

ОСОБЕННОСТИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР В УСЛОВИЯХ IN VITRO

В работе представлен обзор, в котором рассматриваются особенности методов микроклонального размножения косточковых плодовых культур в системе in vitro. Особое внимание уделено методу размножения пазушными почками и методу регенерации адвентивных побегов из листовых эксплантов вишни, черешни, персика и абрикоса. Рассмотрены вопросы оздоровления растений от различных патогенов и тестирования растительного материала косточковых культур на наличие вирусных инфекций.

Впервые микроклональное размножение провел французский ученый Жорж Морель на орхидеях в 50-х годах XX века. В своих работах он использовал технику культивирования апикальной меристемы растений. Растения, полученные таким образом, были свободны от вирусной инфекции.

В нашей стране исследования по оздоровлению растений методом меристем и по клональному микроразмножению начались в 60-х годах в Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева АН СССР [1].

Микроклональное размножение — получение in vitro растений, генетически идентичных исходному экспланту (метод вегетативного размножения растений в культуре in vitro). В основе микроразмножения лежит уникальное свойство соматической растительной клетки — тотипотентность — способность клеток полностью реализовать генетический потенциал целого организма [2].

В настоящее время все большую актуальность приобретают различные методы микроклонального размножения сельскохозяйственных культур (прежде всего вегетативно размножаемых) в системе in vitro: размножение пазушными и адвентивными почками, не прямой морфогенез, соматический эмбриогенез.

Использование этих методов дает возможность:

- ускорять селекционный процесс, в результате этого сроки получения товарной продукции сокращаются до 2–3 лет вместо 10–12;
- получать за короткий срок большое количество оздоровленного, безвирусного материала, генетически идентичного материнскому растению;
- работать в лабораторных условиях и поддерживать активно растущие растения круглый год;
- размножать растения практически без контакта с внешней средой, что исключает воздействие неблагоприятных абиотических и биотических факторов;
- получать максимальное число растений с единицы площади;
- в короткий срок получать большое число растений трудноразмножаемых или вегетативно неразмножаемых;
- при выращивании растений с длительной ювенильной фазой можно ускорять переход от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- длительно (в течение 1–3 лет) сохранять растительный материал в условиях in vitro (без пассирования на свежую среду) [3, 4],

-
- создавать банки длительного хранения ценных форм растений и отдельных их органов;
 - разрабатывать методы криосохранения оздоровленного *in vitro* материала [5, 6].

***Этапы микроклонального размножения
косточковых плодовых культур
и тестирование на наличие вирусных инфекций***

Процесс микроклонального размножения включает несколько этапов. Основными из них являются [7–10]:

- 1-й этап — введение экспланта в культуру *in vitro*;
- 2-й этап — микроразмножение;
- 3-й этап — процесс укоренения микропобегов;
- 4-й этап — осуществление выхода укорененных растений из стерильных условий в нестерильные.

Важным этапом в методике микроразмножения растений *in vitro* является выращивание безвирусных маточных форм растений в вегетационных домиках или изолированных боксах в зимних теплицах, в условиях, недоступных для переносчиков вирусов. Растения-доноры эксплантов для последующего введения в культуру *in vitro* должны быть протестированы на наличие вирусных, микоплазменных и бактериальных инфекций с помощью методов ПЦР-диагностики либо молекулярной гибридизации, либо иммуноферментного анализа (ИФА) [10, 11].

Метод ИФА позволяет в сжатые сроки выявлять подавляющее большинство вирусов, заражающих косточковые культуры: вирусы карликовости сливы, некротической кольцевой пятнистости косточковых, потивирус шарки слив, неповирусы скручивания листьев черешни. Клоны, оказавшиеся свободными от контактных вирусов по результатам проверки методом ИФА, подвергают затем основному тестированию, включающему серологические тесты в сочетании с тестом на растениях-индикаторах. Растениям, оказавшимся по результатам тестирования свободными от вирусов и других регламентируемых патогенов, присваивается категория «безвирусных» базисных клонов. В случае выявления инфекции исходные растения могут подвергнуться оздоровлению. Для оздоровления растений косточковых культур от вирусов наиболее целесообразно сочетать методы суховоздушной термотерапии и культуры *in vitro*. Если с помощью культуры изолированных апикальных меристем не удастся освободиться от тестируемых вирусов, используют методы хемотерапии, основанные на введении в питательные среды химических веществ, ингибирующих развитие вирусной инфекции в растениях *in vitro* [11].

Иногда для активного выявления бактериальной микрофлоры среды обогащают различными органическими добавками, например гидролизатом казеина, который провоцирует развитие сапрофитных микроорганизмов [7, 12–14]. Оценку зараженности проводят визуально через 7–10 дней. «Чистые» экспланты помещают на питательные среды для дальнейшего культивирования. Практикуют на этой ступени и применение сред, лишенных ростовых веществ [7, 15].

*Введение в культуру in vitro
и микроразмножение плодовых косточковых культур*

При клональном микроразмножении плодовых косточковых культур в качестве источника эксплантов обычно используют верхушечные и боковые почки, а также меристематические верхушки. Вычленение верхушечной меристемы проводят по общепринятым методикам после ступенчатой стерилизации растительного материала [13, 16].

Для микрোকлонального размножения косточковых культур используют различные среды: для микроразмножения вишни — среды Пиерика, Готре, Уайта, Хеллера [12, 17], для вишни и сливы — среду Розенберга, модифицированную для плодовых культур [18] и для сливы — среду Лепуавра и В5 [12, 19]. Но наиболее подходящей для микрোকлонального размножения вишни, черешни и сливы является питательная среда Мурасиге—Скуга (МС) [12, 16, 17, 19–27].

В зависимости от этапа микрোকлонального размножения плодовых косточковых культур к питательным средам добавляют 6-бензиламинопурин (6-БАП) в концентрациях 0,2–2 мг/л [5, 8, 13, 17, 20, 28]. На этапе введения в культуру *in vitro* используют более низкую концентрацию цитокинина — 0,2 мг/л БАП [8, 20, 27]. Для индукции пролиферации пазушных почек с целью получения максимального числа побегов микрорастения вишни культивируют с добавлением БАП, в концентрациях 0,5–2 мг/л [5, 8, 12, 13, 17, 20, 22, 28–30], микрорастения сливы 0,5 — 1 мг/л БАП [16, 19, 20, 27].

Процесс укоренения микропобегов

Особого внимания требует этап укоренения. Процесс укоренения *in vitro* побегов плодовых косточковых культур зависит от сортовых особенностей [5, 27], от числа проведенных пассажей, от концентрации и типа ауксина, от способа его применения [21]. Для получения полностью сформированных микро-растений плодовых косточковых культур из среды исключается 6-БАП, препятствующий процессам ризогенеза, и в среды вводятся ауксины, в основном — β-индолил-3-масляная кислота (ИМК) [5, 8, 10, 13, 16, 18, 22, 26, 27]. Установлено, что оптимум концентраций ИМК в составе питательной среды находится в пределах 0,5–1 мг/л [8, 17, 18, 20, 21, 27, 31–33]. Присутствие в среде ИМК в концентрации 2 мг/л вызывает образование гипертрофированных корней [17, 27].

Совместное введение в среду для укоренения препарата рибав (1 мл/л) и традиционных фитогормонов ауксинов [ИМК и β-индолилуксусной кислоты (ИУК) по 0,5 мг/л каждого] повышает процент укоренения побегов ряда сортов косточковых культур [12].

При сравнительном изучении индукторов корнеобразования: ИМК, ИУК и α-нафтилуксусной кислоты (НУК), была выявлена высокая эффективность ИУК в концентрации 6,0 мг/л [27]. Наибольшее число укоренившихся микро-черенков вишни было получено на среде, содержащей НУК [8, 17]. Однако при этом на базальном участке побегов происходило интенсивное разрастание каллуса, что затрудняло перенос пробирочных растений с корнями в нестерильные условия.

Для эффективного укоренения пробирочных растений косточковых культур большое значение имеет не только тип стимулятора, но и способ его аппликации. Помимо введения ауксинов в питательную среду, для индукции ризогенеза используют предварительное замачивание побегов в стерильном водном растворе ИМК (25–30) мг/л при экспозиции 12–24 часа [8, 12, 13, 17, 20]. Проведенные эксперименты показали, что обработка микрочеренков водным раствором ИМК более эффективна, чем введение этого регулятора в культуральную среду. Массовое появление первых придаточных корней при применении предварительной обработки индуктором ризогенеза отмечалось на 20–25 день [8, 17]. Еще одним способом индукции ризогенеза является обработка побегов плодовых косточковых культур тальковой ауксинсодержащей пудрой ИМК с концентрацией 0,125%, 0,25% [12, 20, 27] и ИУК с концентрацией 0,25%, 0,5% [27]. При использовании гормональной пудры отмечалась высокая эффективность и технологичность применения индукторов ризогенеза [20]. Но использование тальковой пудры ИМК с разными концентрациями ауксина выявило сортовую специфику при укоренении микрочеренков сливы [27].

Процесс ризогенеза наиболее интенсивно протекает на модифицированных средах МС и Уайта [17]. По другим данным [16, 26] лучшей средой для корнеобразования являются среды с макроэлементами по Хеллеру с добавлением витаминов и разбавленная вдвое среда МС с пониженным содержанием сахарозы 15 мг/л и с исключением мезоинозита, способствующего образованию каллусной ткани. Однако в большинстве работ для укоренения микропобегов косточковых культур используется среда Мурасиге и Скуга [16, 17, 19–23, 26, 27].

Методы микроклонального размножения

Существует несколько способов микроклонального размножения растений *in vitro*:

- методы размножения пазушными почками;
- методы размножения адвентивными почками;
- не прямой морфогенез;
- соматический эмбриогенез.

Для любого типа регенерации *in vitro* можно выделить четыре группы факторов, определяющих ее успех: генотип и состояние исходного родительского растения; условия и методы культивирования; состав питательных сред; особенности введения экспланта в стерильную культуру [1].

Влияние генотипа на эффективность микроразмножения

Наиболее существенное влияние на эффективность микроразмножения оказывает генотип. Реакция растений на условия асептического культивирования зависит от сортовых особенностей и объясняется разной регенерационной способностью сортов плодовых и ягодных культур [25]. Например, при использовании метода клонального микроразмножения для ускоренного размножения новых сортов вишни сортовые особенности оказались доминирующими факторами в способности растений к микроразмножению [34].

Сортовые различия проявлялись как на стадии пролиферации, так и на стадии корнеобразования [5].

Среди эксплантов разных сортов одного и того же вида плодовых растений нередко наблюдается разная степень проявления реакции на включаемые в среду регуляторы роста, что, видимо, отражает, в какой-то мере эндогенное содержание ростовых веществ, которое является генетически обусловленным признаком вида или сорта [35]. В то же время реализация морфогенетического потенциала в культуре зародышей *in vitro*, у гибридов между видами *Cerasus vulgaris*, *C. maackii*, *C. fruticosa*, *Padus racemosa* в основном определялась генотипом и в меньшей степени зависела от состава питательной среды [34].

Условия культивирования

Еще одним фактором, определяющим успех микроразмножения растений, являются условия их культивирования. Оптимальными условиями культивирования косточковых плодовых культур являются: температура 22–26 °С для вишни, черешни [8, 17, 24, 26] и 26–28 °С — для сливы [20, 27], освещенность 2000–5000 лк — для вишни, черешни [8, 10, 17, 25, 26] и 3500 лк для сливы [19, 20, 27] при 16-часовом фотопериоде. Микрорастения должны выращиваться в климатических камерах или в комнатах с регулируемым режимом.

Необходимо отметить, что у сортов вишни на этапе пролиферации увеличение коэффициента размножения и повышение доли побегов, пригодных к укоренению, может обеспечить прием чередования минеральных составов питательных сред и использование ламп синего света (ЛП 1) [12]. Большое количество побегов косточковых культур — до 30 — может образовываться при горизонтальной ориентации регенерантов [22]. Для увеличения коэффициента размножения в первых пассажах конгломераты почек и побегов косточковых культур можно не разделять на отдельные единицы, а переносить на свежую питательную среду целиком. При использовании этого приема величина коэффициента размножения резко возрастает и может достигать 40–70 за пассаж в зависимости от сорта [13].

Метод размножения пазушными почками непрямой морфогенез

Самым надежным методом микроклонального размножения является метод регенерации растений через развитие пазушных почек [9]. Преимущество этого метода состоит в сравнительно быстром размножении исходного генотипа, при этом обеспечивается наиболее высокая фенотипическая и генотипическая стабильность. Потенциальные возможности такого способа микроразмножения *in vitro* реализуются при добавлении в питательные среды цитокининов, которые подавляют развитие верхушечной почки стебля и стимулируют образование пазушных почек [36].

В основе процесса микроклонального размножения вишни методом культуры изолированных верхушечных меристем лежит явление снятия апикального доминирования, что способствует последующему развитию уже существующих меристем и обеспечивает генетическую однородность посадочного мате-

риала. Снятие апикального доминирования достигается путем добавления цитокининов. Для многих сортов вишни характерна высокая митотическая активность апекса, что способствует формированию разветвленного конгломерата почек и боковых микропобегов [8].

Генетическая стабильность получаемого *in vitro* материала зависит от модели размножения. Процесс размножения плодовых косточковых растений связан с пролиферацией пазушных меристем. Генетическая стабильность — неотъемлемое свойство меристемы, которое может быть сохранено *in vitro*, если последняя культивируется в условиях, ингибирующих формирование каллуса. Если используются среды, стимулирующие образование каллуса, то может возникнуть генетическая вариабельность [37].

Для получения более высоких коэффициентов размножения питательные среды часто обогащают кроме препаратов цитокининовой природы веществами из группы ауксинов, стимулирующими развитие каллусной ткани. Комбинации этих двух препаратов применяют для индукции органогенеза в каллусных тканях. В системе каллус—побег организованная структура побега может воздействовать на процессы органогенеза, стимулируя меристематизацию каллусных клеток, которые могут давать начало органам с измененными свойствами. Простое варьирование содержания регуляторов роста, добавляемых к питательной среде для достижения максимальной пролиферации клеток, может оказывать влияние на генетическую стабильность получаемого материала [37].

Метод размножения адвентивными почками и непрямой морфогенез

Адвентивными почками называются почки, возникшие непосредственно из тканей и клеток эксплантов растений, обычно их не образующих [2]. Адвентивные (или придаточные) почки образуются из меристемных зон, чаще всего сформированных вторично из тканей каллуса. Адвентивные почки могут возникнуть из меристемы и немеристемных тканей (листьев, стеблей). Образование адвентивных почек у многих видов растений индуцировано высоким отношением цитокининов к ауксинам в питательной среде.

Регенерация побегов, корней или эмбриоидов из соматических растительных клеток экспланта может происходить через непрямую регенерацию — образование каллуса и формирование побегов, или через «прямую» регенерацию, когда клетки экспланта становятся способными к регенерации без формирования каллусных тканей [38].

Адвентивные побеги могут образовываться на эксплантах листьев, черешков, корней и других органов растений различных видов косточковых и плодовых культур [39–45]. Получение побегов непосредственно из эксплантов в ряде случаев используют для клонирования растений, но при этом могут появляться генетически нестабильные растения [21]. Поэтому указанный метод регенерации растений можно применять для индукции генетически разнообразных растений.

Побеги-регенеранты могут быть индуцированы из различных частей листовой пластинки, но наибольшей способностью к регенерации обладают ткани

основания листа, поскольку в этой зоне листовой пластинки расположены наиболее активные меристематические клетки. Необходимо также учитывать, что морфогенетический потенциал листьев увеличивается по мере их расположения к верхушке стебля. Придаточные побеги лучше регенерируют из молодой меристематической ткани развивающихся листьев. Однако при использовании более старых листьев значительно чаще возникают генетически измененные побеги [21].

Для регенерации побегов плодовых косточковых культур, таких как вишня, черешня, персик, абрикос, из исходных эксплантов (целых листьев и их сегментов) используются различные среды: Мурасиге—Скуга (MS), Ллойда и Мак Коуна (WPM), Драйвера и Куниюки (DKW), Курена и Лепуавра (QL) [39–45].

Для экспериментов по адвентивной регенерации вишни и черешни чаще всего используется среда Ллойда и Мак Коуна для древесных растений — Woody Plant Medium (WPM), дополненная различными стимуляторами роста [39, 40, 42]. Из цитокининов в основном используют 6-БАП, тидиазурон (TDZ), из ауксинов — НУК [40, 45], ИМК [39, 44], 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) [42].

Важно отметить, что среди зарубежных исследователей [39, 40] нет единого мнения об эффективности применения в регенерации побегов TDZ по сравнению с БАП, о типе экспланта (целые листья, с нанесенными на них поперечными разрезами или сегментированные) и о способе культивирования эксплантов (абаксиальной или адаксиальной поверхностью вверх).

Высокий процент регенерации наблюдался у целых листовых эксплантов черешни (с нанесенными на них поперечными разрезами вдоль центральной жилки листа), которые помещали абаксиальной (нижней) поверхностью вверх на среду WPM, дополненную 2,27 или 4,54 μM TDZ + 0,27 μM НУК [40].

С другой стороны, в работе [39] показано, что БАП более эффективен, чем TDZ, в регенерации растений из листьев вишни и черешни а также то, что БАП и НУК в концентрации 2 мг/л и 1мг/л являются оптимальной комбинацией регуляторов роста растений вишни и черешни. Наибольшая частота регенерации была получена на среде WPM, хотя она стимулировала каллусогенез больше, чем среды MS, QL, DKW. Выявлена зависимость эффективности каллусообразования от типа листовых сегментов. Так, наиболее высокие показатели каллусообразования отмечены на средних листовых сегментах; наиболее низкие — на верхушечных сегментах и прямая регенерация (без образования каллуса) отмечена на базовых сегментах.

Адвентивная регенерация вишни черной (*Prunus serotina Ehrh.*) происходила чаще при культивировании эксплантов листьев на среде WPM, дополненной TDZ по сравнению с модифицированной средой DKW [44].

На эффективность адвентивной регенерации дикой вишни (*Prunus avium L.*) существенное влияние оказывал размер экспланта. Результаты показали, что размер листового экспланта имеет критическое значение для образования адвентивных побегов, листья длиной 3-5 мм формировали наибольшее число адвентивных побегов. Для адвентивной регенерации дикой вишни использовалась среда WPM, дополненная 0,54 mM НУК и 4,4 mM TDZ [45].

Соматический эмбриогенез

Еще одним методом микроклонального размножения растений *in vitro* является соматический эмбриогенез — процесс формирования зародышеподобных структур из соматических (неполовых) клеток. Соматический зародыш — независимая двухполюсная структура, физически не прикрепленная к ткани, из которой образуется структура, в которой одновременно развиваются апексы стебля и корня.

Образование соматических зародышей в культуре клеток, тканей и органов может происходить прямым или косвенным путем. Прямой соматический эмбриогенез — формирование вегетативного зародыша из одной или нескольких клеток ткани экспланта без стадии образования промежуточного каллуса. Косвенный эмбриогенез состоит из нескольких этапов: помещение экспланта в культуру, последующая стимуляция роста каллуса и формирование из каллусных клеток предзародышей, перенос каллуса на питательную среду без факторов роста для формирования биполярных зародышей из предзародышей [9].

В работе [48] исследовалась возможность регенерации растений из каллусов, полученных из корней подвоев вишни. Каллус получали либо из срезанных корешков, либо из целых растений, выращенных в стерильных условиях при микроклонировании побегов вишни. У подвоя вишни Кольт каллус, полученный из корней интактных растений, образовывал побеги и эмбриоидо-подобные структуры. Каллусы вишни культивировали на среде Мурасиге—Скуга, дополненной БАП, ГК и НУК. Частота образования побегов была выше, чем у анализируемой параллельно яблони. Растения-регенеранты были размножены через культуру тканей и пересажены в почву. Саженьцы растений-регенерантов, полученные из каллусов подвоя вишни по фенотипу, не отличались от исходных подвоев.

Индукцию соматического эмбриогенеза у сортов вишни (*Prunus cerasus* L.) наблюдали при культивировании эксплантов на среде Мурасиге—Скуга, дополненной различными комбинациями ауксинов и цитокининов [49]. Соматический эмбриогенез в основном происходил, когда использовали комбинацию 2,4-Д и кинетин. Индукция соматического эмбриогенеза также отмечена при добавлении 0,1 мг/л ИМК в индуктивную среду. Использование НУК или 6-БАП уменьшало индукцию соматического эмбриогенеза и увеличивало частоту косвенной регенерации у сортов вишни (*Prunus cerasus* L.).

На сегодняшний день самым надежным способом получения генетически идентичного потомства считается микроклональное размножение плодовых косточковых культур пазушными почками по сравнению с соматическим эмбриогенезом, размножением адвентивными почками и косвенным морфогенезом.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Полевой В. В., Чиркова Т. В., Лутова Л. А. и др. Практикум по росту и устойчивости растений: Учебное пособие. СПб., 2001. С. 208.
2. Сорокина И. К., Старичкова Н. И., Решетникова Т. Б., Гринь Н. А. Основы биотехнологии растений. Культура растительных клеток и тканей: Учебное пособие. 2002. С. 45.

-
3. Чернец А. М., Абраменко Н. М., Стаканова Р. В. Разработка метода длительного хранения *in vitro* безвирусных клонов плодовых пород и земляники // Тезисы докладов международной конференции: Биология культивируемых клеток и биотехнология. Новосибирск, 1988.
 4. Романова Н. П., Ульянова Е. К. К вопросу о хранении мериклонов земляники *in vitro* // Научно-технический бюллетень Научно-исследовательского института растениеводства имени Н. И. Вавилова. Л., 1990. Вып. 204. С. 75–79.
 5. Орлова С. Ю. Биологические особенности и селекционная ценность сортов вишни в условиях северо-запада России: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2002. С. 20.
 6. Niino Takao, Tashiro Kazuo, Suzuki Mitsuteru, Ohuchi Susumu, Magoshi Jun, Akihama Tomoya. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification // *Scientia Horticulturae*. 1997. Vol. 70. P. 155–163.
 7. Высоцкий В. А. Культура изолированных тканей и органов плодовых растений: оздоровление и микрклональное размножение // Сельскохозяйственная биология: Ежемесячный научно-теоретический журнал. М., 1983. № 7. С. 42–47.
 8. Фаустов В. В., Олешко Е. В., Жаркова И. В., Асадулаев З. М., Шарафутдинов Х. В., Исмаил Х. Микрклональное размножение вишни // Известия ТСХА. М., 1988. Выпуск 5. С. 131–148.
 9. Биотехнология растений: культура клеток // Пер. с англ. В. И. Негрука / Под ред. Р. Г. Бутенко. М., 1989. С. 233.
 10. Деменко В. И., Трушечкин В. Г. Размножение вишни методом *in vitro* // Сельскохозяйственная биология: Ежемесячный научно-теоретический журнал. М., 1983. № 7. С. 51–53.
 11. Кашин В. И., Борисова А. А., Приходько Ю. Н., Суркова О. Ю., Унадышев М. Т. и др. Технологический процесс получения безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур: Методические указания. М., 2001. С. 97.
 12. Шипунова А. А. Клональное микроразмножение плодовых растений: Автореф. дис. ... канд. сельскохозяйственных наук. М., 2003. С. 24.
 13. Трушечкин В. Г., Высоцкий В. А., Олешко Е. В. Микрклональное размножение сортов и подвоев косточковых культур: Методические указания. М., 1983. С. 16.
 14. Lane W. D. Regeneration of pear plants from shoot meristem tips // *Plant Sci. Letters*. 1979. Vol. 16. № 2/3. P. 337–342.
 15. Fossard R. A., Bourne R. A. Reducing tissue culture costs for commercial propagation // *Tissue culture for horticultural purposes*. Acta Hort. 1977. Vol. 78. P. 37–44.
 16. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / Под ред. Е. Н. Джигадло. Орел, 2005. С. 50.
 17. Олешко Е. В. Особенности клонального микроразмножения подвоев и сортов вишни: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1985. С. 15.
 18. Хаак Э. Р., Нууст Ю. О. Клональное микроразмножение косточковых культур // Садоводство и виноградарство. М., 1989. № 1. С. 27–29.
 19. Дудченко О. П. Регенерация в культуре изолированных меристем сливы // Тезисы докладов Международной конференции «Биология культивируемых клеток и биотехнология 2». Новосибирск, 1988. С. 358.
 20. Корнацкий С. А., Высоцкий В. А., Трушечкин В. Г. Проблемы клонального микроразмножения косточковых культур // Достижения в плодоводстве в Нечерноземной зоне РСФСР: Сб. науч. трудов. М., 1991. С. 104–116.
 21. Индукция морфогенеза и тканевая селекция плодовых и ягодных культур: Методические рекомендации / Под ред. В. Е. Перфильева. 1996. С. 73.
 22. Свитайло А. М., Бондаренко П. Е., Шевчук Н. С. Клональное микроразмножение подвоев и сортов плодовых культур // Тезисы докладов Международной конференции «Биология культивируемых клеток и биотехнология 2». Новосибирск, 1988. С. 346.

-
23. Трушечкин В. Г., Высоцкий В. А., Корнацкий С. А. Клональное микроразмножение косточковых культур в системе производства оздоровленного посадочного материала // Тезисы докладов Международной конференции: Биология культивируемых клеток и биотехнология 2. Новосибирск. 1988. С. 319-320.
24. Hammatt N., Grant N. J. Micropropagation of mature British wild cherry // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1997. Vol. 47. P. 103-110.
25. Джигаadlo М. И. Использование биотехнологических и биофизических методов в селекции и сорторазведении плодовых и ягодных культур: Автореф. дис. ... канд. сельскохозяйственных наук. Мичуринск, 2003. С. 25.
26. Ruzic D., Saric M., Cerovic R., Culafic I. Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 in vitro // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2000. Vol. 63. P. 9-14.
27. Корнацкий С. А. Особенности клонального микроразмножения сливы в системе оздоровленного посадочного материала: Автореф. дис. ... канд. сельскохозяйственных наук. М., 1991. С. 24.
28. Джигаadlo М. И., Джигаadlo Е. Н. Размножение вишни методом верхушечных меристем // Улучшение сортимента и прогрессивные приемы возделывания плодовых и ягодных культур: Сборник. Тула, 1988. С. 65-68.
29. Высоцкий В. А., Олешко Е. В. Совершенствование питательной среды для клонального микроразмножения вишни // Агротехника и сортоизучение плодовых культур: Сб. науч. трудов. М., 1985. С. 72-76.
30. Чернец А. М. Влияние минерального питания на интенсивность пролиферации сортов вишни in vitro // Тезисы докладов Международной конференции «Биология культивируемых клеток и биотехнология 2». Новосибирск, 1988. С. 343.
31. Неделчева С., Ганева Д. Размножение in vitro на три вегетативни подложки от рода *Prunus* // Растен. науки. 1985. Т. 22. № 8. С. 98-104.
32. Boleriola-Lucas C., Millins M. G. Micropropagation of two French prune cultivars (*Prunus domestica* L.) // Agronomie. 1984. Vol. 4. № 5. P. 473-477.
33. Высоцкий В. А., Олешко Е. В. Использование микропрививок при клональном микроразмножении косточковых культур // Сельскохозяйственная биология. М., 1988. № 4. С. 75-77.
34. Плаксина Т. В. Использование биотехнологии в селекции вишни на Алтае // Мат-лы научно-практической конференции, посвященной 70-летию НИИСС им. М. А. Лисавенко: Проблемы устойчивого развития садоводства Сибири. Барнаул, 2003. С. 108-110.
35. Высоцкий В. А. Действие некоторых регуляторов роста на изолированные меристематические верхушки черной смородины // Плодоводство и ягодоводство нечерноземной полосы: Сборник. М. 1979. Том IX. С. 101-107.
36. Лутова Л. А. Биотехнология высших растений: Учебник. СПб., 2003. С. 227.
37. Высоцкий В. А. О генетической стабильности при клональном микроразмножении плодовых и ягодных культур // Сельскохозяйственная биология. 1995. № 5. С. 57-63.
38. De Klerk G. -J. Arnholdt-Schmitt B., Lieberei R. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects // Biologia Plantarum. Vol. 39. № 1. 1997. P. 53-66.
39. Tang H., Ren Z., Reustle G., Krczal G. Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars // Scientia Horticulturae. 2002. Vol. 93. P. 235-244.
40. Bhagwat B., David Lane W. In vitro shoot regeneration from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) 'Lapins' and 'Sweetheart' // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Netherlands. 2004. Vol. 78. P. 173-181.
41. Gentile A., Monticelli S., Damiano C. Adventitious shoot regeneration in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] // Plant Cell Reports. 2002. Vol. 20. P. 1011-1016.
42. Takashina T., Nakano H., Kato R. Efficient plant regeneration culture from leaf explants of in vitro-grown sweet cherry // Acta Horticulturae: XXVI International Horticultural Congress: Genetics and Breeding of Tree Fruits and Nuts. P. 622.

-
43. *Burgos L., Alburquerque N.* Ethylene inhibitors and low kanamycin concentrations improve adventitious regeneration from apricot leaves // *Plant Cell Reports*. 2003. Vol. 21. P. 1167–1174.
44. *Hammatt N., Grant N. J.* Shoot regeneration from leaves of *Prunus serotina* Ehrh. (black cherry) and *P. avium* L. (wild cherry) // *Plant Cell Reports*. 1998. Vol. 17. P. 526–530.
45. *Grant Neil J., Hammatt Neil.* Adventitious shoot development from wild cherry (*Prunus avium* L.) leaves // *New Forests*. Netherlands. 2000. Vol. 20. P. 287–295.
46. *James D. E., Possey A. J., Malhotro S. B.* Organogenesis in callus derived from stem and leaf tissues of apple and cherry rootstocks // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1984. Vol. 3. № 4.
47. *Тюленев В. М., Нафталиев Н. М., Осипова Л. В., Распоргуев С. Л.* Клональное микроразмножение ценных генотипов плодовых культур // Тезисы докладов Международной конференции «Биология культивируемых клеток и биотехнология 2». Новосибирск, 1988. С. 320.
48. *Jones O. P., Jacqueline A. Gayner and Watkins R.* Plant regeneration from callus tissue cultures of the cherry rootstock Colt (*Prunus avium* × *P. pseudocerasus*) and the apple rootstock M. 25 (*Malus pumila*) // *The Journal of Horticultural Science*. England. 1984. Vol. 59. № 4. P. 463–467.
49. *Tang Haoru, Ren Zhenglong, Krczal Gabi.* Somatic embryogenesis and organogenesis from immature embryo cotyledons of three sour cherry cultivars (*Prunus cerasus* L.) // *Scientia Horticulturae*. 2000. Vol. 83. P. 109–126.

V. Rogovaia, M. Gvozdev

IN VITRO CLONAL MICROPROPAGATION OF STONE-FRUIT CULTURES

The review is focused on principal stages and methods of in vitro clonal micropropagation of stone-fruit cultures. Special emphasis is laid on auxiliary bud propagation technique and method of adventitious shoot regeneration from leaf explants of sour cherry, cherry, peach and apricot. Some aspects of plant material testing for virus infections have been reviewed as well as certain problems of genetic stability preservation depending on propagation model.