimization of the protocol for micropropagation of plum (*Prunus salicif* L. var. methley) from nodal explants // *Biotechnology International.* 2015. V. 8(4). P. 137-148.

12. Soni M., Thakur M., Modgil M. *In vitro* multiplication of Merton I. 793—An apple rootstock suitable for replantation // *Indian Journal of Biotechnology.* – 2011. Vol. 10. P. 362-368.

13. Yancheva S., Marchev R., Yaneva V. et al. *In vitro* propagation of grape cultivars and rootstocks for production of pre-basic planting material // *Bulgarian Journal of Agricultural Science.* 2018. V.24 (№ 5). R. 801-806.

14. Mihaljević, I. K. Dugalić, Tomaš V. [et al.] *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of «Oblaćinska» sour cherry // Journal of Agricultural Sciences. 2013. Vol. 58. № 2. P. 117-126. DOI:10.2298/JAS1302117M.

15. Ghanbari A. Impacts of plant growth regulators and culture media on *in vitro* propagation of three apple (*Malus domestica* Borkh.) rootstocks // Iranian journal of genetics and plant breeding. 2014. Vol. 3. (1). P. 11-20.

16. Sulejmanova S.D. Effektivnost' antibiotikov v ozdorovlenii mikroklonov podvoev Mahma 14, GF 677, Myrobalan 29C ot infekcij razlichnoj etiologii // Agrarnaya nauka. 2019. № 5. S. 75-78.

17. Surakshitha N.C., Soorianathasundaram K., Ganga M., Raveendran M. Alleviating shoot tip necrosis during *in vitro* propagation of grape cv. Red Globe // Scientia Horticulturae. 2019. Vol. 248. P. 118-125. DOI:10.1016/j.scienta.2019.01.013.

18. Kinfe B., Feyssa T., Bedada G. *In vitro* micropropagation of grape vine (*Vitis vinifera* L.) from nodal culture // African Journal of Biotechnology. 2017. Vol. 16(43). P. 2083-2091. DOI:10.5897/AJB2016.15803.

19. Munir M., Iqbal S., Baloch J.U.D., Khakwani A.A. *In vitro* explant sterilization and bud initiation studies of four strawberry cultivars // Journal of Applied Horticulture. 2015. V. 17(3). R. 192-198. DOI:10.37855/jah.2015.v17i03.36.

20. Sanaciya eksplantov podvoev yabloni pri vvedenii v kul'turu *in vitro* [Elektronnyj resurs] / M.A. Vinter [i dr.] // Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii. 2019. № 60(6). S. 84-90. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/19/06/09.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2019-6-60-84-90 (data obrashcheniya: 14.09.2021).

21. Vinter M.A., Fedorovich S.V., Thamokova I.H. Effektivnost' antiseptika «BIOPAK» pri sanacii eksplantov v hode klonal'nogo mikrorazmnozheniya plodovyh kul'tur [Elektronnyj resurs] // Nauchnyj zhurnal KubGAU. 2020. №162(08). S. 1-9. URL: <http://ej.kubagro.ru/2020/08/pdf/07.pdf> (data obrashcheniya: 24.08.2021 g.)

22. Anupa T., Sahijram L., Samarth R., Madhusudhana B. *In vitro* shoot introduction of three grape (*Vitis vinifera* L.) varieties using nodal and axillary explants // The Bioscan. 2016. V.11(1). P. 201-204.

23. Ben Mahmoud K. Najar A. Jedid E. et.al Tissue culture techniques for clonal propagation, viral sanitation and germplasm improvement in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) // Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology. 2017. №47(2). R. 2564-2576.

24. Khamurzaev S.M., Bamatov I.M., Butsaeva E.M., Sibiryatkin S.V. The use of the Driver-Kuniyuki nutrient medium for micropropagation of rootstocks of LC-52 (*Cerasus vulgaris* x *Cerasus fruticose*) and Gizela 6 (*Peisica vulgaris* x *Cerasus canescens*) stone fruit crops // Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences. 2018. V. 6(3). R. 623-627. DOI:10.18006/2018.6(3).623.627.

25. Kovalenko N.N. Medvedeva N.I. Covershenstvovanie etapov klonal'nogo mikrorazmnozheniya slivy domashnej // Sovremennoe sadovodstvo. 2015. № 2 (14). S. 99-104. DOI:10.35547/IM.2020.21.1.001.

26. Meneguzzi A., Gonçalves M.J., Camargo S.S., Grimaldi F., et al. Micropropagation of the new apple rootstock 'G. 814' // Ciência Rural, Santa Maria. 2017. № 47. DOI:10.1590/0103-8478cr20160615.

27. Ashrafuzzaman, M., Faisal S. M., Yadav D., Khanam D., Raihan F. Micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa*) through runner culture // Bangladesh J. Agril. Res. 2013. Vol. 38(3). P 467-472. DOI:10.3329/bjar.v38i3.16973.

28. Ivanova-Hanina L.V. Adaptaciya rastenij-regenerantov ezheviki k usloviyam *ex-vitro* // Uchenye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo. Biologiya. Himiya. 2019. Tom 5 (71). № 1. S. 30-39.

29. Kaur A., Singh D., Gupta V. N., Kumar A. *In vitro* propagation of important rootstocks of apple for rapid cloning and improvement // Biotechnologies of Crop Improvement. 2018. Vol. 1. P. 215-240. DOI:10.1007/978-3-319-78283-6\_6.

30. Podwyszyńska M., Cieślińska M. Rooting shoots of apple varieties and their tetraploids obtained by the *in vitro* technique // *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*. 2018. Vol. 17(1). P. 49-62. DOI:10.24326/asphc.2018.1.5.

31. Lizárraga A., Fraga M., Ascasíbar J., González M.L. *In vitro* propagation and recovery of eight apple and two pear cultivars held in a germplasm bank // *American Journal of Plant Sciences*. 2017. Vol. 8. P. 2238-2254. DOI:10.4236/ajps.2017.89150.

32. Ivanova-Hanina L. V. Vliyanie sostava substrata na przhivaemost' mikrorastenij *Vitis vinifera* L. *in vivo* // *Ekosistemy*. 2018. № 13 (43). S. 84-88.

33. Borodulina, I.D., Plaksina T.V. Adaptatsiya rastenij-regenerantov zemlyaniki sadovoj sorta moskovskij delikates k usloviyam *ex-vitro* // *Acta Biologica Sibirica*. 2015. №1-2. S. 74-84. DOI:10.14258/abs.v1i1-2.832.

34. Hosseini A., Gharaghani A. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of apple rootstocks in calcareous soil // *International Journal of Horticultural Science and Technology*. 2015. Vol. 2(2). P. 173-185.

35. Yablonskaya M.I., Gins M.S., Molchanova M.A. Biotizatsiya rastenij *in vitro* // *Vestnik RUDN, seriya Agronomiya i zhivotnovodstvo*. 2016. № 1. S. 15-20. DOI: <https://doi.org/10.22363/2312-797X-2016-1-15-20>.

36. Moroz D.S., Shpak M.Yu., Petrovskaya E.A., Medvedik S.E. Osobennosti adaptatsii meristemnyh rastenij zemlyaniki sadovoj *Fragaria x ananassa* Duch. v usloviyah svetodi-odnogo osveshcheniya // *Vestnik BarGU. Seriya: Biologicheskie nauki. Sel'skokozyajstvennye nauki. Obshchaya biologiya*. 2019. № 7. С. 73-92.

37. Bello-Bello J., Iglesias-Andreu L., Avilés-Viñ S. et al. Somaclonal Variation in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) as Assessed ISSR Molecular Markers // *HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science*. 2014. № 49. P481-485. DOI:10.21273/HORTSCI.49.4.481.

38. Andreev O., Spiridonova K.V., Solovyan V.T., Kunakh V.A. Variability of ribosomal RNA genes in *Rauwolfia* species: Parallelism between tissue culture-induced rearrangements and interspecies polymorphism // *Cell Biol. Intl*. 2005. № 2. P. 92-127. DOI:10.1016/j.cellbi.2004.11.002.

39. Gernand D., Golczyk H., Rutten T. et al. Tissue culture triggers chromosome alterations, amplification, and transposition of repeat sequences in *Allium fistulosum* // *Genome*. 2007. № 50. P. 435-442. DOI:10.1139/g07-023.

40. Jin S., Mushke R., Zhu H., et al. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers // *Plant Cell Rpt*. 2008. №27. P.1303-1316. DOI: 10.1007/s00299-008-0557-2.

41. Li X., Yu X., Wang N. et al. Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley [*Hordeum brevisubulatum* (Trin.)] // *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2007. №90. P.153-168. DOI:10.1007/s11240-007-9224-5.

42. Liu X., Yang G. Adventitious shoot regeneration of oriental lily (*Lilium orientalis*) and genetic stability evaluation based on ISSR marker variation // *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 2012. № 48. P.172-179. DOI:10.1007/s11627-012-9429-0.

43. Wang Q.M., Gao F., Gao X. Regeneration of *Clivia miniata* and assessment of clonal fidelity of plantlets // *Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult*. 2012. Vol. 109. P. 191-200. DOI:10.1007/s11240-011-0085-6.

44. Xi M., Sun L., Qiu S. *In vitro* mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*) // *Plant Cell Rep*. 2012. № 31. P. 1043-1051. DOI:10.1007/s00299-011-1222-8.

45. Stepanov I.V., Suprun I.I., Tokmakov S.V., Lobodina E.V. Poisk effektivnyh IRAP i ISSR markerov dlya geneticheskogo analiza podvoev yabloni [Elektronnyj resurs] // *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii*. 2019. № 60(6). S. 11-20. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/19/06/02.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2019-6-60-11-20 (data obrashcheniya: 14.09.2021).