

УДК 632.3

DOI 10.30679/2219-5335-2021-5-71-116-130

**ПРИМЕНЕНИЕ  
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ  
МЕТОДОВ  
В ПИТОМНИКОВОДСТВЕ**

Карпушина Марина Владимировна  
канд. с.-х. наук  
старший научный сотрудник  
лаборатории питомниководства  
email: markarp@yandex.ru

Супрун Иван Иванович  
канд. биол. наук  
заведующий ФНЦ  
«Селекции и питомниководства»  
email: supruni@mail.ru

Лободина Елена Вадимовна  
младший научный сотрудник  
селекционно-биотехнологической  
лаборатории  
email: alyona2255@yandex.ru

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

Биотехнология внедряется в сельскохозяйственную практику быстрыми темпами. Используемые биотехнологические методы играют важную роль в выращивании сельскохозяйственных, садовых и декоративных растений, при которых происходит улучшение их агрономических показателей. Биотехнологические методы являются весьма эффективными, поскольку клетки растений являются тотипотентными, означаящее то, что каждая клетка обладает генетической информацией и клеточными механизмами, необходимыми для создания всего организма. Таким образом, с помощью

UDC 632.3

DOI 10.30679/2219-5335-2021-5-71-116-130

**APPLICATION  
OF BIOTECHNOLOGICAL  
METHODS IN THE NURSERY  
INDUSTRY**

Karpushina Marina Vladimirovna  
Cand. Agr. Sci.  
Senior Research Associate  
Laboratory of Nursery  
email: markarp@yandex.ru

Suprun Ivan Ivanovich  
Cand. Biol. Sci.  
Head of Breeding  
and Nursery FSC  
email: supruni@mail.ru

Lobodina Elena Vadimovna  
Junior Research Associate  
of Selection and Biotechnology  
Laboratory  
email: alyona2255@yandex.ru

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

Biotechnology is introducing into agricultural practice at a rapid pace. The biotechnological methods used play an important role in the cultivation of agricultural, horticultural and ornamental plants, which improve their agronomic performance. Biotechnological methods are highly effective because plant cells are totipotent, which means that every cell has the genetic information and cellular machinery needed to create an entire organism. Thus, with the help of tissue culture technology,

технологии культуры ткани можно получить большое количество растений, которые генетически идентичны родительскому, а также друг другу. Технология культивирования тканей растений широко используется для крупномасштабного размножения растений. Помимо использования в качестве инструмента исследования, методы культивирования тканей растений в последние годы приобрели важное промышленное значение в области размножения растений, устранения болезней, улучшения растений и производства вторичных метаболитов. Небольшие кусочки ткани (называемые эксплантами) можно использовать для производства сотен и тысяч растений в непрерывном процессе. Один эксплант может быть размножен до нескольких тысяч растений за относительно короткий период времени и в контролируемых условиях, независимо от сезона и погоды на круглогодичной основе. В статье представлен краткий обзор наиболее важных используемых методов биотехнологии, таких как: микроразмножение, культура меристем, соматический эмбриогенез, соматическая изменчивость, отбор *in vitro*, культура протопластов и соматическая гибридизация. На основе проведенного анализа литературных источников дана оценка по вопросу преимуществ и недостатков биотехнологических методов, и их влияния на отрасль питомниководства и системы выращивания.

*Ключевые слова:* БИОТЕХНОЛОГИЯ, ПИТОМНИКОВОДСТВО, МЕТОДЫ, МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ, *IN VITRO*, КУЛЬТУРА МЕРИСТЕМ, СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ

it is possible to obtain a large number of plants that are genetically identical to the parent, as well as to each other. Plant tissue culture technology is widely used for large-scale plant propagation. In addition to being used as a research tool, plant tissue culture techniques have in recent years acquired important industrial significance in the fields of plant propagation, disease elimination, plant improvement, and the production of secondary metabolites. Small pieces of tissue (called explants) can be used to produce hundreds or thousands of plants in a continuous process. One explant can be propagated to several thousand plants in a relatively short period of time and under controlled conditions, regardless of the season and weather, on a year-round basis. The article provides a brief overview of the most important biotechnological methods used, such as micropropagation, meristem culture, somatic embryogenesis, somaclonal variation, *in vitro* selection, protoplast culture and somatic hybridization. Based on the analysis of literature data, the assessment of the advantages and disadvantages of each biotechnological method is made, and how the considered biotechnological methods can affect the nursery industry and change the growing systems in nurseries.

*Key words:* BIOTECHNOLOGY, NURSERY, METHODS, MICRO-REPRODUCTION, *IN VITRO*, MERISTEM CULTURE, SOMATIC EMBRYOGENESIS

**Введение.** Биотехнология растений стала особенно важной в сельскохозяйственном производстве за последние десять лет. За это время культура тканей растений фактически вышла за рамки небольших лабораторий и заняла свое место среди наиболее распространенных и широкомасштабных

методов, используемых в мировой сельскохозяйственной промышленности. Культуру тканей растений, более известную как микроразмножение, можно в широком смысле определить как набор методов, используемых для выращивания большого количества растительных клеток *in vitro* в асептической и строго контролируемой среде.

Биотехнологические методы являются весьма эффективными поскольку клетки растений являются тотипотентными, то есть каждая клетка обладает генетической информацией и клеточными механизмами, необходимыми для создания всего организма. Таким образом, с помощью микроразмножения можно получить большое количество растений, которые генетически идентичны родительскому, а также друг другу [1-3].

Биотехнологические методы играют важную роль в выращивании сельскохозяйственных, садовых и декоративных растений, при которых происходит улучшение их агрономических показателей. Исследования культур тканей растений – это многомерная наука, перспективная для повышения урожайности сельскохозяйственных культур. В то время как большинство питомниководов познакомились с методами микроразмножения, другие аспекты исследования культур тканей освещены в меньшей степени. Например, возможность отбора клонов, устойчивых к патогенам или стрессу растений, а также создание новых генетических комбинаций посредством соматической гибридизации, являются некоторыми из новых методов, которые редко применяются в отрасли питомниководства [4-6].

В этой статье представлен краткий обзор наиболее важных методов биотехнологии, которые могут оказать влияние на отрасль питомниководства и полностью изменить системы выращивания в питомниках. Здесь представлены наиболее используемые методы, такие как микроразмножение, культура меристем, соматический эмбриогенез, соматическая изменчивость, отбор *in vitro*, культура протопластов и соматическая гибридизация.

**Обсуждение. Микроразмножение.** Массовое размножение растений высокого качества является одним из основных преимуществ микроразмножения. Во многих случаях традиционное размножение – это медленный процесс, в ходе которого ряд заболеваний и вредителей могут ограничивать процесс выращивания.

Микроразмножение дает несколько преимуществ, недоступных при использовании традиционных методов размножения. Одно из которых – выращивание большого количества растений из небольших частей исходного растения в относительно короткие промежутки времени [4, 6].

Кроме того, после укоренения растение является постоянным источником новых растений, которые могут привести к производству их в тепличных условиях без сезонных перерывов.

В зависимости от вида, исходные тканевые эксплантаты могут быть взяты из ткани верхушки побега, листа, боковой почки, стебля или корня. В большинстве случаев исходное растение не уничтожается, что имеет большое значение для владельца редкого или необычного растения [7].

После помещения эксплантата в подходящую питательную среду размножение происходит до тех пор, пока не будет получено необходимое количество растений, все из которых имеют генетические характеристики исходного образца. Средняя скорость роста зависит от используемого вида экспланта. Всходы обычно пересаживают каждые четыре недели на новую питательную среду для размножения. Индукция корневой системы побегов происходит на соответствующей питательной среде. Укоренившиеся «микровсходы» в дальнейшем успешно выращиваются либо в контейнерах, либо в полевых посадках [8, 9].

Несмотря на множество преимуществ, метод микроразмножения имеет ряд недостатков, а именно: растения, полученные способом микроразмножения, имеют одинаковый генетический материал, поэтому они одинаково подвержены негативным факторам окружающей среды, инфекциям

и вредителям. При этом методе размножения невозможно появление новых комбинаций, которые возникают при мейотическом делении. Кроме того, не все растения могут быть получены методом микроразмножения. При этом методе также происходит снижение генетического разнообразия и некоторые аллели могут быть необратимо исключены из генетического пула. Метод микроразмножения дорогостоящий, а также ряд инфекционных заболеваний очень трудно элиминировать при этом способе [10-12].

*Культура меристем.* В культуре меристемы для целей культивирования используются меристематические ткани в качестве эксплантата. Меристематические ткани – это тип тканей, которые могут непрерывно делиться и производить новые клетки. Техника культивирования меристем была разработана Морелем и Мартином в 1952 году для выращивания георгинов. Меристема представляет собой купол из активно делящихся клеток диаметром около 0,1 мм. Эндогенные контаминанты (вирусы) нелегко проникают в меристему, что часто приводит к формированию здорового растения. В сочетании с методами микроразмножения большое количество здоровых растений может быть получено из меристематических эксплантатов. Техника культивирования меристем в большей степени подходит для уничтожения вирусов, сохранения генов, генетической трансформации и селекции растений. Она успешно используется для размножения ряда сельскохозяйственных культур [11-13].

Однако и этот метод имеет недостатки. Во-первых, для налаживания производственного процесса требуется больше технических знаний, необходимо специализированное оборудование, относительно дорогое в установке. Кроме этого, протоколы по размножению растений не оптимизированы для всех видов, в связи с чем требуется индивидуальный подход к каждой культуре. Также, полученные в итоге растения могут не соответствовать отраслевым стандартам.

*Соматический эмбриогенез.* Соматический эмбриогенез – это морфогенетический процесс, при котором соматические клетки обладают способностью производить эмбрионы без слияния гамет, он используется как техника массового размножения растений.

Возможные применения соматического эмбриогенеза по мнению ряда исследователей [14, 15] следующие:

– производство в массовом масштабе: соматические эмбрионы имеют большое преимущество перед обычным размножением – из одного эксплантата можно получить огромное количество эмбрионов;

– быстрое размножение за счет производства соматических эмбриогенеза в клеточных культурах и использования биореакторов для масштабирования технологии;

– сокращение цикла размножения: процесс сокращает цикл размножения древесных видов и, следовательно, увеличивает прорастание гибридных эмбрионов;

– использование трансгенных веществ: развитие соматического эмбриогенеза может привести к использованию трансгенных веществ против различных биотических и абиотических стрессов;

– обеспечение материалом – важный источник для анализа молекулярных и биохимических изменений, которые происходят во время индукции и созревания эмбриона.

Несмотря на то, что соматический эмбриогенез установлен у нескольких видов растений, остается еще много проблем, которые необходимо решить. Основная проблема соматического эмбриогенеза – большое количество аномальных зародышей, которые не могут ни прорасти, ни превратиться в нормальные растения. Аномалии соматических эмбрионов могут быть вызваны генетическими или эпигенетическими изменениями в ДНК.

На эти изменения в ДНК могут влиять внешние факторы, такие как использование регуляторов роста растений и мутагенных веществ или

стрессовые факторы, воздействующие на растительную ткань, такие как высокие и низкие температуры, засуха, засоление и тяжелые металлы. Аномалии, вызванные генетическими изменениями в ДНК, труднообратимы, однако аномалии, вызванные эпигенетическими изменениями, могут быть реорганизованы, и аномальные эмбрионы, полученные в результате данных изменений, в большинстве случаев способны производить нормальные растения [15].

Имеются многочисленные исследования, которые показывают, что регенерация из каллуса или клеточных суспензий может привести к генетическим изменениям в регенерированных растениях. Поэтому во многих источниках отмечается важность проведения дополнительных исследований для выяснения молекулярной основы генетических изменений, которые происходят во время искусственного культивирования клеток.

*Сомаклональная изменчивость.* Сомаклональная изменчивость возникает в результате генетической гетерогенности (изменения числа и / или структуры хромосом) в культурах тканей растений, что может быть связано с генетическими нарушениями или спонтанными мутациями из-за условий культивирования. Микроклональное размножение растений может генерировать сомаклональные изменения в результате мутации генов или изменений эпигенетических меток. Сомаклональные вариации часто встречаются у растений, регенерированных из каллуса. Вариации могут быть генотипическими или фенотипическими, которые в последнем случае могут иметь генетическое или эпигенетическое происхождение [16, 17].

Сомаклональные вариации могут стать серьезной проблемой в любой программе микроразмножения, где крайне необходимо производить натуральный растительный материал. Однако, с другой стороны, сомаклональ-

ные вариации предоставили селекционерам новый, альтернативный инструмент для получения генетической изменчивости садовых культур, которые либо имеют узкую генетическую базу, либо их трудно разводить.

Имеется ряд исследований, в которых рассматриваются источники вариаций, индуцированных во время цикла культивирования тканей, а также стратегии для установления и подтверждения генетической верности различных клонов, выращенных *in vitro*, и потенциальное применение вариантов для улучшения садовых культур.

Признаки соматклональной изменчивости у некоторых сельскохозяйственных культур стимулировали интерес к применению этого метода для их улучшения. В настоящее время имеется ряд случаев, когда соматклональные изменения вызвали полезные для сельского хозяйства изменения в потомстве, например, увеличение выхода сахара в сахарном тростнике и его устойчивость к появлению пятнистости на глазках, а также устойчивость картофеля к фитофторозу, устойчивость томатов к фузариозу [17].

Соматклональная изменчивость, приводящая к дополнительной генетической изменчивости, имеет основное вероятное преимущество по улучшению качества сельскохозяйственных культур. Характеристики, по которым соматклональные мутанты могут быть усовершенствованы во время культивирования *in vitro*, включают устойчивость к различным токсинам болезней, гербицидам, высоким концентрациям солей и минеральной токсичности, толерантность к экологическому или химическому стрессу, а также к повышенной продукции вторичных метаболитов. Соматклональная изменчивость также подходит для разведения древесных пород [1, 2, 18].

Однако, использование соматклонов в селекции имеет как преимущества, так и недостатки. Соматклональные вариации иногда приводят к потере сортовых признаков и к не всегда стабильному наследованию признаков,



для изучения которых требуются расширенные полевые испытания. Данный способ не подходит для сложных агрономических признаков, таких как урожайность, качество и так далее [19, 20].

Таким образом, многими авторами на различных видах растений показано, что культивирование тканей *in vitro* повышает изменчивость по агрономическим признакам. Однако варианты с улучшенными показателями встречаются среди соматклонов сравнительно редко. Поэтому целесообразно отбор желаемых вариантов проводить также в культуре *in vitro* [21].

*Отбор in vitro.* Сегодня одной из наиболее интенсивно изучаемых областей культуры тканей является концепция отбора растений, устойчивых к болезням, вредителям или стрессам посредством культивирования тканей. Значительный выигрыш в приспособляемости многих видов был получен путем отбора и размножения более совершенных форм, поэтому поиск этих превосходных особей может быть значительно ускорен с использованием систем *in vitro*. Такие системы могут пытаться использовать естественную изменчивость, которая встречается у растений, или изменчивость вызванную химическими или физическими агентами, которые, как известно, вызывают мутации.

Селекция *in vitro* обычно включает в себя воздействие на популяцию клеток подходящего давления отбора и извлечение любых вариантных линий, которые развили устойчивость или толерантность к стрессу. Целью исследований является реорганизация целых растений из таких устойчивых клеточных линий. Этот подход предполагает, что толерантность, действующая на неорганизованном клеточном уровне, может действовать с некоторой степенью эффективности на всем растении. Если толерантность имеет генетическую основу, то признак может передаваться другим растениям. Текущие разработки в этой области охватывают множество направлений,

включая попытки выбора солеустойчивых линий, устойчивых к замораживанию растений, устойчивых к гербицидам агрономических культур и различной устойчивости к химическим элементам, таким как тяжелые металлы (алюминий, марганец и т. д.) [22].

*Культура протопластов и соматическая гибридизация.* Технология протопластов – полезный инструмент для получения новых генотипов растений посредством соматической гибридизации. Эта технология включает выделение, слияние и культивирование протопластов [23]. Протопласты – это содержимое клеток с плазматической мембраной, которые были отделены от своих клеточных стенок путем ферментативной обработки. Один лист, обработанный в этих условиях, может дать миллионы отдельных клеток, каждая из которых теоретически способна производить целое растение. Наблюдение, которое послужило толчком для большинства подобных исследований, заключается в следующем: содержимое клеток, лишенных клеточных стенок, находится в тесном контакте и имеет тенденцию сливаться друг с другом [24].

Исследования в этой области обещают оказать огромное влияние на разнообразие существующих растений, поскольку соматическая гибридизация не подвержена проблемам несовместимости, которые ограничивают традиционные стратегии селекции растений, появляется возможность слияния растительных клеток из видов, которые могут быть несовместимы, половые скрещивания через культуру тканей расширяют сферу модификаций растений до пределов воображения.

Потенциальное использование соматической гибридизации для создания новых комбинаций генетического материала было продемонстрировано на родах *Petunia* и *Nicotiana* [25]. Но, несмотря на успех регенерации протопластов, у некоторых видов [26, 27] все еще существуют проблемы в про-

цессе выделения протопластов с целью регенерации побегов для многих видов растений. В то же время известен ряд недостатков соматической гибридизации: соматическая гибридизация не гарантирует, что растения будут давать плодородные и видимые семена; существует генетическая нестабильность, связанная с культурой протопластов; некоторые методы селекции гибридов неэффективны, что накладывает ограничения на выбор гибридов. Соматическая гибридизация подходит для гаплоидных протопластов, поскольку слияние двух диплоидов приводит к образованию амфидиплоида, что неблагоприятно. Соматическая гибридизация не гарантирует успешного проявления определенного признака по многим причинам: соматональные вариации, хромосомная элиминация, сегрегация органелл и так далее. Регенерированные растения, полученные в результате соматической гибридизации, иногда обнаруживают вариации, кроме того, слияние протопластов между разновидностями видов / родов может происходить легко, но получение жизнеспособных соматических гибридов не всегда возможно [25-28].

**Заключение.** Методы биотехнологии имеют большие преимущества в индустрии питомниководства, перспективы которых в сельскохозяйственном мире огромны. Микроразмножение во многих отношениях благоприятно для традиционных методов селекции сельскохозяйственных культур, первое из которых заключается в том, что оно позволяет вырастить огромное количество растений за очень короткий период времени. Культура тканей растений выгодна для производителей, поскольку подавляющее количество растений может быть получено с использованием ткани, взятой с единственного родительского растения – растения, которое само остается невредимым в процессе сбора ткани. Производство сельскохозяйственных культур посредством микроразмножения исключает возможность прерывания вегетационного периода, так как его можно проводить в тщательно регулируемой среде теплицы в течение всего года.

Использование биотехнологических методов в питомниководстве позволит производить растительный материал, способный противостоять определенным стрессам окружающей среды, обладающий повышенной солеустойчивостью (для выращивания в районах с высокой засоленностью почв), устойчивый к различным вирусным инфекционным, бактериальным и грибковым заболеваниям, а также растений способных выдерживать отрицательные температуры, и сельскохозяйственные культуры, устойчивые к насекомым вредителям. Таким образом, биотехнология растений имеет большое значение в улучшении методов производства посадочного материала хорошего качества.

### Литература

1. Singh A. Micropropagation of Plants. In: Bahadur B., Venkat Rajam M., Sahijram L., Krishnamurthy K. Plant Biology and Biotechnology. Springer, New Delhi. 2015. pp 329-346. DOI 10.1007/978-81-322-2283-5. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5> 16.
2. Herdt, Robert W. Biotechnology in Agriculture, Annual Review of Environment and Resources. 2006. V.31. 1. pp.265-295. DOI:10.1146/annurev.energy.31.031405.091314, <https://doi.org/10.1146/annurev.energy.31.031405.091314>.
3. Электронный ресурс: <https://www.plantcelltechnology.com/blog/what-is-suspension-culture/> (дата обращения: 14.03.2021).
4. Wiczorek A. Use of biotechnology in agriculture-benefits and risks. Honolulu (HI): University of Hawaii (Biotechnology; BIO-3). 2003. P. 6.
5. Álvarez S.P., Ardisana E.F.H., Leal R.P. Plant Biotechnology for Agricultural Sustainability. In: Kumar S., Meena R.S., Jhariya M.K. (eds) Resources Use Efficiency in Agriculture. Springer, Singapore. 2020. pp 389-425. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-6953-1> 12.
6. Singh A.K., Abhilash P.C., Sarma B.K., Tripathi V.K. and Parewa H.P. “Handbook of Agriculture, Environment and Biotechnology” Published by Association of Agriculture, Environment and Biotechnology, New Delhi, India, 2021.
7. Bhatia S., Sharma K. Micropropagation. Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences, Academic Press. 2015. P. 361-368.
8. Chu I.Y.E. Perspective of Micropropagation Industry. Transplant Production Systems. Springer, Dordrecht. 1992. P. 137-150. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-2785-1> 8.
9. Akin-Idowu P. E., Ibitoye D. O., Ademoyegun O. T. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops // African Journal of Biotechnology. 2009. Vol. 8 (16). P. 3782-3788.
10. Hussain Altaf & Ahmed, Iqbal & Nazir, Hummera & Ullah, Ikram. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. 2012. DOI: 10.5772/50568.
11. Электронный ресурс: <http://nationalcleanplantnetwork.org> (дата обращения: 14.03.2021).

12. Карпушина М.В., Супрун И.И. Методы и подходы к элиминации вирусов в условиях *in vitro* и *in vivo* [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2020. № 63(3). С. 254269. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/20/03/19.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2020-3-63-254-269 (дата обращения: 12.08.2021).
13. Panattoni A, Luvisi A, Triolo E. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress // Span J Agri Res. 2013. V. 11. P. 173-88.
14. Kamle, Madhu & Bajpai, Anju & Chandra, Ramesh & Kalim, Shahina. Somatic embryogenesis for crop improvement // GERF Bulletin of Biosciences. 2. 2011. V. 2(1). P. 54-59.
15. Garcia C., Furtado de Almeida, AA., Costa, M. et al. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2019. V. 137. P. 193-212. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>.
16. Anil, Veena & Lobo, Savitha & Bennur, Spurti. Somaclonal variations for crop improvement: Selection for disease resistant variants *in vitro* // Plant Science Today. 5. 10.14719/pst.2018.5.2.382. (2018).
17. Leal M.R., Maribona R.H., Ruiz A., Korneva, S. Canales, E. Dinkova, T.D. Izquierdo, F. Goto O. and Rizo, D. Somaclonal variation as a source of resistance to eye-spot disease of sugarcane // Plant Breeding. 1996. V. 115. P. 37-42. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1996.tb00868.x>.
18. Miguel C; Marum, L. "An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond" // J Exp Bot. 2011. V.62 (11). PP. 3713–25. DOI: 10.1093/jxb/err155. PMID 21617249.
19. Krishna H., Alizadeh M., Singh D., Singh U., Chauhan N. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. 3 Biotech. 2016. V. 6. P. 54. DOI 10.1007/s13205-016-0389-7.
20. Ahloowalia B.S. Limitations to the Use of Somaclonal Variation in Crop Improvement. In: Somaclonal Variations and Crop Improvement. Advances in Agricultural Biotechnology. 2011. Vol. 20. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-015-7733-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-015-7733-5_3).
21. Rao S., Sandhya H. *In Vitro* Selection of Disease-Resistant Plants. In: Anis M., Ahmad N. (eds) Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement. Springer, Singapore. 2016. P. 395-417. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-1917-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-981-10-1917-3_17).
22. Srinath Rao, H. Sandhya. *In Vitro* Selection of Disease-Resistant Plants // Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement. 2016. ISBN : 978-981-10-1916-6.
23. Pati P.K., Sharma M., Ahuja P.S. Rose protoplast isolation and culture and heterokaryon selection by immobilization in extra thin alginate film Protoplasma. 2008. V. 233, P. 165-171.
24. Lynch P.T., Davey M.R., Power J.B. Plant protoplast fusion and somatic hybridization // Methods in Enzymology, Academic Press. 1993. V. 221. P. 379-393. ISSN 0076-6879, ISBN 9780121821227.
25. Pental D., Hamill J.D., Pirrie A. et al. Somatic hybridization of *Nicotiana tabacum* and *Petunia* hybrid // Molec. Gen. Genet. 1986. V. 202. P. 342–347. <https://doi.org/10.1007/BF00333260>.
26. Naing A. H., Adedeji O. S., Kim C.K. Protoplast technology in ornamental plants: Current progress and potential applications on genetic improvement // Scientia Horticulturae. 2021. V. 283. P. 110043, ISSN 0304-4238.

27. Naing, Aung Htay & Adedeji, Suleimon & Kim, Chang. Protoplast isolation and shoot regeneration from protoplast-derived calli of *Chrysanthemum* cv. White ND. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2020. V. 141. DOI:10.1007/s11240-020-01816-3.

28. Kang H.H., Naing A.H., Kim C.K. Protoplast Isolation and Shoot Regeneration from Protoplast-Derived Callus of *Petunia hybrida* Cv. *Mirage Rose*. *Biology (Basel)*. 2020. V. 9 (8). P. 228. DOI: 10.3390/biology9080228.

### References

1. Singh A. Micropropagation of Plants. In: Bahadur B., Venkat Rajam M., Sahijram L., Krishnamurthy K. *Plant Biology and Biotechnology*. Springer, New Delhi. 2015. pp 329-346. DOI 10.1007/978-81-322-2283-5. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5\\_16](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_16)

2. Herdt, Robert W. *Biotechnology in Agriculture, Annual Review of Environment and Resources*. 2006. V.31. 1. pp.265-295. DOI: 10.1146/annurev.energy.31.031405.091314, <https://doi.org/10.1146/annurev.energy.31.031405.091314>.

3. Elektronnyj resurs: <https://www.plantcelltechnology.com/blog/what-is-suspension-culture/> (data obrashcheniya: 14.03.2021).

4. Wieczorek A. Use of biotechnology in agriculture-benefits and risks. Honolulu (HI): University of Hawaii (Biotechnology; BIO-3). 2003. P. 6.

5. Álvarez S.P., Ardisana E.F.H., Leal R.P. *Plant Biotechnology for Agricultural Sustainability*. In: Kumar S., Meena R.S., Jhariya M.K. (eds) *Resources Use Efficiency in Agriculture*. Springer, Singapore. 2020. pp 389-425. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-6953-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-15-6953-1_12).

6. Singh A.K., Abhilash P.C., Sarma B.K., Tripathi V.K. and Parewa H.P. "Handbook of Agriculture, Environment and Biotechnology" Published by Association of Agriculture, Environment and Biotechnology, New Delhi, India, 2021.

7. Bhatia S., Sharma K. *Micropropagation. Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, Academic Press. 2015. P. 361-368.

8. Chu I.Y.E. *Perspective of Micropropagation Industry. Transplant Production Systems*. Springer, Dordrecht. 1992. P. 137-150. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-2785-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2785-1_8).

9. Akin-Idowu P. E., Ibitoye D. O., Ademoyegun O. T. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops // *African Journal of Biotechnology*. 2009. Vol. 8 (16). P. 3782-3788.

10. Hussain Altaf & Ahmed, Iqbal & Nazir, Hummera & Ullah, Ikram. *Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities*. 2012. DOI: 10.5772/50568.

11. Elektronnyj resurs: <http://nationalcleanplantnetwork.org> (data obrashcheniya: 14.03.2021).

12. Karpushina M.V., Suprun I.I. *Metody i podhody k eliminacii virusov v usloviyah in vitro i in vivo [Elektronnyj resurs] // Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii*. 2020. № 63(3). S. 254269. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/20/03/19.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2020-3-63-254-269 (data obrashcheniya: 12.08.2021).

13. Panattoni A, Luvisi A, Triolo E. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress // *Span J Agri Res*. 2013. V. 11. P. 173-88.

14. Kamle, Madhu & Bajpai, Anju & Chandra, Ramesh & Kalim, Shahina. Somatic embryogenesis for crop improvement // *GERF Bulletin of Biosciences*. 2. 2011. V. 2(1). P. 54-59.

15. Garcia C., Furtado de Almeida, AA., Costa, M. et al. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview // *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2019. V. 137. P. 193-212. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>.

16. Anil, Veena & Lobo, Savitha & Bennur, Spurti. Somaclonal variations for crop improvement: Selection for disease resistant variants *in vitro* // Plant Science Today. 5. 10.14719/pst.2018.5.2.382. (2018).
17. Leal M.R., Maribona R.H., Ruiz A., Korneva, S. Canales, E. Dinkova, T.D. Izquierdo, F. Goto O. and Rizo, D. Somaclonal variation as a source of resistance to eye-spot disease of sugarcane // Plant Breeding. 1996. V. 115. P. 37-42. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1996.tb00868.x>.
18. Miguel C; Marum, L. "An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond" // J Exp Bot. 2011. V.62 (11). PP. 3713–25. DOI: 10.1093/jxb/err155. PMID 21617249.
19. Krishna H., Alizadeh M., Singh D., Singh U., Chauhan N. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. 3 Biotech. 2016. V. 6. P. 54. DOI 10.1007/s13205-016-0389-7.
20. Ahloowalia B.S. Limitations to the Use of Somaclonal Variation in Crop Improvement. In: Somaclonal Variations and Crop Improvement. Advances in Agricultural Biotechnology. 2011. Vol. 20. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-015-7733-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-015-7733-5_3).
21. Rao S., Sandhya H. *In Vitro* Selection of Disease-Resistant Plants. In: Anis M., Ahmad N. (eds) Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement. Springer, Singapore. 2016. P. 395-417. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-1917-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-981-10-1917-3_17).
22. Srinath Rao, H. Sandhya. *In Vitro* Selection of Disease-Resistant Plants // Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement. 2016. ISBN : 978-981-10-1916-6.
23. Pati P.K., Sharma M., Ahuja P.S. Rose protoplast isolation and culture and heterokaryon selection by immobilization in extra thin alginate film Protoplasma. 2008. V. 233, P. 165-171.
24. Lynch P.T., Davey M.R., Power J.B. Plant protoplast fusion and somatic hybridization // Methods in Enzymology, Academic Press. 1993. V. 221. P. 379-393. ISSN 0076-6879, ISBN 9780121821227.
25. Pental D., Hamill J.D., Pirrie A. et al. Somatic hybridization of *Nicotiana tabacum* and *Petunia* hybrid // Molec. Gen. Genet. 1986. V. 202. P. 342–347. <https://doi.org/10.1007/BF00333260>.
26. Naing A. H., Adedeji O. S., Kim C.K. Protoplast technology in ornamental plants: Current progress and potential applications on genetic improvement // Scientia Horticulturae. 2021. V. 283. P. 110043, ISSN 0304-4238.
27. Naing, Aung Htay & Adedeji, Suleimon & Kim, Chang. Protoplast isolation and shoot regeneration from protoplast-derived calli of *Chrysanthemum* cv. White ND. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2020. V. 141. DOI:10.1007/s11240-020-01816-3.
28. Kang H.H., Naing A.H., Kim C.K. Protoplast Isolation and Shoot Regeneration from Protoplast-Derived Callus of *Petunia hybrida* Cv. *Mirage Rose*. Biology (Basel). 2020. V. 9 (8). P. 228. DOI: 10.3390/biology9080228.