

УДК 582:581(082)
ББК 28.59я43
И73

Редакционная коллегия:

д.б.н., чл.-корр. НАН Беларуси *В. В. Титок* (ответственный редактор),
к.б.н. *П. Н. Белый*; к.б.н. *И. М. Гаранович*; д.б.н. *Н. В. Гетко*;
к.б.н. *Л. А. Головченко*; *С. М. Кузьменкова*; д.б.н. *Е. Н. Кутас*;
к.б.н. *Н. М. Лунина*; к.б.н. *О. В. Чижик*; к.б.н. *А. П. Яковлев*

Рецензенты:

доктор биологических наук, Ботанический институт
имени В. Л. Комарова Российской академии наук *К. Г. Ткаченко*;
кандидат биологических наук, Институт экспериментальной
ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси
А. В. Пугачевский

Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия флоры : материалы международной научной конференции, посвященной 90-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (Минск, 28 июня – 1 июля 2022 г.). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. редкол.: В.В. Титок [и др.] – Минск : Белтаможсервис, 2022. – 420 с.

ISBN 978-985-7004-75-1

В сборнике представлены материалы международной научной конференции, посвященной 90-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. Часть 2: секция 3 «Биотехнологические и молекулярно-генетические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений», секция 4 «Решение вопросов защиты растений в ботанических садах», секция 5 «Научное, прикладное и просветительское значение ботанических коллекций» и секция 6 «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства».

УДК 582:581(082)
ББК 28.59я43

ISBN 978-985-7004-75-1 (ч. 2)
ISBN 978-985-7004-72-0

© ГНУ «Центральный ботанический сад
Национальной академии наук Беларуси», 2022
© Оформление. РУП «Белтаможсервис», 2022

БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ *VACCINIUM VITIS IDAEA* L. ДЛЯ ЦЕЛЕЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Чижи́к О. В., Юхи́мук А. Н., Шабуня П. С., Мазур Т. В., Решетников В. Н.

Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Беларусь
chizhikolga17@gmail.com

Резюме. Проведен скрининг растений *Vaccinium vitis idaea* L. на повышенное накопление вторичных метаболитов (в т. ч. арбутина). Отобраны перспективные для получения БАВ сорта – Koralle, Rubin, Red Pearl, Mazovia, Erntesegen. Разработаны генетические паспорта с использованием маркерной системы SCoT. Из листовой и стеблевой ткани растений отобранных генотипов получены каллусные культуры. Выявлено, что наиболее перспективными с целью получения сырья (биомассы) для косметической и фармацевтической промышленности являются каллусы брусники сортов Mazovia и Red Pearl. Впервые получены протеомные карты дифференцированных и дедифференцированных тканей растений брусники с высоким накоплением БАВ, выявлены потенциальные маркеры видовой, сортовой и тканевой принадлежности.

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR GENETIC ASPECTS OF *VACCINIUM VITIS IDAEA* L. STUDYING FOR THE PURPOSES OF BIOTECHNOLOGY

Chizhik O. V., Yukhimuk A. N., Shabunya P. S., Mazur T. V., Reshetnikov V. N.

State Scientific Institution “Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus”, Minsk, Belarus
chizhikolga17@gmail.com

Summary. *Vaccinium vitis idaea* L. plants were screened for the secondary metabolites (including arbutin) accumulation. The promising cultivars were selected – Koralle, Rubin, Red Pearl, Mazovia, Erntesegen. Genetic passports of selected cultivars were elaborated using the SCoT marker system. Callus cultures from leaf and stem tissue of selected lingonberry plants were obtained. It was found that the most promising for further study are the calluses of Mazovia and Red Pearl cultivars in order to obtain raw materials (biomass) for the cosmetic and pharmaceutical industries. For the first time a proteomic maps of lingonberry differentiated and dedifferentiated tissues with high level of biologically active substances accumulation have been obtained and the potential protein markers of specie’s, cultivar’s and tissue’s accessory have been determined.

Необходимость получения экологически чистого сырья для развития промышленности и медицины требуют новых современных подходов. Клеточная биотехнология позволяет не только удешевить лекарственные средства, но и получить препараты более высокого качества. Однако, чтобы контролировать биосинтез целевых веществ, продуцируемых растением, необходимо знать не только его метаболомику, но и определяющие ее геномику и протеомику. Брусника обыкновенная (*Vaccinium vitis-idaea* L.) содержат широкий спектр физиологически ценных соединений различной химической природы, что служит основаниям для ее использования в качестве источника вторичных метаболитов [1,2].

Методом ВЭЖХ проведен скрининг растений брусники разных таксонов на повышенное накопление вторичных метаболитов (в т. ч. арбутина). Показано, что содержание БАВ в листовой ткани брусники лесной (контроль) превышает таковое у сортовой. Однако исследованные образцы имеют сортовые особенности: сорт Рубин содержит наибольшее количество арбутина и эпикатехина, превышающее таковое в контроле (на 11,8 % и 23 %, соответственно), сорт Мазовия – преобладающее количество хлорогеновой кислоты и проантоцианидина, сорт Коралл – кверцитина. С учетом полученных результатов были отобраны таксоны, перспективные для получения БАВ – брусника обыкновенная сортов Koralle, Rubin, Red Pearl, Mazovia, Erntesegen.

Для представителей видов и подвидовых таксонов рода *Vaccinium* L. разработаны генетические паспорта с использованием маркерной системы SCoT (Start Codon Targeted) [3, 4].

Таблица 1. Молекулярно-генетические паспорта подвидовых таксонов *Vaccinium vitis-idaea* L. с примером SCoT-18

Таксоны	ДНК-маркеры
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. сорт <i>Коралл</i>	SCoT18 ₁₅₂₅ ³ , SCoT18 ₁₃₀₁ ² , SCoT18 ₁₀₇₃ ³ , SCoT18 ₈₇₄ ² , SCoT18 ₇₀₁ ² , SCoT18 ₆₅₈ ³ , SCoT18 ₅₀₁ ³ , SCoT18 ₃₉₉ ³
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. сорт <i>Рубин</i>	SCoT18 ₁₈₈₈ ³ , SCoT18 ₁₆₅₃ ³ , SCoT18 ₁₅₂₅ ³ , SCoT18 ₁₃₀₁ ² , SCoT18 ₁₀₇₃ ³ , SCoT18 ₈₇₄ ² , SCoT18 ₇₀₁ ² , SCoT18 ₆₅₈ ³ , SCoT18 ₅₀₁ ³ , SCoT18 ₄₆₁ ³
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. сорт <i>Эрнтезеген</i>	SCoT18 ₁₈₈₈ ³ , SCoT18 ₁₃₀₁ ² , SCoT18 ₁₀₇₃ ³ , SCoT18 ₈₇₄ ² , SCoT18 ₇₀₁ ² , SCoT18 ₅₀₁ ³ , SCoT18 ₄₆₁ ³ , SCoT18 ₃₉₉ ³
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. сорт <i>Мазовия</i>	SCoT18 ₁₅₂₅ ³ , SCoT18 ₁₃₀₁ ² , SCoT18 ₁₀₇₃ ³ , SCoT18 ₈₇₄ ² , SCoT18 ₇₀₁ ² , SCoT18 ₆₅₈ ³ , SCoT18 ₅₀₁ ³ , SCoT18 ₃₉₉ ³
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	SCoT18 ₁₅₂₅ ³ , SCoT18 ₁₃₀₁ ² , SCoT18 ₁₀₇₃ ³ , SCoT18 ₈₇₄ ² , SCoT18 ₇₀₁ ² , SCoT18 ₆₅₈ ³ , SCoT18 ₅₀₁ ³ , SCoT18 ₄₆₁ ³
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. var. <i>minus</i>	SCoT18 ₁₈₈₈ ³ , SCoT18 ₁₇₄₆ ³ , SCoT18 ₁₅₂₅ ³ , SCoT18 ₁₃₀₁ ² , SCoT18 ₈₇₄ ² , SCoT18 ₇₀₁ ² , SCoT18 ₆₅₈ ³ , SCoT18 ₅₀₁ ³

Из отобранных перспективных таксонов брусники получены *in vitro* и каллусные культуры из листовой и стеблевой ткани растений. Изучено влияние типа экспланта, регуляторов роста в питательной среде и условий культивирования на ростовые параметры каллуса. Для каждого исследуемого сорта растения и типа каллуса (листового, стеблевого) определен гормональный состав питательной среды, на которой накопление БАВ было наибольшим. Определено, что каллус, инициированный из стеблевых эксплантов, имеет более высокие значения индекса роста по сравнению с каллусом, инициированным из листовых эксплантов на средах одного и того же состава. Выявлено, что наиболее перспективными для дальнейшего изучения с целью получения сырья (биомассы) для косметической и фармацевтической промышленности являются каллусы брусники сортов *Mazovia* и *Red Pearl*.

Белки являются важными биохимическими параметрами для оценки генетического разнообразия и контроля морфологических характеристик растений. Белковые маркеры широко используются в селекции, для сохранения генетических ресурсов, выявления ферментов синтеза БАВ, исследования функционирования генома.

Впервые получены протеомные карты дифференцированных и дедифференцированных тканей растений брусники обыкновенной, характеризующихся высоким накоплением БАВ, а также каллусных культур, инициированных из листовой и стеблевой ткани этих растений.

Общую фракцию клеточных белков листовой ткани брусники получали по [5, 6]. 1-е направление 2D-электрофореза – изоэлектрофокусирование на IPG – стрипах (pI 3–10 L, Bio-Rad), проводили на автоматической станции Protean i12 IEF Cell (Bio-Rad). 2-е направление – SDS-электрофорез по Laemmli [7] – на готовых гелях Criterion TGX Precast Midi Protein Gel (Bio-Rad).

На протеомных картах общего пула белков листовой ткани брусники наблюдали сходные по молекулярным массам группы белков, а также дифференциально экспрессирующиеся отдельные белки, характерные для вида *Vaccinium vitis-idaea* L. и претендующие на роль маркерных белков этого вида. В результате скрининга протеомов брусники также были выявлены дифференциально экспрессирующиеся белки, которые могут претендовать на роль белков-маркеров сортовой принадлежности.

Было показано, что каллусы, инициированные из определенного типа ткани (лист, стебель), содержат белки, характерные для того же типа ткани, из которой был получен каллус. При сравнении электрофореграмм общего пула белков листовой ткани и листового каллуса брусники обнаружены ферменты фотосинтеза: белки, входящие в состав большой субъединицы РБФК, белки субъединицы НАДФ-дегидрогеназы и цитохрома b6. Для листовой ткани – это белок с Мм 51,3 кДа (Ribulose biphosphate carboxylase large chain) и Мм 25,3 кДа (Cytochrome b6), для листового каллуса – белок с Мм 45,2 кДа (предположительно, NADH dehydrogenase subunit F) и Мм 25,3 кДа (Cytochrome b6).

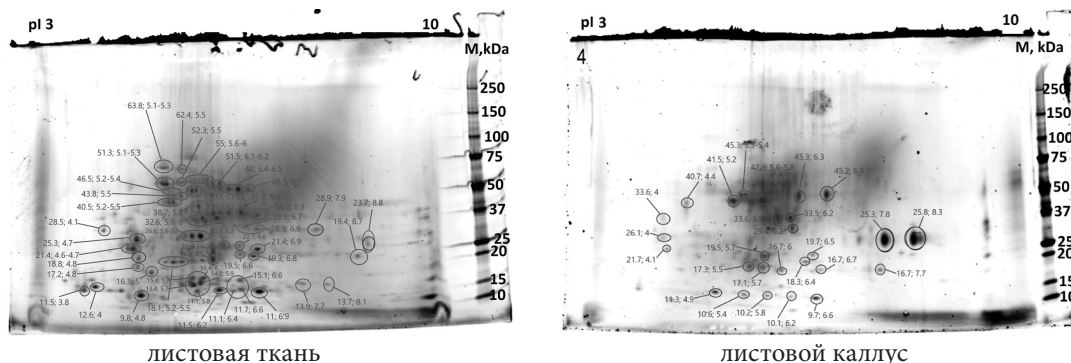


Рис. 1. Протеомные профили общего пула белков *Vaccinium vitis-idaea* L (сорт Koralle)

Сравнительный протеомный анализ общего пула белков каллусных культур брусники обыкновенной разных таксонов, инициированных из различных типов ткани (лист, стебель), позволил определить белки, претендующие на роль потенциальных маркеров происхождения каллуса (листовой, стеблевой).

На протеомной карте листового каллуса брусники *Vaccinium vitis-idaea* subsp.minus обнаружены 4 изоформы основных белков, лежащих в диапазоне pI 8,7–9,5 с Мм 46,6; 48,0; 48,5 и 50,5 кДа, предположительно, ферменты фотосинтеза и антоцианин 5-ароматическая ацилтрансфераза, претендующие на роль маркерных для листового каллуса брусники.

На протеомной карте стеблевого каллуса отмечен основной белок с Мм 47,3 кДа, pI 9,4, характеризующийся сильной экспрессией – потенциальный маркер каллуса стеблевого происхождения.

Полученные результаты носят фундаментальный характер и развивают биологию ценных ягодных культур, а также научные подходы к их использованию в народном хозяйстве. Работа выполнена в рамках ГПНИ и договора № Б22АРМ-026.

Список литературы

1. Каталог лекарственных растений – Брусника обыкновенная. – URL: http://www.amed.ru/medicine-chest/medicinal-plant/id_1057/ (дата обращения 11.03.2018).
2. Ștefănescu B. E. Phenolic Compounds from Five Ericaceae Species Leaves and Their Related Bioavailability and Health Benefits // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, No. 11. P. 2046.
3. Start Codon Targeted (SCoT) markers provide new insights into the genetic diversity analysis and characterization of Tunisian Citrus species / A. Mahjbi, G. Baraket, A. Oueslati et al. – *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015. – Vol. 61. P. 390–398.
4. Potential of start codon targeted (SCoT) markers to estimate genetic diversity and relationships among Chinese *Elymus sibiricus* accessions / Z. Junchao, X. Wengang, W. Yanrong et al. – *Molecules*, 2015. – Vol. 20. P. 5987–6001.
5. Amme S. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes // *Proteomics*. – 2005. – Vol. 5, No 10. P. 2508–2518.
6. Vincent D., Wheatley M. D., Kramer G. R. Optimization of protein isolation and solubilization for ripe grapes // *Electrophoresis*. – 2006. – No 27. P. 1853–1865.
7. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, No 5259. P. 680–685.

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *CITRUS L.*

Шутова А. Г.¹, Алехна А. И.¹, Шкеленок В. П.²

¹ Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
anna_shutova@mail.ru

² Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Резюме. Для введения в культуру *in vitro* разработана методика стерилизации эксплантов перспективных представителей рода *Citrus L.* и проведен первоначальный подбор сред. На примере *Citrus meyeri*, *Citrus medica* var. *sarcodactylis*, *Citrus limon* 'Скерневицкий' определена эффективность стерилизации с помощью разработанной методики.

MICROPROPAGATION OF PROMISING REPRESENTATIVES OF THE GENUS *CITRUS L.*

Shutava H., Alechna A., Shkelenok V.

Summary. The method for sterilizing explants of promising representatives of the genus *Citrus L.* and the initial selection of media was carried out to develop *in vitro* culture. On the *Citrus meyeri*, *Citrus medica* var. *sarcodactylis*, *Citrus limon* «Skernevitsky» the effectiveness of sterilization was determined according to the developed method.

Для получения качественного посадочного материала цитрусовых может быть использован метод микроклонального размножения, у которого есть ряд преимуществ перед традиционными способами [1]. Это прежде всего возможность одновременно получить больше растений, поскольку микроклональное размножение обеспечивает, как правило, более высокий коэффициент размножения. С культурами *in vitro* можно работать круглогодично, что также увеличивает выход саженцев. Кроме того, использование метода микроклонального размножения позволяет вырастить оздоровленный посадочный материал со сниженной бактериальной и вирусной нагрузкой.

Первые попытки культивирования цитрусовых *in vitro* в мире относятся к 1960-м годам. К настоящему времени достаточно данных об успешном микроклональном размножении различных цитрусовых как в лабораторных, так и в промышленных масштабах [1, 2, 3, 4, 5]. Технология оказалась удачной для таких объектов, как различные сорта лимона, мандарина, лайма, апельсина, цитрона и помело. В СССР первые исследования в этой области были предприняты Бутенко и Шенгелия в 1980-х годах. До настоящего времени исследования по оптимизации условий микро-размножения цитрусовых не прекращаются, о чем свидетельствует множество зарубежных работ в разных странах, в том числе, в Пакистане, Италии, Индии, Бразилии, США, Египте и др. [1].

Есть и некоторые недостатки метода микроклонального размножения, которые необходимо учитывать. Высокую эффективность регенерации у цитрусовых получают при использовании ювенильных эксплантов [6]. Однако такие растения регенеранты обычно имеют сильно выраженные ювенильные черты, и им необходим продолжительный период до вступления в продуктивный возраст. Поэтому перспективным является использование тканей от взрослых растений элитных сортов цитрусовых. Экспланты, полученные от взрослых растений, редко культивируют *in vitro* главным образом из-за высокого уровня их контаминации, низкой морфогенетической способности и малой способности к укоренению регенерантов. Было усовершенствовано несколько методик для микроразмножения взрослых растений цитрусовых культур. Успешно были получены регенеранты из узловых сегментов взрослых растений мандарина, цитранжа, лайма и апельсина [7].

В качестве исходных тканей для введения в культуру *in vitro* у цитрусовых могут применяться черенки с одной или двумя почками, междоузлия, сегменты семядолей или можно использовать трансплантацию тонкого слоя клеток, полученных от эксплантов междоузлий.

Растения – регенеранты из тонкого слоя клеток не имеют морфологических отклонений вследствие того, что они развиваются прямым органогенезом без стадии образования каллуса, что исключает наличие соматональных вариаций [8].

Успех микроразмножения в первую очередь зависит от удачно подобранных методов стерилизации растительного материала. Это один из самых сложных этапов биотехнологического процесса. Этап стерилизации эксплантов цитрусовых проводят по различным методикам. Например, для стерилизации лимона сорта Павловский в статье [9] стерилизацию проводили следующим образом: замачивание в растворе нейтрального детергента (25 мин); промывка проточной водой (15 мин); обработка 96 % этанолом (5 с); 8% раствором гипохлорита натрия (20–30 мин) с последующей промывкой в трех порциях стерилизованной дистиллированной воды (по 5 мин в каждой). Авторы [10] проводили стерилизацию проводили 0,3 % раствором Велтолен в течение 25 мин. Для обезвреживания экзогенной бактериальной и грибковой микрофлоры авторы [11] использовали 70 % раствор этанола, гипохлорит натрия 5 %, 15 % раствор пероксида водорода, сулемы (0,1 %) и отмывали в стерильной воде (5–10 мин). Наибольшая эффективность в опыте отмечена у препарата гипохлорита натрия концентрации 2,5 % и экспозиции 15 минут. В работе [12] стерилизацию растительного материала проводили по следующей схеме: промывка растительного материала в мыльном растворе; обработка 1% раствором «бриллиант» (0,9–1,0 % р-р акрилдиметил аммоний хлорида и 0,8–0,9 % р-р глутарового альдегида и функциональные компоненты) с экспозицией 5–10 мин; обработка 0,1 % р-ром диацета с экспозицией 25 мин; обработка 0,05 % р-ром хлоргексидина с экспозицией 15 мин.

На этапе введения в культуру экспланты высаживаются, как правило, на питательные среды Мурасиге и Скуга (MS) или КМО – MS. В среду добавляют регуляторы роста – нафтилуксусную кислоту (NAA), 6-бензиламинопурин (BAP). Одной из наиболее перспективных является среда MS с добавлением 1,0 мг/л БАП и 0,5 мг/л NAA [13, 14].

На этапе собственно микроразмножения используют среду DKW (Драйвера- Куньюки) с фитогормонами BAP и ГК (гиберелиновая кислота). Хорошие результаты получены на среде DKW с добавлением BAP 2,0 мг/л и ГК 2,0 мг/л [13]. Наиболее оптимальной средой для микроразмножения побегов лимона по мнению авторов [13] явилась среда КМО с добавлением 2 мг/л BAP и 2 мг/л ГК.

В обзоре [1] обобщены 46 литературных источников с вариантами сред для микроразмножения представителей рода *Citrus*. Большинство исследований подтверждают эффективность использования среды MS с добавлением BAP или BAP и NAA. Для лимона также есть данные о эффективности введения кинетина (KIN) в состав среды наряду с BAP и NAA.

Начало роста микропобегов наблюдается, как правило, через одну – две недели после посадки. Появление первого листа происходит через 2–4 недели. Остановка роста эксплантов наблюдается через 5–7 недель после посадки вне зависимости от варианта среды. С каждого материнского экспланта получают около 2,5 дочерних микропобега [1,13].

Материалы и методы исследования. Проведены подбор и оптимизация метода стерилизации эксплантов цитрусовых. Для работы были использованы *Citrus meyeri* Yu. Tanaka, *Citrus medica* var. *sarcodactylis* (Hoola van Nooten) Swingle, *Citrus limon* (L.) Burm. fil. ‘Скерневицкий’. Для введения в культуру *in vitro* использовали молодые побеги текущего года вегетации. В качестве эксплантов использовали сегменты побегов размером 5–10 мм с одним или двумя узлами.

Результаты и обсуждение. В результате подбора оптимального метода стерилизации в качестве оптимальной выбрана следующая схема: 1) промывание эксплантов под проточной водой 10 мин, 2) обработка мыльным раствором в течение 20 мин при перемешивании на магнитной мешалке, 3) выдерживание в растворе 1 г/л препарата Фалькон для избавления от грибной микрофлоры, 4) выдерживание в дезинфицирующем препарате Deso, содержащем алкилдиметилбензиламмоний, дидецилметиламмоний хлорид, полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, 5) обработка раствором Миксасмин хлор, представляющего собой натриевую соль дихлориоциануровой кислоты. После каждого этапа стерилизации экспланты дважды промывали стерильной дистиллированной водой.

Использовали концентрацию основного стерилизующего компонента, равную 3 % по действующему веществу. Предварительно время стерилизации подбиралось опытным путем и составляло от 2 до 15 мин. В качестве оптимального времени на основании оценки доли стерильных и жизнеспособных эксплантов выбрана продолжительность обработки основным стерилизующим агентом в течение 5 мин. Экспланты высаживались на среды следующего состава:

- 1) MS с добавлением 0,5 мг/л ВАР (0,5 ВАР);
- 2) MS с добавлением 1 мг/л ВАР (1 ВАР), 0,7 мг/л КИН (0,7 КИН), 0,5 мг/л НАА (0,5 НАА);
- 3) WPM (Woody Plant Medium) с добавлением 0,5 мг/л ВАР (0,5 ВАР).

Результаты, отражающие эффективность разработанного метода стерилизации эксплантов представлены в табл. 1.

Таблица 1. Влияние разработанного метода стерилизации на стерильность и жизнеспособность эксплантов в условиях *in vitro*

Объект	Варианты сред					
	MS+0,5 ВАР		MS+1ВАР+0,7КИН +0,5НАА		WPM+0,5 ВАР	
	доля стерильных эксплантов, %	доля жизнеспособных эксплантов, %	доля стерильных эксплантов, %	доля жизнеспособных эксплантов, %	доля стерильных эксплантов, %	доля жизнеспособных эксплантов, %
<i>Citrus meyeri</i>	50	60	75	71	–	–
<i>Citrus medica</i> var. <i>sarcodactylis</i>	100	25	–	–	100	67
<i>Citrus limon</i> «Скерневицкий»	50	50	75	75	–	–

Из таблицы видно, доля стерильных эксплантов, полученных по данному методу, составляла более 50 % для всех объектов исследования. При этом доля жизнеспособных эксплантов, оцененная спустя 2–3 недели, различалась на средах различного состава. В целом разработанный метод стерилизации эксплантов является достаточно эффективным и может использоваться для введения в культуру *in vitro* перспективных представителей рода *Citrus* L.

Список литературы

1. Carimi F., De Pasquale F. Micropropagation of Citrus. In: Jain, S.M., Ishii, K. (eds) Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Forestry Sciences, 2003, 75, 589–619.
2. Starrantino A., Caruso A. *In vitro* culture for citrus micropropagation. Acta Horticulturae, 1988, 227, 444–446.
3. Chiancone B., Germanà M. A. Micropropagation of *Citrus* spp. by organogenesis and somatic embryogenesis. Methods Mol Biol., 2013, 11013:99–118.
4. Goswami K., Sharma R., Singh P.K, Singh G. Micropropagation of seedless lemon (*Citrus limon* L. cv. Kaghzi Kalan) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD markers. Physiol Mol Biol Plants., 2013, 19, 1, 137–145.
5. Ali S., Bushra M. Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.): Effect of explant type and hormone concentration. Acta Bot Croat, 2006, 65, 2, 137–146.

6. Самарина Л. С., Коломиец Т. М., Горшков В. М. Биотехнология цитрусовых культур: достижения и перспективы Садоводство и виноградарство, 2011, 6, 30–34.
7. Barlass M., Skene K. G.M. In vitro plantlet formation from Citrus species and hybrids. Scientia Horticulturae, 1982, 17, 333–341.
8. Самарина Л. С., Коломиец Т. М., Горшков В. М. Оценка регенерационной способности эксплантов цитрусовых *in vitro*. Садоводство и виноградарство, 2016, 6, 27–30.
9. Шибанова Н. Л., Орлова М. В. Микрклональное размножение *Citrus limon* (L.) Osbeck сорта Павловский. Вестник Пермского университета, 2018, 1, 57–61.
10. Самарина Л. С., Коломиец Т. М. Микроразмножение и сохранение лимона в условиях *in vitro*. Аграрные науки и ветеринарная медицина. Наука Кубани, 2013, 3 37–42.
11. Шох С. С., Сич З. Д., Карпук Л. М. Визначення ефективного способу стерилізації рослинних експлантів лайма *Citrus aurantifolia* та сортів лимона *Citrus lemon* для введення в культуру *in vitro*. Агробіологія, 2020, 2, 185–191.
12. Билалова Э. Г., Ишмуратова М. М. Размножение цитрусовых в культуре *in vitro*. Биологические аспекты распространения, адаптации и устойчивости растений. Материалы всероссийской (с международным участием) научной конференции. Изд-во Мордовского ун-та. Саранск, 2016, 53–55.
13. Самарина Л. С. Оптимизация приемов микроразмножения и сохранения лимона *in vitro*. Автореф. дис: ... канд. биол. наук. М., 2013.– 23 с.
14. Bilalova E. G., Sadykova F. V., Ishmuratova M. M. Initial stages of clonal micropropagation *in vitro* of citrus Bashkir breeding. Biomics, 2018, 10, 2, 153 – –156.