УДК 004.416.3:661.162.6:631.53:674.031.632.143

# РАЗРАБОТКА МЕТОДА КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ПОДВОЯ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР ГИЗЕЛА 6 (*PRUNUS CERASUS* ′SCHATTENMORELLE′ X *PRUNUS CANESCENS* BOIS)

**Эдие Сеитвелиевна Сеитмамутова[1], Игорь Владимирович Гавриленко[1], Эльнара Ленуровна Ибадуллаева[1], Юлия Сергеевна Матяш[1], Анжела Владимировна Гавриленко[1], Ирина Анатольевна Алексеева[1], Оксана Владимировна Гончаренко[1], Павел Алексеевич Хватков[1], Сергей Владимирович Долгов[1]**

[1] Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, 298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита, спуск Никитский, 52
E-mail: khvatkov1987@gmail.com

Гизела 6 – один из полукарликовых корнесобственных подвоев косточковых культур, который используют для создания и развития современных интенсивных садов косточковых культур. Размножение подвоя в больших объемах с использованием традиционных методов дорогостояще и трудоемко, что обуславливает применение метода клонального микроразмножения, который позволит за короткий период времени получить огромное количество генетически однородных и безвирусных растений. В результате проведенных исследований был разработан протокол клонального микроразмножения Гизелы 6. Установлено, что питательная среда MS дополненная регуляторами роста 6- БАП ГК3 и ИМК в концентрациях 1 мг/л, 0,5 мг/л и 0,1 мг/л соответственно (на 30 день коэффициент размножения составила 6,5) является наиболее оптимальной средой для культивирования. Наиболее эффективной средой для укоренения является MS, дополненная ИМК в концентрации 4,0 мг/л (на 28 день эффективность ризогенеза достигала 100%). Эффективность адаптации к почвенным условиям защищенного грунта составила 83,3%.

**Ключевые слова:** *адаптация; гиббереллиновая кислота (ГК3); Гизела 6; индолил-3-масляная кислота (ИМК); подвой косточковых культур; 6-бензиламинопурин (6- БАП); in vitro*

## Введение

Косточковые культуры являются одной из наиболее важных групп плодовых культур. В последние годы наблюдается тенденция на восстановление и развитие отечественного производства, что предусматривает увеличение площадей интенсивных садов из саженцев, привитых на низкорослые клоновые подвои. Преимуществом современных клоновых подвоев, помимо высокой продуктивности привитых сортов, являются генетическая однородность, устойчивость к изменению абиотическим и биотическим стрессам, совместимость с широким спектром сортов, легкое размножение вегетативными методами, хорошая развитая корневая система (Kuznetsova F. et al. 2020)

Гизела 6 (*Prunus cerasus* ′Schattenmorelle′ x *Prunus canescens* Bois) – полукарликовый, подвой, перспективный для развития современного интенсивного производства практически всех видов косточковых культур. Размножение плодовых культур в больших объемах с использованием традиционных методов дорогостояще и трудоемко. Масштабы и скорость производства можно увеличить с помощью метода клонального микроразмножения, который позволит за короткий период времени получить огромное количество генетически однородных и безвирусных растений (Orlova, 2019, Aka-Kacar Y et al. 2010).

Процесс микроразмножения состоит из нескольких этапов, на каждом из которых может возникнуть ряд трудностей, связанных со специфической генотипической реакцией организма растения на условия *in vitro* (состав питательной среды, концентрация регуляторов роста и др.) Этап введения в культуру *in vitro* предполагает учет сезонности ростовых процессов, происходящих в растениях. Как правило,

экспланты, отобранные в период активного роста побегов, обладают наибольшей пролиферативной активностью. Ряд авторов отмечают положительное влияние минерального состава питательных сред MS (Murashige, Skoog, 1962), DKW (Driver, Kuniyuki, 1984), QL (Quoirin, M. and Lepoivre, 1977) и их модификации для клонального микроразмножения подвоев косточковых культур. Стоит отметить среду MS и 2MS (двойные макросоли) (1,0 мг/л б-бензиламинопурина (6 —БАП) совместно с 0,1 мг /л гиббереллиновой кислоты (ГКз) и 0,01 мг/л альфа-нафтилуксусной кислоты (НУК)), оказавшуюся эффективной для размножения Гизела 5 (Erbenova. et al. 2001, Ruzic et al. 2000). Согласно Buyukdemirci (2008) среда MS, содержащая 0,5 мг/л 6 —БАП, 0,01 мг/л ИМК и 0,1 мг/л ГК3 была отмечена эффективной средой для размножения. Работы по изучению воздействия 6 — БАП на эффективность микроразмножения подвоя демонстрируют неоднозначные результаты с использованием существенно различных концентраций: 0,5 мг/л; 1,0- 1,5 мг/л, 2,0 мг/л (Song G. Q, 2006, Vinter M. et al 2020, Hossini A. D. et al. 2010, Moghaddam R. N. et al. 2013). Добавление в среду комбинации ИМК 0,01 мг/л или НУК 0,01 мг/л совместно с ГК 0,1 мг/ л и б-БАП приводило к увеличению коэффициента размножения и удлинению побегов (Carolina, et al., 2000). Установлено, что другие регуляторы роста, такие как тидиазурон, малоэффективны для размножения подвоя Гизелы 6 по сравнению с 6 — БАП (Moghaddam R.N. et al., 2013; Ruzic et al., 2000).

Ризогенез побегов подвоев (CAB-6P, MxM 14, PK SK 1, PK SK 2, Гизела 5, Гизела 6) *in vitro* получали культивированием их на средах 1/2 MS, MS, DKW, включающие в состав ИМК в концентрациях 0,5 мг/ л; 1 мг/л или 2 мг/л, 3,5 мг/л (Moghaddam R. N. et al. 2013, Vinter M. et al 2020, Tang H. 2002). Эффективность укоренения варьировала от 35 до 100% в зависимости от подвоев и концентрации регуляторов роста.

Несмотря на обширные и иногда разнящиеся данные ряда исследователей, размножение подвоя Гизела 6 все еще остается актуальной проблемой и нуждается в дополнительных исследованиях. В настоящее время отсутствует единый протокол клонального микроразмножения для подвоя косточковых культур Гизела 6. В связи с чем, целью данной работы является разработка и оптимизация эффективного протокола клонального микроразмножения в культуре тканей *in vitro* клонового подвоя Гизела 6.

## Объекты и методы исследования

В исследовании использовалась форма полукарликового зимостойкого клонового подвоя косточковых культур Гизела 6 *(Prunus cerasus 'Schattenmorelle' x Prunus canescens* Bois).

Маточные растения выращивали в условиях теплицы и производили визуальный контроль зараженности патогенами. Диагностику вирусных заболеваний проводили методом от-ПЦР согласно ГОСТ 59653–2021 с целью обнаружения ряда вирусов: шарки сливы (PPV), хлоротичной пятнистости листьев яблони (ACLSV), карликовости сливы (PDV), некротической кольцевой пятнистости косточковых (PNRSV) и скручивания листьев черешни (CLRV). Образцы РНК экстрагировали из листьев растений с использованием набора Plant Total RNA Kit (Sigma). Каждый образец обрабатывали ДНКазой (Thermo). кДНК синтезировали с использованием Revert Aid Minus Reverse Transcriptase (Thermo) по протоколу производителя с использованием праймеров oligo(dT) 18 и Random (dN) 10.

Для проведения ПЦР использовали следующие пары праймеров для вируса PPV: 5' - CAATAAAGCCATTGTTGGATC – 3' (f) и 5' - CTCTGTGTCCTCTTCTTGTG – 3' (r) (ожидаемый амплификационный фрагмент 313 п.н.) (Sánchez-Navarro et al., 2005), для вируса ACLSV: 5' - CCATCTTCGCGAACATAGC – 3' (f) и 5' - GTCTACAGGCTATTTATTATAAG – 3' (r) (ожидаемый амплификационный фрагмент

632 п.н.) (Sánchez-Navarro et al., 2005), для вируса PDV: 5' - CAACGTAGGAAGTTCACAG – 3' (f) и 5' - GCATCCCTTAAAGGGGCATC – 3' (r) (ожидаемый амплификационный фрагмент 571 п.н.) (Sánchez-Navarro et al., 2005), для вируса PNRSV: 5' - GAACCTCCTTCCGATTTAG – 3' (f) и 5' - GCTTCCCTAACGGGGCATCCAC – 3' (r) (ожидаемый амплификационный фрагмент 346 п.н.) (Sánchez-Navarro et al., 2005), для вируса CLRV: 5' - TCTGAGCATAAATACCCTTTG A – 3' (f) и 5' - GAGGTAAAGTCGGTGCTAT – 3' (r) (ожидаемый амплификационный фрагмент 814 п.н.) (Roy et al., 2005).

Объем ПЦР смеси составлял 10 мкл и содержал 1мкл 10х Taq Turbo buffer, 0.2 мкл 50х dNTPs, по 0.1 мкл 100 пкМ пары праймеров, 0,2 мкл 5 ед/мкл HS Taq – полимеразы, 7,4 мкл mQ при 95 ℃, затем 35 циклов (30 с при 95℃, 45 с 50℃, 1 мин при 72℃) и 10 мин при 72℃. ПЦР- продукты анализировали методом электрофореза в 2.0%-ном агарозном геле.

На этапе введения в культуру *in vitro* отбирали вегетативные почки с однолетних неодревесневвших зеленых побегов, культивируемых в изолированных условиях защищенного грунта. Поверхностную стерилизацию проводили путем погружения в 70% раствор этилового спирта на 40 сек, с последующим погружением в 10% раствор гипохлорита натрия на 15 мин, затем экспланты четырехкратно промывали автоклавированной дистиллированной водой в течение 20 мин. Для введения в культуру ткани использовали среду MS (Murashige, Skoog, 1962), без регуляторов роста добавлением 0,75% (мас./об.) агара (Panraec,Испания), 3 % сахарозы и культивировали при 24±1 °С с 16 – часовым фотопериодом и интенсивности света 4 клюкс. Экспланты периодически осматривали на предмет появления некроза, бактериальной и грибковой контаминации. Спустя 30 дней культивирования пробудившиеся пазушные почки отделяли от узлов с последующим переносом на питательные среды для размножения.

На этапе клонального микроразмножения в условиях *in vitro* был осуществлен эксперимент по подбору наиболее эффективной комбинации среды и регуляторов роста. Использовали 2 типа питательных сред (MS (Murashige, Skoog, 1962), и MJ (Mourenets, 2015), дополненных 6- БАП в концентрациях 0,1, 0,5 и 1,0 мг/л, совместно с ГК в концентрациях 0,1, 0,3 0,5 мг/л и ИМК в концентрациях 0,03, 0,06, и 0,1 мг/л (27 вариантов в трехкратной повторности) (табл.1). Длительность эксперемента - 1 месяц. Учет эффективности размножения оценивали по показателю коэффициента размножения, состоянию побегов (хлороз, витрификация).

Для укоренения микропобегов на питательной среде MS (2% сахароза, 0,75% агар (Panraec, Испания) и pH = 5,7) провели изучение влияния ИМК (1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 и 6,0 мг/л) (табл.2). Длительность эксперемента - 4 недели. Учет эффективности ризогенеза проводили каждую неделю. Всего протестировано в трехкратной повторности по 20 растений для каждого варианта.

Этап адаптации производили в условиях защищенного грунта. Для адаптации, микрорастения высаживали в контейнеры, заполненные стерилизованным нейтрализованным торфяным грунтом «Агробалт-С» и накрывали стрейч–пленкой для создания 100% влажности на 7 дней, при постоянном рассеянном свете, без проветривания, при температуре 24–26°С. В дальнейшем пленку снимали для понижения влажности. Эффективность адаптации растений к условиям *in vivo* учитывали через две недели роста микрорастений при 60% влажности воздуха, температуре 25°С.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью дисперсионного анализа с последующей оценкой по критерию множественных сравнений частных средних Дункана.

## Результаты и обсуждение

В результате ПЦР анализа вирусной инфекции в маточных растениях обнаружено не было. Узлы были успешно введены в культуру *in vitro* с эффективностью 78.4%.

Данные, полученные в результате исследований по изучению влияния комбинаций среды и регуляторов роста на эффективность клонального микроразмножения, показывают, что на всех типах сред с увеличением концентраций регуляторов роста наблюдается повышение коэффициента размножения.

Наиболее высокий показатель эффективности размножения был отмечен в вариантах культивирования Гизелы 6 на питательных средах, дополненных регуляторами роста 6- БАП, ГК и ИМК в концентрациях 1,0 мг/л 0,5 мг/л и 0,1 мг/л соответственно (рис 1). Так на среде MS коэффициент размножения составил 6,5 а на MJ 4,5 (табл. 1).

**Таблица 1**

**Влияние типа питательных сред и комбинаций регуляторов роста на эффективность микроразмножения эксплантов Гизела 6**

***Table 1***

**The influence of the type of nutrient media and combinations of growth regulators on the efficiency of micropropagation of Gisela 6 explants**

| **№ п/п** | **Регуляторы роста** / Growth regulators | | | **Коэффициент размножения в зависимости от питательной среды** / Reproduction coefficient depending on the nutrient medium | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **6- БАП мг/л** / 6-BAP mg/l | **ГК3 мг/л** / GA3 mg/l | **ИМК мг/л** / IBA mg/l | MS(3%cax) | MJ(3%cax) |
| 1 | 0,1 | 0,1 | 0,03 | 2,6 | 2,0 |
| 2 | | | 0,06 | 2,8 | 2,2 |
| 3 | | | 0,1 | 3,0 | 2,3 |
| 4 | | 0,3 | 0,03 | 3,0 | 2,4 |
| 5 | | | 0,06 | 3,2 | 2,5 |
| 6 | | | 0,1 | 3,3 | 2,8 |
| 7 | | 0,5 | 0,03 | 3,3 | 2,7 |
| 8 | | | 0,06 | 3,5 | 2,8 |
| 9 | | | 0,1 | 3,7 | 2,9 |
| 10 | 0,5 | 0,1 | 0,03 | 3,8 | 3,0 |
| 11 | | | 0,06 | 3,9 | 3,0 |
| 12 | | | 0,1 | 4,0 | 3,2 |
| 13 | | 0,3 | 0,03 | 4,0 | 3,3 |
| 14 | | | 0,06 | 4,2 | 3,5 |
| 15 | | | 0,1 | 4,2 | 3,6 |
| 16 | | 0,5 | 0,03 | 4,4 | 3,5 |
| 17 | | | 0,06 | 4,5 | 3,8 |
| 18 | | | 0,1 | 4,8 | 3,9 |
| 19 | 1,0 | 0,1 | 0,03 | 4,9 | 3,7 |
| 20 | | | 0,06 | 5,0 | 3,8 |
| 21 | | | 0,1 | 5,1 | 3,9 |
| 22 | | 0,3 | 0,03 | 5,2 | 3,9 |
| 23 | | | 0,06 | 5,2 | 4,0 |
| 24 | | | 0,1 | 5,3 | 4,2 |
| 25 | | 0,5 | 0,03 | 5,2 | 4,1 |
| 26 | | | 0,06 | 5,5 | 4,2 |
| 27 | | | 0,1 | **6,5** | **4,5** |
| нср | | | | 0,461 | |
| Ст. ошибка | | | | 0,163 | |

Стоит отметить, что концентрации 6-БАП превышающие 1,0 мг/л (1,5мг/л и 2,0 мг/л) приводили к ветрификации растений и деформации листа. Данные не приводились в таблицу 1.

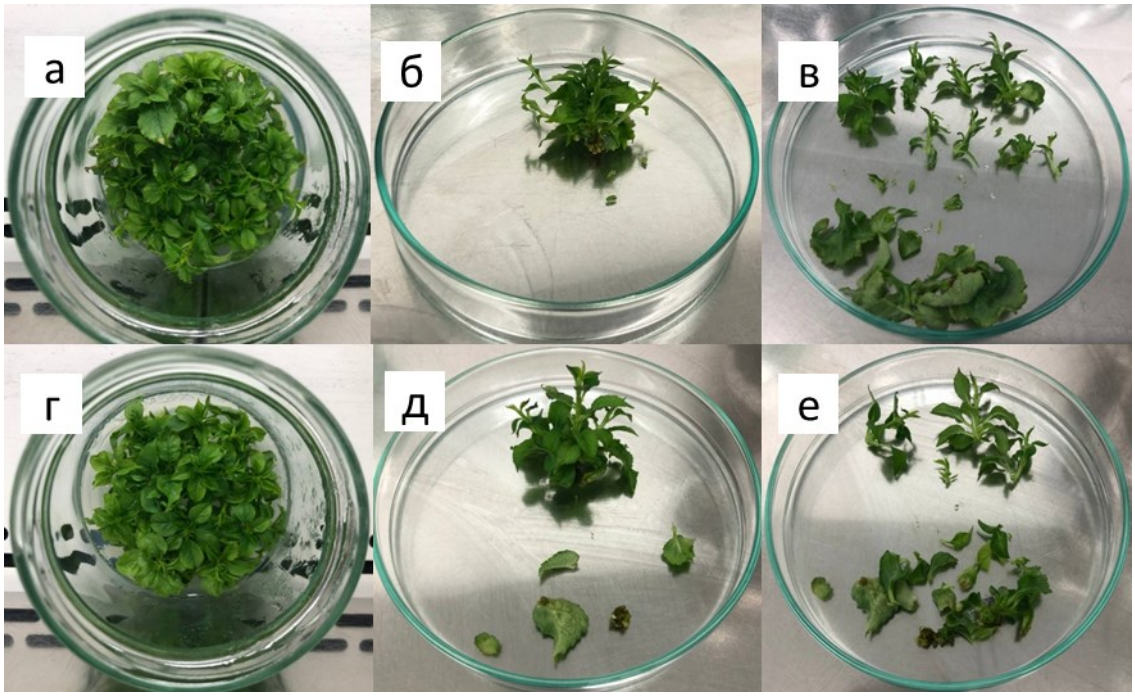


**Рис. 1 Внешний вид растений, выращенных на разных вариациях питательной среды на 30 день культивирования, где (а, б, в) среда MS и (г, д, е) питательная среда MJ (а, г- микропобеги, культивируемые в банке; б, д- типовой эксплант; в, е- разделение типового экспланта), дополненных регуляторами роста 6- БАП, ГК и ИМК в концентрациях 1,0 мг/л 0,5 мг/л и 0,1 мг/л соответственно**

**Fig. 1 Habitat of plants reproduction on the 30th day depending on the type of nutrient medium, where (a, b, c) MS medium and (d, e, f) MJ nutrient medium (a, g - microshoots cultivated in a jar; b, e - typical explant; c, e - division of a typical explant), supplemented with growth regulators 6-BAP, GA and IBA at concentrations of 1.0 mg/l, 0.5 mg/l and 0.1 mg/l, respectively**

В ходе исследования влияния различных концентраций ИМК на эффективность корнеобразования Гизела 6 в условиях *in vitro* было установлено, что наиболее эффективное образование корней происходит на среде MS с добавлением ИМК 4,0 мг/л.

**Таблица 2**

**Влияние ИМК на эффективность укоренения микрорастений Гизелы 6***

***Table 2***

**The effect of IBA on the rooting efficiency of Gisela 6 microplants***

| **Концентрация ИМК, мг/л** / IBA concentration, mg/l | **Период культивирования растений на среде для индукции ризогенеза, дней** / Period of cultivation of plants on the medium for the induction of rhizogenesis, days | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **7 дн.** / 7 days | **14 дн.** / 14 days | **21 дн.** / 21 days | **28 дн.** / 28 days |
| 1.0 | 0.00a | 0.00a | 0.00a | 0.00a |
| 2.0 | 0.00a | 0.00a | 0.00a | 0.00a |
| 3.0 | 0.00a | 0.00a | 14.9b | 73.2ef |
| 4.0 | 0.00a | 80.2fgh | 98.7k | 100l |
| 5.0 | 0.00a | 44.8cd | 87.5hi | 89.9ij |
| 6.0 | 0.00a | 44.9d | 85ghi | 94.9j |

*Разные буквы указывают на достоверную принадлежность данных к одному (в случае одной буквы) или множеству (в случае нескольких букв) кластеру по критерию множественных сравнений Дункана.
Данные по эффективности корнеобразования представлены в %

У эксплантов культивируемых на средах, содержащих 1,0 или 2,0 мг/л ИМК корнеобразования не наблюдалось. В целом эффективность укоренения варьировала от 73,2 до 100% (табл. 2).

При использовании концентраций от 4,0 до 6,0 мг/л ИМК ризогенез начинался на 14-й день и достигал 90-100% через две недели. На среде с добавлением 3,0 мг/л ИМК ризогенез начинался через 21 день, а на 4 неделю составлял 73,2%. Наиболее длинные и функциональные корни формировались у эксплантов культивируемых на среде с концентрацией ИМК 4,0 мг/л (рис. 2 г).

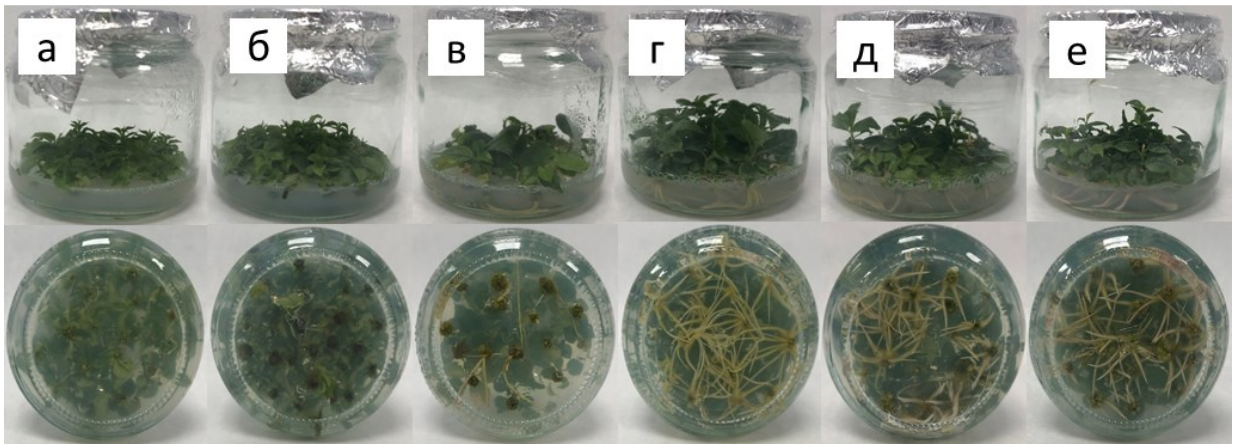


**Рис. 2 Образование корней у побегов *in vitro* Гизела 6 спустя 28 дней, в зависимости от концентрации ИМК, где а- 1,0 мг/л; б- 2,0 мг/л; в- 3,0 мг/л; г- 4,0 мг/л; д- 5,0 мг/л; е- 6,0 мг/л.**
**Fig. 2 Root formation in shoots *in vitro* Gisela 6 after 28 days, depending on the concentration of IBA, where a - 1.0 mg/l; b - 2.0 mg/l; c - 3.0 mg/l; g - 4.0 mg/l; d - 5.0 mg/l; e - 6.0 mg/l**

Полученные микрорастения успешно адаптировали (рис. 3) и уже на 10 день отмечали образование новых листьев (рис. 3 в). Эффективность адаптации к почвенным условиям составила 83,3%.

**Рис. 3 Адаптация растений в теплице, где: а- микрорастение с хорошо разитой корневой системой перед высадкой в грунт; б- микрорастения на этапе адаптации в контейнере; в- пикированное микрорастение спустя 2 недели адаптации.**
**Fig. 3 Adaptation of plants in a greenhouse, where a - microplant with a well-developed root system before planting in the ground; b - microplants at the adaptation stage in a container; c - transplanted microplant after 2 weeks of adaptation**

## Выводы

В результате проведенных исследований установлено, что наиболее оптимальной средой для культивирования Гизелы 6является питательная среда MS (коэффинт размножения 6,5) дополненная 1 мг/л 6- БАП, 0,5 мг/л ГК3 и 0,1 мг/л ИМК. Содержание ИМК в концентрации 4,0 мг/л способствует эффективному ризогенезу, который на 28

день культивирования достигал 100%. Эффективность адаптации к почвенным условиям достигает 83,3%.

**Благодарности**

Работа выполнена в рамках государственного задания № FNNS-2022-0001 на оборудовании с использованием УНУ «ФИТОБИОГЕН» № 669802.

**Литература / References**

*Aka-Kacar Y, Akpinar C, Agar A, Yalcin-Mendi Y, Serce S, Ortas I* The effect of mycorrhiza in nutrient uptake and biomass of cherry rootstocks during acclimatization // Romanian Biotechnological Letters. 2010. Vol 15. №. P. 5246–5252.

*Buyukdemirci H.* The effects of medium ingredients on shoot propagation and rooting of cherry rootstocks in vitro // Acta Horticulturae. 2008. Vol 795. P. 419-422

*Carolina A., Paula M., Pijut C., Michler H.* Adventitious shoot regeneration and rooting of *Prunus serotina in vitro* cultures // Horticulture Science. 2006. Vol 41(1). P. 193-201.

*Driver J.A., Kuniyuki A.H.* In Vitro Propagation of Paradox Walnut Rootstock // Hort Science. *1984. Vol* 19. P. 507-509.

*Erbenova M, Paprstein F., Seldak J.* In vitro propagation of dwarfed rootstocks for sweet cherry// Acta Horticulture. 2001. Vol. 560. P. 477-480.

*Hossini A.D.* Effects of media cultures and plant growth regulators in micro propagation of Gisela 6 rootstock // Annals of Biological Research. 2010. №. 2. P. 135-141.

*Kuznetsova A., Drigina F., Fedorenko A., Maslova M.* Identification of new resistant rootstocks for large-podded stone crops in the conditions of Southern Russia// Fruit growing and viticulture of South Russia. 2020. 64(4). 128-142. http://doi.org/10.30679/2219-5335-2020-4-64-5

*Moghaddam R.N.* et all. *In vitro* culture of gisela 6 semi-dwarf rootstock // Journal of Biological and Environmental Sciences. 2013. Vol. 7(20). P. 57-64.

*Mourenets L.Y. and. Dolgov S.V.* Adventitious shoot regeneration from leaf explants of two apricot rootstocks // Acta Hortic. 2016. Vol. 1139. P. 501139. DOI 10.17660/ActaHortic.

*Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol Plant. 1962. Vol. 15(3). P.473-497.

*Orlova L, Scheglov S., Kuznetsova A.* Fruit growing and viticulture of South Russia // Fruit growing and viticulture of South Russia. Vol. 58. №4. P. 46-57 (2019). http://doi.org/10.30679/2219-5335-2019-4-58-46-57.

*Quoirin M., Lepoivre P.* Improved media for in vitro culture of *Prunus* sp. // Acta Hortic. 1977. Vol 78. P. 437-442

*Roy A., Fayad A., Barthe R.H., Brlansky R.H.* A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees // Journal of Virological Methods. 2005. Vol. 129(1). P. 47-55

*Ruzic D., Saric M., Cerovic R., Culafic L.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2000. 63(1). P. 9-14.

*Sánchez-Navarro J.A., Aparicio F., Herranz M.C. et al.* Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR // Eur J Plant Pathol. 2005. Vol. 111. P. 77–84. https://doi.org/10.1007/s10658-004-1422-y

*Song G.Q., Sink K.C.* Transformation of Montmorency sour cherry (*Prunus cerasus* L.) and Gisela 6 (*P. cerasus*× *P. canescens*) cherry rootstock mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell Reports. 2006. Vol. 25. P. 117-123.

*Tang H., Ren Z., Reustle G., and Krczal G*. Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars // Sci. Hortic. 2002. Vol. 93. P. 235–244

*Vinter M.* et al. Micropropagation of rootstocks of stone fruit cultures in vitro // BIO Web of Conferences. EDP Sciences, 2020. T. 25. P. 05001

*Статья поступила в редакцию 01.06.2024 г.*

**Seitmamutova E.S., Gavrilenko I.V., Ibadullaeva E.L., Matyash Yu.S., Gavrilenko A.V., Alekseeva I.A., Goncharenko O.V., Khvatkov P.A., Dolgov S.V. Development of the method of clonal micropropagation of the stone fruit crops rootstock Gisela 6 (*Prunus cerasus* 'schattenmorelle' x *Prunus canescens* Bois) //** Plant Biology and Horticulture: theory, innovation. 2024. №. 3 (172) P. 27-34

Gisela 6 is one of the semi-dwarf own-rooted rootstocks of stone fruit crops, which is used to create and develop modern intensive stone fruit orchards. Reproduction of the rootstock in large volumes using traditional methods is expensive and labor-intensive, which determines the use of the clonal micropropagation method, which will allow you to get a huge number of genetically homogeneous and virus-free plants in a short period of time. As a result of the studies, a protocol for clonal micropropagation of Gisela 6 was developed. It was found that the MS nutrient medium supplemented with growth regulators 6-BAP, GA3 and IBA at concentrations of 1 mg / l, 0.5 mg / l and 0.1 mg / l, respectively (on the 30th day, the multiplication factor was 6.5) is the most optimal medium for cultivation. The most effective medium for rooting is MS, supplemented with IBA at a concentration of 4.0 mg / l (on the 28th day, the efficiency of rhizogenesis reached 100%). The efficiency of adaptation to soil conditions of protected ground was 83.3%.

**Key words:** *adaptation; gibberellic acid (GA3); Gisela 6; indole-3-butyric acid (IBA); rootstock of stone fruit crops; 6-benzylaminopurine (6-BAP); in vitro*