

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Алтайский государственный университет»  
Институт биологии и биотехнологии  
Кафедра зоологии и физиологии

**ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА РЕГЕНЕРАЦИОННУЮ  
СПОСОБНОСТЬ И СОМАКЛОНАЛЬНУЮ ИЗМЕНЧИВОСТЬ  
СОМАТИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ ВИШНИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

выпускная квалификационная работа  
(магистерская диссертация)

Выполнила: студент  
2 курса, группы 782М  
Солохина Арина Александровна



Научные руководители:  
канд. с.-х. наук, доцент  
Бородулина Ирина Дмитриевна

канд. с.-х. наук, в.н.с. ФГБНУ  
ФАНЦА  
Плаксина Татьяна Викторовна

Допустить к защите:  
зав. кафедрой Соколова Г.Г.

Выпускная квалификационная  
работа защищена

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Оценка \_\_\_\_\_

Председатель ГЭК  
Мочалова О.В.

Барнаул 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	3
<b>ГЛАВА 1. МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ</b> .....	5
1.1. Органо- и гистогенез, соматический эмбриоидогенез.....	6
1.2. Факторы, влияющие на морфогенез <i>in vitro</i> .....	12
1.3 Клеточные деления и соматическая изменчивость.....	21
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ</b> .....	25
2.1. Материалы исследований.....	25
2.2. Методы исследований.....	28
<b>ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА РЕГЕНЕРАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ И СОМАКЛОНАЛЬНУЮ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СОМАТИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ ВИШНИ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i></b> .....	38
3.1. Индукция каллусогенеза из листовых эксплантов.....	38
3.2 Влияние регуляторов роста на прямую регенерацию соматических тканей в культуре <i>in vitro</i> .....	43
3.3 Наличие и степень выраженности соматической изменчивости вишни <i>in vitro</i> и <i>ex vitro</i> .....	48
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	55
<b>БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК</b> .....	56
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ</b> .....	63

## ВВЕДЕНИЕ

Значительное место в разработке приоритетных направлений науки XXI в. занимает метод культуры растительных клеток, тканей и органов, позволяющий наиболее полно реализовать морфологический потенциал растительного организма к размножению. Реализация способности растительной клетки к регенерации целого растения имеет значение в решении ряда практических проблем садоводства. Методы культуры клеток и тканей открывают путь для новых нетрадиционных способов получения новых форм плодовых растений с комплексом хозяйственно-ценных признаков в значительно более короткие сроки по сравнению с традиционными способами. К преимуществам этих методов относят: получение гибридных семян из зародышей ранних форм развития при отдаленной гибридизации; получение соматоклональных вариантов и соматических гибридов; манипуляция с пloidностью для получения организмов с измененным числом хромосом; длительное сохранение материала в условиях *in vitro*; получение вегетативного потомства у трудноразмножаемых форм; быстрое размножение ценных клонов; возможность работы в течение всего года и планирование выпуска материала к определенному сроку (Медведева, Бунцевич, Мохно, 2012).

При культивировании изолированных тканей, клеток и органов *in vitro* можно самостоятельно выбрать подходящие условия среды: поэкспериментировать с регуляторами роста, внести в среду различные стресс-факторы, чтобы пронаблюдать устойчивость экспланта; установить

оптимальные абиотические факторы и др. (Ильина, 2011; Калашникова, 2012).

Культивирование *in vitro* порой связано с появлением соматоклональных изменений, среди которых выделяют три основные категории: генетические изменения (хромосомные и генные мутации, изменения ploидности); фенотипические изменения (затрагивают морфологические и анатомические характеристики) и онтогенетические изменения, которые возникают в силу дезорганизации слоёв ткани в химерных растениях или спонтанного смешения клеток или групп клеток при инициации адвентивных побегов из различных слоёв ткани.

Частота появления подобных изменений зависит от типа изменений и от вида растений. При ускоренном размножении соматоклональная изменчивость может вызвать утрату хозяйственно значимых сортовых признаков. Однако она не всегда носит негативный характер, и на её основе в процессе тканевой селекции удаётся получать растения с хозяйственно ценными свойствами. Кроме того, изучение соматоклональной изменчивости позволяет расширить представления о закономерностях проявления этого феномена и, возможно, приблизиться к пониманию его механизма (Жбанова, Соловых, 2012).

Для многих плодово-ягодных растений, в том числе и вишни морфогенез в культуре тканей остается открытым вопросом, так как для каждой культуры требуются определенные условия культивирования. Методы биотехнологии позволяют ускорить селекционный процесс для создания новых форм. Регенерация растений через процесс каллусообразования может

способствовать приобретению улучшенных качеств, а регенерация без стадии каллуса ускорит процесс микроразмножения.

**Целью работы** являлось изучение влияния регуляторов роста на регенерационную способность и соматическую изменчивость соматических тканей вишни.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить влияние регуляторов роста на регенерацию листовых эксплантов вишни элитной формы 3-11-20 и сорта Памяти Левандовского.
2. Изучить уровень соматической изменчивости соматических тканей элитной формы вишни 3-11-20 в условиях *in vitro*.

## ГЛАВА 1. МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Дедифференциация – это одна из трех возможных стадий процесса регенерации; во время этой фазы клетки становятся способными к ответу на органогенные или эмбриогенные стимулы. Дедифференцированные клетки могут пойти по двум путям развития – прямой и непрямой регенерации. Прямая регенерация – органогенез, минуя стадию образования каллуса, а непрямая регенерация – это формирование органов через каллус (Муратова и др., 2011).

Клетки, находящиеся в стадии дедифференциации называют «компетентными». Они теряют свои прежние свойства, утрачивают хлорофилл, и запасные органические вещества (белки, крахмал, липиды), но возрастает количество амилопластов, разрушается аппарат Гольджи, а также происходит перестройка эндоплазматического ретикулума и элементов цитоскелета. Клетки начинают синтез РНК и ДНК, а также экспрессию генов белков, свойственных клеткам каллуса (Бутенко, 1999).

Каллусная ткань может быть разной консистенции, но она аморфна и не имеет определенной анатомической структуры. Это зависит от условий культивирования и происхождения экспланта. По классификации Р.Г. Бутенко (1999), существуют три типа каллусной ткани:

- 1) рыхлая, состоящая из сильно обводнённых клеток, распадающихся на отдельные мелкие агрегаты;
- 2) средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами;

3) плотная, в которой дифференцируются элементы камбия и проводящей системы.

Р.Г. Бутенко (1999) указывала на перспективность получения соматоклональных вариантов путем культивирования растительных клеток *in vitro* из-за последующей уникальности их свойств. П.Н. Харченко, В.И. Глазко (2006) в своей работе отмечают, что механизм соматоклональной изменчивости, по большей мере, зависит от двух факторов. Первый фактор заключается в прохождении культуры клеток через дезорганизованную фазу роста (например, каллус) для появления в дальнейшем вариантов растений, отличных от исходных. А второй – в том, что частота и степень изменчивости генотипа регенерирующего растения пропорциональна времени пребывания его в неорганизованной фазе роста.

Благодаря соматоклональной изменчивости можно получать улучшенные растения без использования методов традиционной селекции, не прибегая к переносу чужеродных геномов. Соматоклоны обладают измененной структурой хромосом, генов и генома (Расторгуев, 2008).

Задача стадии дедифференциации состоит в образовании самого каллуса как такового и каллуса, способного с высокой вероятностью образовывать качественные регенеранты. А это в большей степени определяется условиями культивирования (Высоцкий, Упадышев, 2015).

### **1.1. Органо- и гистогенез, соматический эмбриогенез (эмбриоидогенез)**

Органогенез заключается в появлении и росте адвентивных побегов, т.е. побегов, индуцированных из любых тканей растения, за исключением эмбриональной. Другими словами, органогенез – это дифференциация каллусных клеток в целые органы; превращение их в апексы стеблей или корней, флоральные элементы. Органогенез подразделяется на геммогенез – образование почек, и ризогенез – образование корней.

При формировании каллуса процесс развития органов содержит 2 фазы:

1) переход недифференцированной растущей ткани к образованию регенерационной меристемы и закладке точек роста (на этой фазе осуществляется предопределение пути развития (геммогенез или ризогенез) и дифференциация зачатков органов);

2) переход возникших почек и корней к активному росту.

Индуцировать органогенез можно из различных тканей растения, но регенерация из корней обычно затруднена. В работе С.А. Муратовой, Н.В. Соловых, В.И. Тереховой (2011) показано, что в реализации программы стеблевого морфогенеза участвуют не все, а только определенный тип клеток. Обычно, в случае эксплантов стеблевого происхождения компетентными к действию экзогенных гормонов являются эпидермальные и субэпидермальные клетки. Адвентивные корни часто формируются из тканей стебля. Адвентивные побеги и корни сформированные из одного органа, появляются из различных тканей.

Клетку, помещённую в условия *in vitro*, можно направить по пути соматического эмбриогенеза или органогенеза, тем самым реализуя её



тотипотентность. О путях развития можно говорить в зависимости от выбранных регуляторов роста и их концентраций, а также генотипа, вида и возраста растения.

Говоря о возрасте растения, большой научный и практический интерес представляет изучение морфогенетических потенциалов органов и тканей взрослого растения в условиях *in vitro* (Муратова и др., 2011; Иванова, Тимофеева, 2014). Молодые ткани отличаются большим морфогенетическим потенциалом. Известно, что работа со старым материалом затрудняется тем, что постепенно в тканях и органах растений происходят процессы, приводящие к ингибированию роста и регенерационной способности: часто полученные микропобеги характеризуются медленным ростом, низкой способностью к укоренению и адаптации. Так, в работе Н.Н. Ивановой, И.В. Митрофановой (2014) описана индукция органогенеза из молодых побегов фейхоа, которые были получены путем введения в культуру *in vitro* вегетативных почек 30–40-летнего возраста. Это позволило снизить уровень контаминации (появления несвойственных морфологических и генетических изменений) до 20 %. Для индукции морфогенеза в этой работе в среду Мурасиге-Скуга (МС) вводили тидиазурон (ТДЗ). Это соединение фенилмочевины, оно является эффективным биорегулятором, который проявляет цитокининовую активность в различных системах, включая и органогенез из различных эксплантов для целого ряда растений. Применение ТДЗ позволяет не только размножать растения, но и изучать процессы морфогенеза, которые индуцируются в клетках экспланта. ТДЗ способствовал органогенезу из листовых эксплантов без образования

промежуточной стадии – каллуса. Это обеспечило генетическую стабильность образованным побегам.

T. Ara, M.R. Karim (2012) индуцировали регенерацию побегов через образование каллусной ткани. В качестве эксплантов брали зрелые листья клубники (*Fragaria × ananassa* Duch.). Для образования первичного каллуса в среду МС вводили регуляторы роста: 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л 6-БАП. При таком соотношении ауксина и цитокинина каллус образовывался с наибольшей частотой. Далее для регенерации побегов были использованы регуляторы роста: 2 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л НУК. Это было наилучшее сочетание для регенерации. Из первичного каллуса образовывались молодые побеги.

Детальное изучение этапов органогенеза у самых разных растений позволяет проследить рост и развитие растений, изучать потребности растений к условиям внешней среды на разных стадиях органогенеза. Культивирование в условиях *in vitro* позволяет более полно и точно оценивать селекционный материал. При культивировании каллусных культур достаточно часто наблюдается процесс, при котором дифференциация заканчивается на уровне тканевой организации, и вызвать другие формы морфогенеза не удается. В таком случае процесс развития тканей – гистогенез является независимым и самостоятельным, и представляет собой один из путей морфогенеза. Гистогенез (гистологическая дифференцировка) – образование в каллусе различных тканей (млечников, волокон; элементов сосудистой системы – трахеи и трахеиды ксилемы, ситовидные трубки и клетки-спутницы флоэмы).

Главную роль в преобразовании каллусных клеток в сосудистые элементы играют фитогормоны, в основном ауксины. Опыты по влиянию апикальной меристемы побега (место синтеза ауксинов) на гистогенез в каллусной ткани показали, что ниже места прививки апекса в каллусной ткани начинали образовываться сосудистые элементы. Тот же эффект наблюдался при нанесении на каллус ауксина с сахарозой. Интересно, что повышение концентрации сахарозы способствует образованию флоэмных элементов, а понижение – образованию элементов ксилемы. Причем такое действие оказывает совместно с ауксином только сахароза, что позволяет говорить о ее регуляторной роли. Добавление к гормону других сахаров гистогенеза не вызывало. В некоторых случаях стимуляторами гистогенеза помимо ауксинов могут быть и другие фитогормоны (Тимофеева, Румянцева, 2012). В исследованиях Л.Л. Попковой и Л.М. Теплицкой (2009) при индукции морфогенеза из длительно культивируемого каллуса боярышника Поярковой на среде по прописи Мурасиге и Скуга, дополненной 2,4-Д в концентрации 1,0 мг/л и 6-БАП в концентрации 0,1 мг/л, происходит активное образование первичного и вторичного каллуса. Культивируемые на ней клетки обладают высокими показателями активности, способны к образованию элементов проводящей системы. Ксилемогенез и флоэмогенез *in vitro* позволяют изучать биохимию процессов морфогенеза. Можно изучать общие и специфические индукторы и маркеры ксилемогенеза и флоэмогенеза, начиная с деления клетки и заканчивая образованием сосудов ксилемы или флоэмы.

После процесса дедифференциации следует процесс индукции (De Klerk et al., 1997). Процесс индукции можно назвать также процессом дифференциации. Во время дифференциации клетки отвечают на органогенные стимулы и приобретают специфику клеток определенного органа. Одним из основных путей дифференциации каллусных тканей выступает соматический эмбриогенез, или эмбриоидогенез.

Соматический эмбриогенез – процесс формирования зародышеподобных структур из соматических (неполовых) клеток. Соматический зародыш – независимая двухполюсная структура, физически не прикрепленная к ткани, дающая начало впоследствии апексам стебля и корня. Первое описание соматического эмбриогенеза было проведено Стюардом в 1957 г. (Бутенко, 1999). Он определил глобулярные, сердцевидные, торпедовидные стадии развития соматического зародыша в культуре каллусных клеток моркови.

В настоящее время также выделяют три стадии развития соматического зародыша: глобулярная; сердцевидная; торпедовидная. В конечном итоге развивается проросток.

В качестве источника соматических клеток для индукции соматического эмбриогенеза у плодово-ягодных и других культур используют зрелые и незрелые зародыши (Третьякова, Ижболдина, 2008) и их отдельные органы (семядоли и гипокотиль), сегменты вегетативных побегов зрелых деревьев (Третьякова, Ижболдина, 2008; Митрофанова, 2009). Зародыши, которые развиваются в результате соматического

эмбриогенеза, могут легко выделяться из ткани. Разрушающиеся каллусные клетки образуют полости, в которых они свободно лежат.

Развитие соматических зародышей очень пластично и подвержено влиянию таких факторов как генотип растения – донора и его физиологическое состояние, тип исходного эксплантата, степень его целостности, время отбора. Различные культуры и генотипы исследуемых видов имеют очень широкий спектр морфогенетических реакций по отношению к условиям культивирования. Основными индукторами дифференциации соматических эмбриоидов и дальнейшей регенерации растений из них являются специфически необходимые регуляторы роста растений, осмотически активные вещества, консистенция и pH среды, интенсивность освещения, фотопериод, влажность и температура (Митрофанова, 2009).

Индукцию соматического эмбриогенеза у сортов вишни (*Prunus cerasus* L.) наблюдали при культивировании эксплантов на среде Мурасиге-Скуга, дополненной различными комбинациями ауксинов и цитокининов (Tang et al., 2000). Соматический эмбриогенез в основном происходил, когда использовали комбинации регуляторов роста 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) и кинетина. Индукция соматического эмбриогенеза также отмечена при добавлении 0,1 мг/л ИМК (3-индолилмасляная кислота) в индуктивную среду. Использование НУК (*α*-нафтилуксусная кислота) или 6-БАП (6-бензиламинопурин) уменьшало индукцию соматического эмбриогенеза и увеличивало частоту непрямо́й регенерации у сортов вишни (*Prunus cerasus* L.).

Использование соматических зародышей в качестве синтетических или «искусственных» семян в настоящее время является альтернативой для большинства вегетативно размножающихся растений. Качество искусственных семян зависит от типа и концентрации регуляторов роста, состава, минеральных солей и неразрывно связано с физическими факторами возделывания.

Кроме того, соматический эмбриогенез имеет преимущество в сравнении с органогенезом, так как регенерант на основе соматического зародыша полностью сформирован, тогда как побеги, полученные в результате органогенеза нужно укоренять, а лишний труд неэкономичен для биотехнологии. К тому же эмбриониды, в отличие от адвентивных побегов, более точно воспроизводят генетическую информацию растения.

Таким образом, процесс морфогенеза *in vitro* зависит от факторов, которые можно разделить на внутренние (генотип растения, тип экспланта) и внешние (состав питательной среды и физические условия культивирования).

## **1.2. Факторы, определяющие морфогенез *in vitro***

Успешный морфогенез – это верный выбор первичного экспланта и его правильная подготовка перед культивированием в условиях *in vitro*.

В качестве экспланта могут быть использованы различные части растения – листья, стебли, корни, части цветка, пыльники, семядоли, зародыши, гипокотили. Для плодово-ягодных культур соматические ткани обладают преимуществом, так как при регенерации из них растения

сохраняют генетическую информацию, присущую данному сорту. Частота наивысшей регенерации зависит не только от выбора экспланта, но и от комбинации фитогормонов, вносимых в питательную среду. Но даже для родственных генотипов оптимальные условия для регенерации могут варьировать (Liu, Pijut, 2008; Sugiura et al., 2008; Ильина, 2011; Муратова и др., 2011; Бунцев и др., 2014).

Для достижения максимального результата необходимо выбирать экспланты, обладающие наивысшим морфогенетическим потенциалом. Одними из лучших обладателей морфогенетического потенциала являются молодые листья. Именно они чаще всего используются в качестве первичного экспланта, а также их культивирование наиболее удобно (Liu, Pijut, 2008; Соловых, Муратова, 2010; Муратова и др., 2011; Karim et al., 2011; Бунцев и др., 2014; Ван-Ункан, 2014). Это объясняется тем, что лист является самодифференцирующимся органом и представляет хороший объект для изучения морфогенеза растений в целом.

В исследованиях С.А. Муратовой, Н.В. Соловых, В.И. Тереховой (2011) продемонстрировано влияние вида экспланта на образование каллуса. Листовые экспланты оказались лучшими по сравнению с корневыми и стеблевыми для земляники, сливы и ежевики. Так же они экспериментировали в своей работе с высечками из различных органов растений: частей листовой пластинки, черешков, отрезков стебля и отрезков корней. В результате во всех случаях наблюдался процесс каллусообразования из листовой пластинки. При использовании в качестве экспланта отрезков корней каллус образовывался в нескольких случаях, но

не формировались почки. Из отрезков стебля каллус образовывался, но не во всех случаях, однако прослеживалась закладка почек.

Оказалось, что морфогенетический потенциал неодинаков в разных частях листа. Обычно он увеличивается от верхушки к основанию, достигая своего пика у черешка. Поэтому часто на питательную среду помещают лист, не отрезая от него черешка (Муратова и др., 2011). В этой зоне расположены наиболее активные меристематические клетки, а значит и регенерационный потенциал выше.

Известно также, что морфогенетический потенциал выше у молодых листьев и органов растений, так как они более пластичны с точки зрения способности индукции морфогенеза на искусственной питательной среде (Попов, 2011). Одной из наиболее актуальных проблем при культивировании древесно-кустарниковых растений является поликонденсация веществ фенольной природы, которая приводит к снижению показателей роста и развития культур *in vitro*. Физиологическое состояние исходного растительного материала и его возраст является одной из возможных причин этого негативного эффекта (Эрст, 2010).

Также важным является положение экспланта относительно питательной среды. В литературе нет однозначных фактов об оптимальном его положении (Тюленев, 1996; Расторгуев, 2009). Н.В. Соловых, С.А. Муратова (2010) проводили индукцию морфогенеза из соматических тканей различных сортов рода *Rubus*. По результатам выполненной работы, оказалось, что для индукции морфогенеза более эффективным является помещение листовых эксплантов адаксиальной стороной к поверхности



питательной среды. При этом по сравнению с ориентацией абаксиальной стороной к поверхности среды на 18,33 % (Блэк Сэтин) – 34,33 % (Бойзенберри) возрастает процент эксплантов, образующих каллус. Существенно возрастает также частота регенерации. С.Л. Расторгуев (2009) рекомендует укладывать эксплант на питательную среду абаксиальной стороной, говоря о некотором увеличении частоты регенерации у земляники сорта Фейерверк с 41,4 до 46,9 %. Автором отмечено, что регуляторы роста при положении экспланта абаксиальной стороной лучше и быстрее проникают в паренхимные клетки через устьица, стимулируя процессы каллусогенеза и морфогенеза. Аналогичные заключения делают и С.А. Муратова, Н.В. Соловых, В.И. Терехова (2011), которые проводили исследования по влиянию ориентации листовых эксплантов сливы и вишни на процесс каллусообразования. При помещении эксплантов абаксиальной стороной значительно понижалась интенсивность каллусообразования. Каллус образовывался в 30 % случаев и к концу первого пассажа оказывался не пригодным для дальнейшего пассирования. При помещении высечек листьев абаксиальной стороной на среду некроза листовых тканей почти не происходило, каллус образовывался на всех дисках, быстро рос и сохранял жизнеспособность; его регенерация происходила активнее.

Регенерация чаще всего индуцируется в месте среза экспланта. Некоторые экспланты вообще могут быть не чувствительными к регуляторам роста, если они не разделены на части или не повреждены. Многие исследователи рекомендуют делать надрезы на листовых пластинках или

брать высечки листьев (Ильина, 2011; Ван-Ункан, 2014; Иванова, Митрофанова, 2014).

Одним из важнейших параметров, обеспечивающих успех всей работы, является грамотно подобранный состав питательной среды. Присутствие в питательной среде гормонов оказывает значительное влияние на культивируемые растения. Работы по регулированию морфогенеза с помощью гормонов обычно основываются на закономерности, впервые установленной Ф. Скугом и С. Миллером на каллусе паренхимы стебля табака (Skoog, Miller, 1957).

В культуре ткани фитогормоны, добавленные в различных пропорциях, регулируют синтез эндогенных гормонов растений, что проявляется в разнообразных морфогенетических реакциях клеток и тканей.

По данным исследований оптимальной для большинства растений является среда Мурасиге-Скуга (Батыгина, Васильева, 2002; Liu, Rijut, 2008; Sugiura et al., 2008; Матушкина, Пронина, 2010; Ильина, 2011; Муратова и др., 2011; Бунцев и др., 2014; Расторгуев, 2014). Так, в работе Л.Л. Бунцевой, Е.Н. Бесединой, М.А. Костюк и др. (2014) при выборе питательной среды для интродукции в культуре *in vitro* эксплантов малины и крыжовника было показано, что среди питательных сред Мурасиге-Скуга, Андерсона и Ли де Фоссарда, на среде по прописи Мурасиге-Скуга наблюдался наивысший процент регенерации. На питательных средах Андерсона и Ли де Фоссарда у эксплантов экспериментальных сортов малины и крыжовника при их интродукции установлен низкий уровень приживаемости меристем.

Как правило, все питательные среды имеют сходный состав: макро- и микроэлементы (N, P, K, Ca, S, Mg, Fe, B, Zn, Cu, Co, Mn, J, Mo); витамины (B1, B6, B12, PP и др.); углеводы (сахароза, глюкоза, маннит); фитогормоны (чаще всего цитокинины и ауксины в определенном соотношении). По сравнению с ауксинами и цитокининами другие регуляторы роста (гиббереллиновая кислота (ГК), абсцизовая кислота (АБК), этилен) играют меньшую роль в регуляции морфогенеза *in vitro*, хотя имеются случаи, в которых ГК или АБК могут специфически индуцировать и поддерживать морфогенез. АБК часто используют для предотвращения раннего прорастания и аномальной пролиферации соматических зародышей, что позволяет им пройти этап синтеза запасных веществ, необходимых для формирования полноценного фенотипически нормального проростка.

Как известно, преобладание в питательных средах ауксинов способствует образованию каллусных тканей, а повышенное содержание цитокининов может привести к образованию эмбриоидов (Ван-Ункан, 2014). Известно, что при сбалансированном соотношении концентраций регуляторов роста из групп ауксинов и цитокининов в питательных средах происходит индукция каллусообразования, повышение содержания цитокининов по отношению к ауксинам вызывает образование побегов, а индукция корнеобразования требует преобладания ауксинов по отношению к цитокининам. Эти положения подтверждаются при работе с рядом культур, в том числе плодовых и ягодных. Считается, что количество добавляемых в среду экзогенных регуляторов роста должно находиться в тесной связи с балансом эндогенных фитогормонов конкретного генотипа. Следовательно,

состав сред для разных сортов нужно подбирать индивидуально (Муратова и др., 2011).

В литературе есть многочисленные сведения об успешной индукции морфогенеза из каллусов и различных эксплантов плодово-ягодных культур. Для регенерации каллусогенеза рекомендуют использовать в качестве веществ с ауксиновой активностью повышенное содержание 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-Д), 3-индолилмасляной кислоты (ИМК),  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК),  $\beta$ -индолилуксусной кислоты (ИУК) по отношению к веществам с цитокининовой активностью: 6-бензиламинопурин (6-БАП), 6-фурфуриламинопурин (кинетин) (Тюленев, 1996; Sugiura et al., 2008; Митрофанова, 2009; Попкова, Теплицкая, 2009; Матушкина, Пронина, 2010; Муратова и др., 2011; Попов, 2011; Soliman, 2013).

Для регенерации побегов из соматических тканей древесных культур, наиболее широко используется цитокинин аминопуринового типа – БАП, концентрация которого в несколько раз превышает содержание ауксинов (НУК, ИУК, ИМК, 2,4-Д) в питательной среде. Но в последнее время применяют другое вещество с цитокининовой активностью: производное фенилмочевины, синтетический регулятор роста N-фенил-N'-1,2,3-тидiazолил-5-мочевину (тидiazурон). В работе X. Liu, P.M. Pijut (2008) регенерация из листовых эксплантов черной вишни (*Prunus serotina*) на среде с ТДЗ и НУК в определенных концентрациях шла успешно. По некоторым данным тидiazурон активен в более низких концентрациях, чем аминопуриновый регулятор роста (Калашникова, 2012).

Эмбриогенез в отличие от органогенеза скорее подавляется регуляторами роста, нежели стимулируется. Протоколы по индукции эмбриогенеза обычно предполагают использование двух последовательных сред: первичной среды с ауксином (как правило, это 2,4-Д, реже – ИУК, НУК), способствующей инициированию и поддержанию культуры, и вторичной среды без регуляторов роста, способствующей развитию эмбрионов и прохождению ими всех стадий развития, присущих зиготическому зародышу, до стадии взрослого растения. Вероятно, в первичной культуре происходит инициирование и «клонирование» эмбрионов, но присутствие ауксина предотвращает их созревание. Большое значение для индукции эмбриогенеза у ряда видов имеют цитокинины. Их нередко включают в первичную среду, но особенно важны они для созревания эмбрионов и для поддержания культур с низкой плотностью (Тимофеев, Румянцева, 2012).

Одним из важнейших моментов, определяющих успех регенерации, является подбор минерального состава питательной среды. Из неорганических факторов среды для морфогенеза наиболее важны азотсодержащие минеральные соли. Присутствие  $\text{NH}_4^+$  в питательной среде требуется для начала морфогенеза, тогда как  $\text{NO}_3^-$  или смесь амонийного и нитратного азота необходимы для роста и развития возникших морфогенных структур (Бутенко, 1999).

Каждая среда имеет разное соотношение минеральных веществ. Известно, что для каждого генотипа оптимальным является индивидуально подобранный минеральный состав сред. С.А. Муратовой, Н.В. Соловых и

В.И. Тереховой (2011) проведено изучение влияния минерального состава среды на регенерацию из листовых эксплантов представителей рода *Rubus*, при котором для каждого индивидуума рода они использовали разные среды. Ими было установлено, что среда по прописи Мурасиге-Скуга позволяет получать адвентивные побеги у всех изученных генотипов рода *Rubus*. Для малины красной, малины черной и ежевики частота регенерации увеличивалась при замене среды МС на более бедные азотом среды Кворина-Лепуавра (QL) или Андерсона. Использование среды Смирнова, отличающейся существенно более низким содержанием как аммонийного, так и нитратного азота, оказалось менее эффективным для индукции морфогенеза у растений рода *Rubus*. Также они рекомендуют модифицировать среду МС, заменяя в некоторых случаях хлорид кальция на нитрат и увеличивая вдвое содержание хелата железа. Применение таких мер позволило им добиться увеличения числа побегов-регенерантов на эксплант для ежевики, малино-ежевичного гибрида и малины красной.

В качестве источника углеводов, как правило, используют сахарозу в концентрации 20–40 г/л. Наиболее активно стимулируют образование и рост каллуса и, что более существенно, дифференциацию адвентивных почек и побегов, глюкоза и сахароза (Муратова и др., 2011). Но в работе Г.Д. Попова (2011) при изучении каллусообразования различных сортов яблони был проведен эксперимент с введением в питательную среду разных углеводов, который показал, что на средах с различными моно и олигосахаридами происходило не менее интенсивное каллусообразование, чем на среде с сахарозой. Однако, влияние этих углеводов на каллусообразование у

остальных сортов было менее эффективно, хотя оно и незначительно снижалось относительно результатов на сахарозе. В то же время введение арабинозы приводило к полному угнетению каллуса. А такие моносахариды, как рамноза и галактоза, слабо способствовали развитию новой ткани. Навеска каллуса существенно уменьшается при добавлении их в раствор, по сравнению с хорошими активаторами (сахароза, сорбит, глюкоза).

Добавление в питательную среду антиоксидантов увеличивает частоту адвентивного морфогенеза. Часто в среду вводят глутатион в концентрации 250–500 мкМ, который способен увеличить частоту регенерации в 1,5–5,9 раза. Аскорбиновая кислота в определенной концентрации (500–750 мкМ) дает увеличение морфогенеза в 4,6–5,3 раз (Муратова и др., 2011). Часто для повышения морфогенетического потенциала плодово-ягодных культур и других растений в питательную среду вводят аминокислоту – глицин (Karim et al., 2011; Motallebi-Azar, Mahna, 2011).

Питательную среду необходимо также дополнять витаминами. Показано, что тиамин необходим для роста растений, витамин Е регулирует агрегацию клеток, витамин Д увеличивает скорость формирования корней и т.д. Важными параметрами культуральной среды являются рН, осмотичность и ее физическое состояние. Повышение осмотичности среды в некоторых случаях способствует длительному сохранению регенерационного потенциала пересадочных культур (Тимофеева, Румянцева, 2012).

Многие физические факторы, такие как температура, влажность, интенсивность и качество света, физическое состояние среды и даже тип культурального сосуда, оказывают влияние на морфогенез *in vitro*.

Интенсивность света, в некоторых случаях, может быть фактором, определяющим организованное развитие. Для того, чтобы индуцировать процесс каллусогенеза, эксплант необходимо помещать в темное место с постоянной температурой среды от 21 до 25°C. Развитие каллуса длится на протяжении 3–4 недель. Для индукции морфогенеза из каллусной культуры клеток применяют интенсивность освещения равную 2000 люкс. По мере развития побегов этот показатель увеличивают до 5000–6000 люкс. Морфогенез осуществляется на протяжении месяца (Высоцкий, Данькова, 1993).

Показано, что стрессовые факторы в ряде случаев стимулируют морфогенез. Стимуляцию процесса морфогенеза с помощью стрессовых факторов можно объяснить с помощью математической теории катастроф. Предполагается, что в условиях стресса клетки выходят за норму реакции данной программы дифференцировки и могут переходить на одну из программ, имеющихся в клетках растений, в частности на программу морфогенеза (Тимофеева, Румянцева, 2012).

Очень важным фактором успешной реализации биотехнологических методов в культивировании растений *in vitro* является создание стерильных условий при приготовлении питательной среды и осуществлении манипуляций при пассировании эксплантов. Современная лаборатория должна быть оснащена автоклавом и ламинар-боксом для реализации данного фактора.

Таким образом, различные виды, сорта и даже отдельные органы и ткани одного растения отличаются по способности к органогенезу. Такие



факторы, как положение экспланта на стебле, его физиологическая зрелость, способ срезания и ориентация на среде, также могут влиять на коэффициент регенерации. Эффективность регенерации в большинстве случаев определяется сочетанием нескольких экзогенных факторов, от которых зависят обменные процессы в изолированных клетках. Содержание некоторых ионов в среде регенерации может в значительной мере определять направленность морфогенетических процессов, поэтому минеральный состав, тип и концентрация углеводов и неорганических солей тоже влияют на эффективность морфогенеза. Вопрос о том, какой из факторов на каком этапе является наиболее критическим остается открытым. Использование экзогенных гормональных препаратов является одним из основных факторов, необходимых для получения растений-регенерантов *in vitro*.

### **1.3. Клеточные деления и соматоклональная изменчивость**

В условиях научно-технического прогресса возросло значение цитологии, цитогенетики и эмбриологии в области генетики и селекции растений.

Исследования клетки продолжают оставаться в центре внимания ученых. Интерес к цитологии – науке о клеточном уровне организации живой материи – вполне понятен. В исходной растительной клетке заложена наследственная информация, и от ее реализации зависит судьба будущего урожая. На знании цитологии построена клеточная инженерия растений – одно из важнейших звеньев современной биотехнологии.

Не зная цитологии, невозможно освоить и теоретическую основу селекции растений – генетику. Изучение строения хромосом, кариотипов, процессов митоза, мейоза и оплодотворения позволяет понять, как осуществляется преемственность в ряде поколений клеток и организмов.

Клеточное деление относится к числу важнейших биологических процессов, с ним связана передача наследственной информации. Поэтому вопросы, связанные с делением клетки, интересуют цитологов, генетиков и селекционеров. В пределах ткани обычно различают две популяции клеток: покоящиеся и находящиеся в активном состоянии, т.е. делящиеся или дифференцирующиеся. Начало активным клеткам дают покоящиеся клетки. В них метаболические процессы направлены на самоподдержание и сохранение способности к размножению, а в делящихся клетках – на самовоспроизведение.

Митоз или непрямоe деление клеток, у растений наблюдал в 1874 г. И.Д. Чистяков, в 1882 г. подробно описал его Флемминг – в клетках животных; Страсбургер – в клетках растений. В ходе митоза в ядре происходят сложные структурные преобразования. С генетической точки зрения, он играет важную роль, так как при этом происходит точное распределение генетической информации между дочерними клетками, т.е. осуществляется наследственная преемственность свойств организма и поддерживается непрерывность жизни различных поколений клеток. При нормальном ходе митоза после его завершения из одной клетки образуются две равноценные по генотипу. Внутри клеточного ядра генетическая информация закодирована в молекулах ДНК, которые упакованы в

хромосомы. До наступления деления в интерфазе происходит удвоение структур, ответственных за передачу наследственных свойств, а затем в процессе деления удвоенные структуры точно распределяются между двумя клетками. Последнее приводит к тождественности генетической информации исходных и дочерних клеток (Паушева, 1988).

Термин «сомаклональная изменчивость», означающий изменчивость, возникающую в культуре клеток или тканей, впервые появился в 1981 г., хотя об этом явлении неоднократно сообщалось и ранее. Соматические изменения могут иметь генетическую или эпигенетическую природу. Генетические отклонения наследуются и часто представляют собой проявление уже существующих изменений в клетках экспланта, хотя возможно и возникновение новых мутаций. Одним из наиболее важных проявлений таких изменений являются хромосомные нарушения. Хотя увеличение пloidности может возникать и при делении эндополиплоидных клеток исходного экспланта, все же большинство полиплоидов и анеуплоидов возникает в процессе культивирования. Эти изменения следует отличать от морфозов, ненаследуемых эпигенетических изменений, которые часто обратимы и происходят в результате воздействия культивирования в условиях *in vitro*. Морфозы обычно проявляются в увеличении силы роста и ветвления, способности к укоренению и цветению, задержке вступления в плодоношение, т.е. признаков, характерных для ювенильной фазы развития. Для выяснения природы наблюдаемых изменений у видов с половым способом размножения необходимо произвести соответствующее скрещивание. Для видов, размножаемых бесполом путем, сохранение

признака, по крайней мере, в двух последовательных циклах клонального микроразмножения, обеспечивает подтверждение генетической причины данного изменения (Хон, 1990). Для обнаружения соматоклональных изменений применяются различные методы: морфологическая оценка, цитологические исследования (кариотипирование, проточная цитометрия), анализы с использованием молекулярных маркеров. Следует учитывать, что исследований *in vitro* и в теплице недостаточно для полного выявления отклонений и требуется проверка в полевых условиях.

Проявление соматоклональной изменчивости может быть и преимуществом, и недостатком. Преимуществом является увеличение генетического разнообразия и выведение новых сортов. Например, таким образом были получены сорт нетемнеющего картофеля *White Baron* и сорт бесшипной ежевики *Lincoln Logan* (Jain, 2001). Но, когда цель – получить однородный посадочный материал, например при клональном размножении, проявление её нежелательно. Особое внимание следует уделять культуре *in vitro* химерных сортов, которые содержат клетки разных генотипов, так как известно, что химеры можно разделять путем микроразмножения или адвентивной регенерации. По этим причинам очень важно понимать механизмы, которые порождают нестабильность и соматоклональную изменчивость *in vitro*, с целью управления частотой ее встречаемости в зависимости от поставленных целей. Исследования многих зарубежных учёных показали, что на частоту соматоклональной изменчивости в культуре *in vitro* могут влиять такие факторы, как генотип, источник эксплантов, регуляторы роста, а также состав среды, продолжительность и

условия культивирования и другие. Если в ходе культивирования растений присутствует стадия каллуса, то вероятность соматональной изменчивости возрастает. Образование каллуса характерно для процессов адвентивной регенерации или соматического эмбриогенеза растений. По этой причине соматональные отклонения особенно важно контролировать при криосохранении соматических эмбрионов и их использовании в качестве искусственных семян.

Свои особенности имеет соматональная изменчивость, наблюдаемая у генетически модифицированных (трансгенных) растений. Эти растения иногда показывают изменения в фенотипе, не связанные с экспрессией перенесенных генов. Хотя в ряде исследований было продемонстрировано, что частота соматональной изменчивости не различается между трансгенными и нетрансгенными регенерантами, однако в некоторых случаях она увеличивалась (Лебедев, Азарова и др., 2012). Причинами такой дополнительной изменчивости могут быть стресс, связанный с методикой проведения трансформации или встраивание переносимых генов, а также других нецелевых последовательностей ДНК (вставочный мутагенез). Методика генетической трансформации растений сопровождается такими стрессовыми воздействиями, как длительная экспозиция эксплантов с высокими концентрациями регуляторов роста для регенерации растений, а также с гербицидами или антибиотиками, которые необходимы для селекции трансформированных клеток и элиминации агробактери. Вместе с тем семядоли часто используются для трансформации растений, в особенности

древесных, так как частота регенерации из них в силу ювенильной природы выше, чем из тканей, например, листьев (Лебедев и др., 2012).

Таким образом, для снижения вероятности соматональных изменений у трансгенных растений следует обращать внимание на плоидность исходных эксплантов, а также ослаблять стрессовое воздействие: исключить селекцию на антибиотиках или гербицидах и использовать прямую регенерацию без стадии каллуса.

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*



*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*



*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*



*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Алексеенко Л.В., Высоцкий В.А. Возможность получения растений-регенерантов вишни и сливы в культуре *in vitro*. – М.: Институт садоводства ГНУ ВСТИСП, 2008. – С. 3–7.
2. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. – СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2002. – 232 с.
3. Бунцев Л.Л., Беседина Е.Н., Костюк М.А., Макаркина М.В. Разработка составов питательных сред для индукции в культуре *in vitro* эксплантов сортов малины и крыжовника // Плодоводство и виноградарство Юга России, 2014. – № 28(04). – С. 25–35.
4. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
5. Ван-Ункан Н.Ю. Регенерация растений колонновидных слаборослых генотипов яблони из эксплантов различного происхождения. – Мичуринск: ГНУ ВНИИГ и СПР им. И. В. Мичурина, 2014. – 132 с.
6. Вечернина Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений: Монография. – Барнаул: Изд-во Алтайского гос. ун-та, 2004. – 205 с.
7. Вечернина Н.А. Регенерация растений в культуре *in vitro* семядолей груши // Известия АлтГУ, 2007. – № 3. – С. 15–19.
8. Высоцкий В. А. Регенерация плодовых и ягодных растений в культуре каллусной ткани, пыльников, листовых и стеблевых эксплантов // Садоводство и виноградарство, 2008. – № 2. – С. 17–20.

9. Высоцкий В.А., Упадышев М.Т. Регенерационная способность эксплантов рода *Rubus* L. различного происхождения // Садоводство и виноградарство, 2015. – № 4. – С. 24–29.
10. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1986. – 502 с.
11. Жбанова Е.В., Соловых Н.В. Соматоклональная изменчивость земляники по биохимическому составу плодов // Плодоводство и ягодоводство России, 2012. – № 1. – С. 188–194.
12. Иванова Н.Н., Митрофанова И.В. Органогенез в культуре различных эксплантов фейхоа в условиях *in vitro* // Ученые записки Таврического национального ун-та им. В.И. Вернадского. Серия: Биология, химия. – Т. 27 (66). – 2014. – № 4. – С. 18–24.
13. Ильина Н.С. Влияние погодных условий на культуру *in vitro* листовых эксплантов ремонтантных сортов малины // Вестник МичГАУ, 2012. – № 1. – С. 61–63.
14. Ильина Н.С. Основные факторы культивирования *in vitro* листовых эксплантов различных форм малины красной // Вестник МичГАУ, 2011. – № 2. – С. 42–43.
15. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2020. – 333 с.
16. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрোকлонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.

17. Колбанова Е.В. Влияние материнского растения на морфогенетическую способность эксплантов некоторых ягодных культур *in vitro* // Плодоводство, 2011. – Т. 23. – С. 203–209.
18. Круглова Н.Н. Каллус как модель для изучения формирования структуры высшего растения // Известия уфимского научного центра РАН, 2011. – № 3-4. – С. 17–22.
19. Лебедев В.А., Деменко В.Н., Долгов С.В. Потенциальная возможность адвентивного органогенеза у различных сортов груши // Известия ТСХА, 2004. – Вып. 4. – С. 81–87.
20. Лебедев В.Г., Азарова А.Б., Шестибратов К.А., Деменко В.И. Проявление соматоклональной изменчивости у микроразмноженных и трансгенных растений // Известия ТСХА, 2012. – Вып. 1. – С. 153–163.
21. Масленников С.Е. Методы культуры каллусов и клеток в создании форм люцерны, устойчивых к фузариозу: Автореф. дис.... канд. биол. наук. – М., 1994. – 15 с.
22. Матушкина О.В. Влияние минерального и гормонального состава питательной среды на индукцию адвентивного органогенеза яблони и груши *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России, 2014. – № 3.– С. 56–62.
23. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Новое в технологии *in vitro* плодовых культур // Плодоводство и ягодоводство России, 2014. – № 2. – С. 224–232.
24. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Особенности воздействия экзогенных цитокининов и их производных на регенерацию яблони и груши *in vitro*// Достижения науки и техники АПК, 2010. – № 8. – С. 34–35.



25. Матушкина О.В., Пронина И.Н., Матушкин С.А., Ярмоленко Л.В. Особенности размножения *in vitro* некоторых ягодных культур // Плодоводство и ягодоводство России: Сб. научн. работ, 2015. – Т. 41. – С. 245–249.
26. Медведева Н.И., Бунцевич Л.Л., Мохно В.С. Использование методов *in vitro* в селекции плодовых и цветочно-декоративных культур // Плодоводство и виноградарство Юга России, 2012. – № 15. – С. 1–11.
27. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений // Физиология и биохимия культурных растений, 2009. – № 6. – С. 496–508.
28. Мочалова О.В., Гусев Д.А. Индукция полиплоидии у вишни степной и микровишни песчаной через культуру *in vitro* // Достижения науки и техники АПК, 2016. – Т. 30. – № 9. – С. 36–39.
29. Муратова С.А., Бочарова Т.Е., Папихин Р.В. Потенциальные возможности адвентивного органогенеза из листовых высежек клоновых подвоев яблони // Вестник МичГАУ, 2012. – № 1. – С. 54–57.
30. Муратова С.А., Соловых Н.В., Терехова В.И. Индукция морфогенеза из изолированных соматических тканей растений: Монография. – Мичуринск: Изд-во Мичуринского государственного агроун-та, 2011. – 107 с.
31. Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального Сибирского ботанического сада // Вестник ВОГиС, 2008. – Т. 12. – № 4. – С. 564–571.
32. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.

33. Плаксина Т.В. Использование биотехнологических методов в работе с косточковыми культурами // Достижения науки и техники АПК, 2008. – № 8. – С. 27–29.

34. Плаксина Т.В., Солохина А.А., Артамонова О.Н., Бородулина И.Д. Пути регенерации растений вишни степной (*Prunus fruticosa* Pall.) в условиях *in vitro* // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: сборник научных статей по материалам XVII междунар. науч.-практ. конф. – Барнаул: Изд-во Алтайского гос. ун-та, 2018. – С. 234–238.

35. Подорожный В.Н., Майорова Ю.А. Зависимость высоты побега и площади листа от концентрации цитокинина и происхождения культивируемых *in vitro* растений *Prunus cerasus* // Плодоводство и ягодоводство России, 2014. – № 3. – С. 191–198.

36. Попкова Л.Л., Теплицкая Л.М. Процессы морфогенеза в длительно культивируемых каллусах боярышника Поярковой (*Crataegus Pojarkovae* Kossyach.) // Ученые записки Таврического нац. ун-та им. В.И. Вернадского, 2009. – № 4. – С. 135–144.

37. Попов Г.Д. Каллусогенез у эксплантов различных сортов яблони // Плодоводство и ягодоводство России, 2011. – № 6. – С. 70–75.

38. Расторгуев С.Л. Изменчивость растений-регенерантов земляники, полученных методом тканевых культур // Ученые записки Таврического нац. ун-та им. В.И. Вернадского, 2008. – Т. 2. – № 1. – С. 46–51.

39. Расторгуев С.Л. Культура изолированных тканей и органов в селекции плодовых растений. – Мичуринск: Изд-во МичГАУ, 2009. – 170 с.

40. Расторгуев С.Л. Повышение частоты регенерации растений земляники в культуре каллуса и анализ степени их изменчивости // Плодоводство и виноградарство Юга России, 2014. – № 27 (3). – С. 4–20.
41. Роговая В.В., Гвоздев М.А. Особенности микрклонального размножения косточковых культур в условиях *in vitro* // Известия Росс. гос. пед. ун-та им. А.И. Герцена, 2005. – Т. 5. – № 13. – С. 291–302.
42. Соловых Н.В. Диагностика солеустойчивости растений рода *Rubus* биотехнологическим методом // Вестник МичГАУ, 2010. – № 2. – С. 104–110.
43. Соловых Н.В., Муратова С.А. Индукция морфогенеза из изолированных тканей растений рода *Rubus* // Вестник МичГАУ, 2010. – № 1. – С. 68–72.
44. Субботин Г.И. Вишня в Южной Сибири. – Барнаул: Изд-во Алт. гос. ун-та, 2002. – 145 с.
45. Тимофеева О.А., Румянцева Н.И. Культура клеток и тканей растений. – Казань: КГУ, 2012. – 91 с.
46. Тимофеева С.Н., Смолькина Ю.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Технологии микроразмножения *in vitro*. – Саратов: Изд-во Саратовского гос. ун-та, 2016. – 38 с.
47. Тюкавин Г. Б. Основы биотехнологии моркови: Монография. – М.: ВНИИССОК, 2007. – 480 с.
48. Упадышева Г.Ю. Эффективность применения регулятора роста при выращивании вишни // Агро XXI, 2013. – № 7. – С. 31–32.

49. Хамукова Ф.Н. Регенерация растений земляники и малины из эксплантов различного происхождения. Автореф. дис. ...канд. с.-х. наук. – М., 1996. – 21 с.
50. Харченко П.Н., Глазко В.И. ДНК-технологии в развитии агробиологии. – М.: Воскресенье, 2006. – 480 с.
51. Хон Б., Денис Э. Мобильность генома растений. – М.: Агропромиздат, 1990. – 271 с.
52. Цитологические исследования плодовых и ягодных культур: Методические рекомендации / Под ред. Г.А. Курсакова. – Мичуринск: ЦГЛ, 1976. – 104 с.
53. Челябин Д.Н. Регенерационный потенциал элитных форм малины в культуре *in vitro*: Автореф. дис. ...канд. с.-х. наук. – Брянск, 2012. – 23 с.
54. Челябин Д.Н., Сквородников Д.Н. Индукция каллусогенеза *in vitro* у листовых эксплантов малины // Вестник Брянского государственного университета, 2011. – № 4. – С. 314–315.
55. Эрст А.А. Особенности размножения *Ribes aureum* Pursh. и *Vaccinium uliginosum* L. в культуре *in vitro*: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. – Новосибирск, 2010. – 18 с.
56. Ara T., Karim R., Karim M. R., Islam R., Hossain H. Callus induction and shoot regeneration in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) // Int. J. Biosci., 2012. – P. 93–100.
57. De Klerk G.-J. Arnoldt-Schwitt B. Lieberei R. Regeneration of roots, shoots, and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects // Biologia Plantarum, 1997. – Vol. 39. – No. 1. – P. 53–66.

58. Espinosa A.C., Pijut P.M., Michler C.H. Adventitious shoot regeneration and rooting of *Prunus serotina* in vitro cultures // Hort. Science, 2006. – P. 193–201.
59. Jain S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement // Euphytica, 2001. – Vol. 118. – P. 153–166.
60. James D.J., Passey A.J., Rugini E. Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissues cultured *in vitro* // J. Plant Physiol., 1988. – Vol. 132. – P. 148–154.
61. Karim M.R., Aziz M.A., Roy U.K., Hoque M.A., Hossain M.M. *In vitro* response of strawberry (*Fragaria × ananassa* Dutch.) for callus induction and shoot regeneration // IJAAR, 2011. – Vol. 1. – No. 1. – P. 29–36.
62. Liu X., Pijut P.M. Plant regeneration from in vitro leaves of mature black cherry (*Prunus serotina*) // Plant Cell Tiss Organ Cult, 2008. – P. 113–123.
63. Matkowski A., Przywara L. Callus induction and plant regeneration *in vitro* in Actinidia // Actasocietatis botanic orumpoloniae, 1995. – Vol. 64. – P. 131–138.
64. Mohamed A. Nagaty Establishment of Regeneration system for Taif peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivar (Balady cultivar) in Taif, KSA // Journal of American Science, 2012. – P. 232–239.
65. Motallebi-Azar A., Mahna N., Markafshi A. Shoot regeneration from leaf segments of peach × almond hybrid, GF677 rootstock // AAB Bioflux, 2011. – Vol. 3. – P. 168–177. Ning G.G., Bao M.Z. Plant Regeneration from Callus Derived from Immature Embryo Cotyledons of *Prunus mume* // Hort Science, 2007. – No. 42(3). – P. 193–201.

66. Soliman H.A. *In vitro* regeneration and genetic transformation of peach (*Prunus persica* L.) plants // Life Sci J., 2013. – P. 487–496.
67. Sugiura A., Matsuda-Habu Y., Gao M., Esumi T., Tao R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) embryos // Hort Science, 2008. – No. 43(1). – P. 211–214.
68. Tang H., Ren Z., Krczal G. Somatic embryogenesis and organogenesis from immature embryo cotyledons of three sour cherry cultivars (*Prunus cerasus* L.) // Scientia Horticulturae, 2000. – Vol. 83. – P. 109–126.
69. Vijovic T., Ruzic D., Cerovic R. Micropropagation of sour cherry Cacascki Rubin (*Prunus cerasus* L.) // Vocarstvo, 2013. – Vol. 47. – No. 183. – P. 109–119.

*Сведения изъяты*

*Сведения изъяты*



*Сведения изъяты*