

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ЗОНАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ САДОВОДСТВА И ВИНОГРАДАРСТВА»

На правах рукописи

БЕСЕДИНА

Екатерина Николаевна

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА КЛОНАЛЬНОГО
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ IN VITRO

Специальность 06.01.08 – плодоводство, виноградарство

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Научный руководитель –
кандидат биологических наук
Л.Л. Бунцевич

Краснодар 2015

	Стр.
Содержание	
Введение	4
1 Состояние изученности вопроса.....	9
1.1 Способ клонального микроразмножения плодовых культур in vitro.....	9
1.1.1 Преимущества растений, полученных клональным микроразмножением.....	9
1.1.2 Этапы клонального микроразмножения растений.....	10
1.2 Питательные среды для клонального микроразмножения плодовых культур.....	10
1.3 Использование стерилизаторов, антибиотиков для санации эксплантов плодовых культур.....	16
1.4 Использование стимуляторов роста для клонального микроразмножения плодовых культур.....	20
1.5 Физические факторы культивирования эксплантов in vitro.....	32
1.6 Особенности исходного растительного материала при введении в культуру in vitro и дальнейшем микроразмножении	35
1.7 Адаптация оздоровленных мериклонов к нестерильным условиям среды.....	40
2 Объекты и методы исследований.....	46
2.1 Объекты исследований.....	46
2.2 Методы исследований.....	52
3 Результаты исследований.....	57
3.1 Результаты испытаний ранее не использовавшихся в культуре in vitro стимуляторов роста.....	57
3.2 Структурообразующие компоненты и минеральный состав питательных сред для размножения и оздоровления подвоев яблони in vitro.....	77
3.3 Эффективность антибиотиков различных групп и поколений	

	для оздоровления мериклонов подвоев яблони от инфекций различной этиологии.....	82
3.4	Подбор эффективных и безопасных стерилизаторов для санации эксплантов подвоев яблони.....	95
3.5	Оптимизация сроков введения в культуру <i>in vitro</i> и другие условия успешного клонального микроразмножения подвоев яблони.....	100
3.6	Адаптация микрорастений к нестерильным условиям среды.....	104
3.7	Экономическая эффективность разработанной методики клонального микроразмножения и оздоровления <i>in vitro</i> подвоев яблони.....	109
	Выводы.....	114
	Рекомендации производству.....	116
	Список использованной литературы.....	117
	Приложения.....	141

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Метод клонального микроразмножения растений является на данный момент времени наиболее перспективным методом размножения растений, решающим широкий спектр задач, таких как:

- улучшение качества посадочного материала: повышение генетической однородности, повышение урожайности;
- освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры, а также от бактериальных, грибных болезней и вредителей;
- получение в сжатые сроки достаточного количества посадочного материала;
- возможность работы в лабораториях круглый год и планирования выпуска растений к определённому сроку, длительного хранения растений без контакта с внешней средой, обмена материалом в международном масштабе без риска занести карантинные объекты [16, 33, 48, 49, 66, 68].

Данный способ появился в 1957 г., когда американские исследователи Скут и Миллер разработали методы регенерации растений из каллусной ткани путём её обработки фитогормонами - ауксинами и цитокинином, что сделало возможным получение безвирусного посадочного материала сельскохозяйственных растений [68]. Разработке и совершенствованию технологии клонального микроразмножения плодовых растений уделяли большое внимание многие учёные Бутенко Р.Г., Высоцкий В.А., Катаева Н.В. Джигадло Е.Н., Леонтьев-Орлов О.А., Упадышев М.Т., Соловых Н.В., Туровская Н.И., Корнацкий С.А., Фардзинова И.М., Проница И.Н., Матушкина О.В. и другие.

Существующая эффективность метода недостаточно высока. Присутствует ряд проблем в данной технологии, в частности:

- 1) недостаточно высокий выход конечного продукта – посадочного материала по причинам:
 - изменения штаммового состава, повышения вредоносности контаминирующих экспланты сапрофитных микроорганизмов и, соответственно, высокого уровня некроза микропобегов от инфекции;

– низкой адаптивности микрорастений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям среды;

2) большие затраты на стимуляторы роста, структурообразующие компоненты и др. соединения, соответственно, высокая себестоимость конечного продукта.

Известно, что для каждого нового сорта требуется индивидуальная проработка всех аспектов методики оздоровления *in vitro*: подбор оптимальных композиций питательных сред и ростовых веществ, безопасных и эффективных антибиотиков и стерилизаторов, изменение технологических приёмов [33, 34, 36, 75, 122]. Для подвоев серии СК данная технология не была адаптирована.

По мнению Матушкиной О.В., остаются нерешенными такие проблемы, как низкая регенерационная способность отдельных генотипов, витрификация тканей, ингибирование ростовых процессов фенольными соединениями, борьба с микроорганизмами, особенно бактериями, паразитирующими в тканях, а также отсутствие знаний о закономерностях процессов регенерации. Большие капитальные и текущие расходы на оборудование и необходимость использования высококвалифицированного персонала являются также ограничивающим фактором использования этого метода размножения [81].

Перечисленные проблемы определяют необходимость усовершенствования методики клонального микроразмножения с целью повышения выхода и снижения себестоимости конечного продукта – оздоровленных адаптированных к нестерильным условиям микрорастений подвоев яблони.

Цель и задачи исследований. Основная цель исследований – усовершенствовать биотехнологический метод клонального микроразмножения подвоев яблони серии СК меристемным способом *in vitro* и снизить потери адаптированных мериклонов.

Задачи:

1. Установить эффективность ранее не использовавшихся в культуре *in vitro* стимуляторов роста нового поколения (производные и композиции органических кислот и препараты, синтезированные на основе фурфурола), сравнить их со

стандартно используемыми в клональном микроразмножении ростовыми веществами.

2. Исследовать экономичные структурообразующие вещества для питательных сред.

3. Выявить влияние антибиотиков последних поколений на эффективность оздоровления эксплантов семечковых культур *in vitro* от бактериальных и др. инфекций.

4. Определить влияние новых стерилизаторов на результативность санации эксплантов семечковых культур *in vitro*, установить режимы стерилизации

5. Установить благоприятные сроки введения в культуру *in vitro* эксплантов подвоев яблони.

6. Определить оптимальные составы субстратов, режимы влажности и др. условия для повышения выхода адаптированных мериклонов *ex vitro*.

Научная новизна полученных результатов. Усовершенствован способ клонального микроразмножения подвоев яблони, отличающийся от традиционного тем, что при культивировании микропобегов впервые применен ряд ранее не использовавшихся в клональном микроразмножении стимуляторов роста нового поколения (производные и композиции органических кислот и препараты, синтезированные на основе фурфурола), а также экономичных и эффективных структурообразующих компонентов питательных сред, повысивших выход оздоровленных микрорастений подвоев яблони и снизивших их себестоимость. Кроме того, впервые выявлено saniрующее действие и влияние на уровень регенерации и развитие эксплантов подвоев яблони *in vitro* бактерицидных и фунгиостатических антибиотиков различных групп, в том числе препаратов новых поколений (комбинированные пенициллины, фторхинолоны, макролидные антибиотики, цефалоспорины IV поколения и др.) выделены виды и концентрации антибиотиков.

Теоретическая значимость полученных результатов. Получены новые знания о закономерностях влияния ранее не применявшихся в клональном микроразмножении ростовых веществ, а также структурообразователей питательных сред на ростовые реакции микропобегов подвоев яблони, выявлено saniрующее

действие и влияние на уровень регенерации и развитие эксплантов подвоев яблони *in vitro* бактерицидных и фунгиостатических антибиотиков различных групп.

Практическая значимость полученных результатов. Использование стимуляторов роста и структурообразователей питательных сред, аналогичных по действию традиционно используемым фитогормонам и агар-агару, но более экономичных, значительно снизит затраты на производство безвирусного посадочного материала на 235,5 руб./шт. и повысит рентабельность производства на 108,6 %.

Использование эффективных стерилизаторов и антибиотиков позволяет санировать микрорастения от посадочной инфекции *in vitro* и, в конечном итоге, повысить выход оздоровленных микропобегов на этапе введения в культуру *in vitro* на 25 %.

В результате совершенствования режимов адаптации микрорастений (подбор оптимальных субстратов, объемов сосудов и др.) возрастает число успешно адаптированных оздоровленных растений на 33 %.

Методология исследований. Для решения поставленной цели применен системный подход, включающий все этапы клонального микроразмножения.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

Доказана эффективность ранее не применявшихся в клональном микроразмножении подвоев яблони ростовых веществ, позволяющих повысить выход и снизить себестоимость оздоровленного безвирусного посадочного материала.

Предложено применение эффективных и безопасных антибиотиков и стерилизаторов для санации эксплантов подвоев яблони *in vitro*, увеличивающих выход оздоровленных растений.

Разработан ряд аспектов технологии адаптации мериклонов подвоев яблони, позволяющих значительно снизить выпадения микрорастений на завершающем этапе клонального микроразмножения.

Степень достоверности и апробация результатов исследований. Достоверность и обоснованность полученных результатов подтверждены 5-летними исследованиями, проведенными лично автором или при его участии, и большим

объемом экспериментального материала, статистически проанализированного. Результаты исследований доложены на научно-практических конференциях IV, V Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных «Научное обеспечение агропромышленного комплекса», Краснодар, 2010, 2011 гг., ежегодных отчётных сессиях, заседаниях методического совета отдела садоводства ФГБНУ СКЗНИИСиВ в 2010-2013 гг. Получены патенты «Способ микроклонального размножения подвоев яблони» № 2523305, «Способ клонального микроразмножения и оздоровления подвоев яблони *in vitro* с использованием антибиотика гризеофульвин» № 2557387. Разработка «Производство оздоровленного посадочного материала яблони и др. плодовых культур меристемным способом в культуре *in vitro*» отмечена дипломом XI Всероссийской выставки научно-технического творчества молодёжи НТТМ-2011 (Москва, ВВЦ, 2011 г.).

Публикации результатов исследований. Всего по материалам диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 4 в изданиях, определенных ВАК при Министерстве образования и науки России, 2 патента на изобретения, 1 монография в составе авторов, общий объём публикаций 6,4 п.л.

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 142 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов исследований, выводов и рекомендаций. Работа содержит 32 таблицы, 15 рисунков. Список использованной литературы включает 215 источников, в том числе 75 на иностранных языках.

Автор выражает благодарность Ненько Н.И., Посконину В.В., Бадовской Л.А., Поваровой Л.В. за предоставленные для работы стимуляторы роста, консультации, замечания, позволившие улучшить изложение результатов.

1 СОСТОЯНИЕ ИЗУЧЕННОСТИ ВОПРОСА

1.1 Способ клонального микроразмножения плодовых культур *in vitro*

1.1.1 Преимущества растений, полученных клональным микроразмножением

1. Растение, выращенное из меристемы, является свободным от вирусов, даже если меристема была взята у заражённой особи, так меристематическая верхушка нарастает быстрее, чем вирусы продвигаются по растению.

2. Безвирусные саженцы меньше поражаются грибными, бактериальными и другими болезнями.

3. Урожайность меристемных саженцев выше.

4. Саженцы, полученные микрклональным размножением генетически однородны, таким образом, появляется возможность получить большое количество однородных растений от одного маточного в сжатые сроки.

5. Меристемное размножение позволяет получить потомство от трудно размножаемых традиционными способами растений [63].

Куклина А.Г. и Семерикова Е.А. пришли к выводу, что использование микрклонального размножения для жимолости синей сортов *Lonicera caerulea* способствует увеличению выхода укорененных растений более чем в 1000 раз в сравнении с зеленым черенкованием. Этот способ размножения позволяет получить сортовые растения, свободные от бактериальных и вирусных болезней [69].

По данным Расторгуева С.Л., выращивание растений с помощью микрклонального размножения экономически выгодно. Использование культуры апексов повышает рентабельность производства рассады земляники в 1,9 раз по сравнению с традиционной технологией [30].

1.1.2 Этапы клонального микроразмножения растений

Процесс клонального микроразмножения можно разделить на 4 этапа [33, 36, 47, 63, 66]:

1. Выбор маточных растений, изолирование эксплантов, введение в культуру *in vitro*.
2. Собственно микроразмножение, при этом необходимо получить максимальное число хорошо растущих меристематических клонов.
3. Укоренение микропобегов.
4. Адаптация мериклонов к нестерильным условиям среды, выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.

Для каждого конкретного сорта растения на каждом этапе требуется индивидуальный подбор состава питательной среды.

1.2 Питательные среды для клонального микроразмножения плодовых культур

Питательные среды для культивирования эксплантов плодовых культур могут быть твёрдыми, жидкими, двухслойными: нижний слой – агаризованный, верхний – жидкий. Жидкие среды обеспечивают большую подвижность трофических элементов. В этом их преимущество. Однако на таких средах сложно зафиксировать эксплант. Поэтому микропобеги на жидких средах закрепляют с помощью фильтровальных мостиков или используют двухслойные среды.

По мнению Прониной, укоренение микропобегов в жидкой питательной среде с использованием фильтровальных мостиков стимулирует процессы ризогенеза: отмечается раннее и интенсивное корнеобразование, укореняемость повышается на 16,0-16,7 %, количество корней увеличивается в 2,7-3,3 раза, а их длина в 1,7 раза [106].

Такие параметры, как расположение экспланта в культуральном сосуде (горизонтальное или вертикальное), тип пробок (ватные, пластмассовые, стеклянные,

металлические и т.д.), соотношение объёмов микропобегов и питательной среды также влияют на эффективность размножения, причём для каждого вида и даже сорта растения все эти параметры следует подбирать индивидуально.

Макро- и микроэлементы. Эффективность клонального микроразмножения в значительной степени определяется составом питательной среды. В культуре *in vitro* чаще всего используют среды Мурасиге и Скуга, Линсмайера и Скуга, Шенка и Хильдебрандта, Нича, Гамборга, Хеллера, Уайта и другие [163, 191, 195, 212].

Для многих видов растений, в том числе и для подвоев яблони, оптимальной является среда Мурасиге-Скуга (Murashige T., Skoog F., 1962), которая изначально была разработана для тканей табака. Эта среда отличается большим содержанием неорганического азота, который стимулирует процессы органогенеза и соматического эмбриогенеза [40, 68, 81, 173, 204, 214].

По исследованиям Райкова И.А., среда Мурасиге-Скуга увеличивала показатели приживаемости первичных эксплантов, коэффициент размножения и высоту растений малины в культуре *in vitro* в сравнении с питательными средами Ли-Фоссарда и Андерсона [109].

М.Е. Агена, О.Н. Сасо сравнили среды Мурасиге-Скуга и Фоссарда при регенерации меристематических верхушек груши и также выявили превосходство среды Мурасиге-Скуга [144].

Оптимальной оказалась среда Мурасиге-Скуга, по мнению Матушкиной О.В., и для индукции адвентивных побегов из листовых эксплантов яблони (62-396) и груши (уровень регенерации побегов до 58,3 % и 40,0 % соответственно) [81].

По мнению Харамильо Р.К., использование среды МС с добавлением 0,5 мг/л ИУК и 20 г/л сахарозы на этапе первичной регенерации хризантем приводит к активации развития в растении существующих меристем (пазушных почек), из которых к концу пассажа формируются активно растущие микропобеги высотой 15-20 см [40].

Существуют различные модификации среды Мурасиге-Скуга, которые также используются рядом исследователей. Например, Е. Werner, А. Вое на этапе введения в культуру подвоя яблони М 7 применили среду Мурасиге-Скуга с половинной дозой минеральных солей [211]. Т.Cheng использовал такую же среду для подвоев яблони и груши [150]. Zayova Ely и др. успешно применили среду МС с половинной концентрацией солей для размножения *Valeriana officinalis* культурой ткани [188].

Zeng Lihui и др. определяли оптимальные условия для размножения *in vitro* *C. reticulata*. В. Культивировали экспланты на питательной смеси Мурасиге и Тукер (МТ) с добавлением 30 г/л сахарозы, 8 г/л агара и регуляторов роста. Получили 80 % окоренения при 0,5 МС, 60 % - при 0,5 МТ, 40 % при 0,25 МТ и 20 % при 0,25 МС. Окорененные побеги после переноса на твердый субстрат (почва вниз сосуда, песок сверху) имели 100 % акклиматизации [167].

Кроме Мурасиге-Скуга для размножения растений *in vitro* используются и другие питательные среды. Например, Н.И. Туровская (1989) на этапе введения в культуру *in vitro* испытала на подвоях яблони 54-118 и 62-396 среды Гамборга [163], Нича-Нича [195], Уайта [212] одновременно со средой Мурасиге-Скуга. В результате через два месяца культивирования эксплантов, достигших фазы розетки, было в 4,5-5 раз больше на среде Гамборга, чем Мурасиге-Скуга. На среде Уайта экспланты полностью погибли спустя 3 месяца, а на среде Нича-Нича в этот же период - отставали в развитии [123].

Этим же учёным (1994) на этапе собственно микроразмножения была изучена среда Ллойда-Маккауна и сравнена с Мурасиге-Скуга и Гамборга. Наилучшим вариантом для груши сорта Осенняя Яковлева стала среда Ллойда-Маккауна (коэффициент размножения составил 23,3). А для подвоев яблони 62-396 и 54-118 оптимальной оказалась среда Гамборга: все побеги подвоя 62-396 и 83 % подвоя 54-118 через 6 недель культивирования достигли оптимальных для клонирования размеров. На среде Мурасиге-Скуга только 67 % побегов достигли таких же размеров [122].

С.Неделчева считает, что для пролиферации груши лучше использовать среду Lepoivre [86].

Шорников Д.Г. предлагает для культивирования побегов элеутерококка, актинидии и лимонника китайского использовать среду Кворина-Лепорье, модифицированную А. Стандартти [136].

По мнению Пугачёва Р.М., для микроклонального размножения сливы следует использовать жидкую среду WPM с полным или половинным составом минеральных солей в зависимости от плоидности эксплантов [107].

По данным Carvalho Santos Fldlvia и др., на среде Кнудсона с 1000 мг/л KH_2PO_4 + 250 мг/л KCl обеспечивалось лучшее формирование надземной части растений, более высокое число корней [170].

В некоторых случаях воздействие на микрорастения среды Мурасиге-Скуга и её аналогов оказывается идентичным. Например, Ломовская Л.В. отмечает, что микроразмножение груши одинаково протекает как на среде Мурасиге-Скуга, так Ли Фоссарда [76].

Матушкина О.В. указывает, что высокий морфогенез яблони и груши на этапе пролиферации обеспечивается как при использовании среды Кворина-Лепуавра, так и среды Мурасиге-Скуга с 1/4 содержанием аммонийной формы азота [81].

По данным Соловых Н.В., Муратова С.А., высокую частоту морфогенеза из изолированных органов и тканей малины красной, малины черной, ежевики и малино-ежевичных гибридов удается получить на средах MS, QL и Андерсона, содержащих 1,0-3,0 мг/л 6 БАП и 0,5-1,0 мг/л ИУК [116].

По мнению Лапинской М.П., на этапах введения в культуру и микроразмножения для гладиолуса следует использовать среды на основе минеральных солей Гамборга, Ли и де Фоссарда и Мурасиге-Скуга [73].

R.H. Zimmerman предложил на начальном этапе культивировать меристематические верхушки яблони на модифицированной среде Voxus, свободной от гормонов, а затем перенести их на стандартную среду. Такой приём позволяет экономить дорогостоящие регуляторы роста [214].

Источник углеводного питания. Важным аспектом технологии микроклонального размножения плодовых растений является то, какой источник углеводного питания добавлен в питательную среду. Этим источником служат различные углеводы типа сахарозы, глюкозы, фруктозы, галактозы. Для различных видов и сортов растений оптимальны различные углеводы в индивидуальных концентрациях.

Исследования Харамильо Р.К. показали, что оптимальная концентрация источника углеводного питания для массового размножения растений хризантемы составила 15 г/л. При данной концентрации растения достаточно быстро развивались и образовывали хорошо развитую корневую систему. При концентрации сахарозы 10 г/л исследователь наблюдал активацию процессов ризогенеза, в то время как рост надземной части замедлялся. При наличии сахарозы в питательной среде в концентрации 20 г/л наблюдался активный рост надземной части и замедление развития корневой системы. При более высоких концентрациях (30 г/л) наблюдалась активация процессов каллусогенеза в основании побега [40].

Пронина считает, что источником углевода на этапе ризогенеза может служить как сахароза, так и глюкоза, в концентрациях 20-30 г/л [106].

Шорников Д.Г. предложил среду микроразмножения лимонника дополнять гидролизатом казеина — 250 мг/л (на этапе введения в культуру - 100 мг/л) и глюкозой -30 г/л [136].

По данным Упадышева М.Т., использование гомополисахарида в качестве заменителя агар-агара обеспечивало повышение коэффициента размножения в 1,2-2,3 раза и выхода пригодных для укоренения побегов - в 1,9-6,5 раза (патент РФ № 2039428) [127].

Соотношение NH_4 : NO_3 в среде. Спорным моментом остаётся вопрос оптимального соотношения NH_4 : NO_3 в среде.

Согласно Соловых Н.В., Муратова С. А., для образования первичных морфогенных структур на начальном этапе культивирования более пригодны среды с низким содержанием азота. Перенос эксплантов малины, ежевики и малино-ежевичных гибридов на среды с повышенным содержанием NO_3 через 2 недели

культивирования приводит к увеличению числа развившихся адвентивных побегов [116].

Пронина И.Н. считает, что уменьшение содержания аммонийной формы азота в 2 раза непосредственно перед укоренением ускоряет процесс ризогенеза клоновых подвоев яблони 54-118 и 3-17-38 на 2 недели, но не оказывает влияния на качественные показатели корневой системы. На этапе ризогенеза целесообразно концентрацию аммонийного и нитратного азота снижать в 8 раз [106].

Существует ещё несколько замечаний по поводу изменения состава питательной среды на этапе ризогенеза, например, 2-х - 4-х кратное разбавление основы питательной среды Мурасиге-Скуга в процессе укоренения микрочеренков благоприятно сказывается на развитии корней [171].

Paz da Silva Raquel и др. установили, что процент окоренения, число и длина корней, размер почек, сырая масса и содержание воды у микрорастений на этапе образования корней апикальных почек от корневых побегов винограда R110 (*V.rupestris* x *V.berlandieri*) (in vitro) снижались тем сильнее, чем выше концентрация сахарозы [197].

Бразильские ученые при клональном микроразмножении стрелиции (*Strelitzia reginae*) испытывали эффективность добавления в питательную среду активированного угля, поливинилпирролидона, цистеина, аскорбиновой кислоты и лимонной кислоты, а также желирующих материалов (агарозы, агара, фитогеля – желирующего компонента, используемого в культуре растительных тканей). Лучшие результаты достигались при добавлении 2 г/л активированного угля или фитогеля [152].

Райков И.А. и Челябин Д.Н. считают, что положительное влияние на пролиферацию дополнительных побегов чёрной смородины и малины оказывает витаминно-минеральный комплекс «Компливит» в концентрации 2 г/л [109, 134].

Для клонального микроразмножения банана *Musa balbisiana* “Kluai Hin” успешно применили среду МС с добавлением 22 мкМ бензиладенина и 15 % кокосовой воды. Лучшее образование побегов было при добавлении в среду 44 мкМ бензиладенина [175].

Интересное открытие сделали турецкие учёные, предположив, что оптимальной питательной средой для культивирования высших растений будет среда, содержащая органические и минеральные компоненты в таком соотношении, в котором они содержатся в семенах этих растений. Своё предположения они подтвердили экспериментом на гибридах фундука. Длина микропобегов фундука на разработанной авторами среде была 3 р. больше и коэффициент размножения на 23 % выше на испытываемой среде (DKW) по сравнению с контролем (woody plant medium) [193].

Анализ литературных источников позволяет сделать вывод, что у современных учёных нет единого мнения об оптимальном составе питательной среды для микроклонального размножения плодовых культур. К тому же для каждого вида и сорта растений оптимальный состав среды индивидуален.

1.3. Использование стерилизаторов, антибиотиков для санации эксплантов плодовых культур

Стерилизаторы. Успех введения в культуру *in vitro* растительного материала во многом определяется качеством стерилизации. Выбор стерилизатора зависит от особенностей экспланта. Чем нежнее растительная ткань, тем меньше должна быть концентрация стерилизующего агента, чтобы сохранить её жизнеспособность. Часто внутреннее заражение исходных эксплантов бывает намного сильнее, чем поверхностное. Чтобы предотвратить это заражение, растительный материал предварительно обрабатывают фунгицидами и антибиотиками против грибной и бактериальной инфекций.

Харамильо Р.К. установил, что для эксплантов хризантемы в период март-апрель оптимально в качестве стерилизующего вещества использовать 0,1 % раствор сулемы (хлорид ртути) в течение 60 до 120 секунд для листовых эксплантов и лепестков и 3 - 4 минут для побегов, с последующим 3-х кратным их промыванием стерильной дистиллированной водой. При таком способе стерилизации были получены хорошо растущие культуры, способные в дальнейшем к пролиферации.

ции каллусной ткани, индукции образования адвентивных почек и/или активации развития существующих меристем [40, 41].

Майорова Ю.А. также считает, что 0,1 % раствор сулемы следует использовать в качестве поверхностно стерилизующего вещества при работе с культурой ткани вишни, но в экспозиции 8 минут [78].

Помимо сулемы, используется ряд других ртутьсодержащих препаратов. В частности, О.А. Леонтьев-Орлов сравнил воздействие диоксида, мертиолята и сулемы при разных экспозициях на контаминацию и состояние эксплантов яблони. Стерилизация диацидом в течение 5-10 мин обеспечивала освобождение от инфекции. Стерилизация мертиолятом была менее эффективна, к тому же препарат действует на апикальные верхушки яблони более жестко, чем диацид, вызывая повреждение отдельных тканей, а затем и некроз самого экспланта. Оптимально стерилизовать экспланты диацидом не более 10 мин с предварительной промывкой водой не более 2 часов. Этот приём позволяет достичь полного освобождения от инфекции [74].

Для стерилизации растительных тканей, вводимых в культуру *in vitro*, некоторые учёные предлагают использовать двухступенчатую стерилизацию, при которой экспланты сначала выдерживают в течение 2 секунд в 70 % этиловом спирте, а потом в течение 15 мин в 0,1-0,2% растворе сулемы. Длина растительных верхушек при этом должна составлять 2-3 см [73, 182].

Ломовская Л.В. предложила аналогичный приём, обеспечивающий практически полное освобождение эксплантов груши от инфекции. На первой ступени применяли смесь 3 % перекиси водорода с 96 % этанолом, а на второй - обработку 0,01 % раствором сулемы [76].

Недостаток ртутьсодержащих препаратов – это их токсичность. Поэтому, наравне с ними часто используют стерилизаторы, содержащие хлор — гипохлорит натрия или кальция [149, 158]. Например, О.Р. Jones предложил сначала верхушки побегов подвоя яблони М 26 промывать в течение 1 часа в проточной воде, затем на 40 мин помещать в 10 %-ный раствор препарата доместос (действующее вещество - гипохлорит натрия) и после этого 5 раз ополаскивать в стерильной во-

де [173]. E.C. Pua et al. предложили двухступенчатую стерилизацию с использованием гипохлоритов для побегов подвоев яблони Оттава-3: сначала 5-10 секунд в 95 %-ном спирте, а затем 5 мин в 10 %-ном Jivex - и 0,6 % - ном растворе NaOCl [196].

По мнению Алексеенко Л.В., для стерилизации вводимых в культуру изолированных апексов нейтральнодневных и ремонтантных сортов земляники наиболее эффективными оказались как ртутьсодержащие препараты (диацид и сулема), так и гипохлорит кальция. Снижение грибной и бактериальной контаминации обеспечивает предстерилизационная промывка апексов земляники горячей водопроводной водой при температуре $48 \pm 0,5$ ° C в течение 15 - 30 мин [6].

Обеспечить качество стерилизации на уровне сулемы, по мнению Корнацкого С.А., также позволяет более экологически безопасный йод в концентрации 0,01 % [66].

И.В. Бартиш и др. считают, что высокую эффективность стерилизации побегов груши можно достичь при использовании белково-связывающего стерилизатора - нитрата серебра в концентрации 0,1-0,3 % [9].

Бразильские ученые испытывали влияние $AgNO_3$ и этилена на индуцированное формирование каллуса и регенерацию дигаплоидных микрорастений из пыльников *Coffea arabica* L., на среде МС (с добавкой 2 мг/л, 2,4-Д). Через 12 дней пыльники переносили на регенерационную среду (с добавлением 0,108 мг/л кинетина). Проявлялось формирование каллуса и прямой эмбриогенез в присутствии этилена [148].

Для экономии дорогостоящих добавок в питательные среды целесообразно экспланты сначала помещать на среды без них, а после выбраковки заражённых сапрофитной микрофлорой, через 7-10 дней, «чистые» экспланты пересаживают на среды с полным минеральным составом для дальнейшего культивирования [208, 211].

Антибиотики. Помимо стерилизации для борьбы с сапрофитной микрофлорой применяются антибиотики, которые обычно вводятся непосредственно в среду.

Группа учёных оценивала влияние разных антибиотиков (АБ) на индуцирование каллуса и рост земляники сорта Тоуонака. Канамицин значительно ингибировал индуцирование каллуса, дифференциацию почек и морфогенез корней, тогда как карбенициллин, цефотаксим и их комбинации (каждого до 500 мг/л) не оказывали существенного влияния. Цефотаксим негативно влиял на регенерацию побегов из листовых эксплантатов и рост земляники. Карбенициллин < 300 мг/л значительно стимулировал органогенез побегов и корней, негативное действие цефотаксима устранялось при его совместном применении с карбенициллином. Сделан вывод, что при культивировании *in vitro* земляники сорта Тоуонака оптимально использовать антибиотик карбенициллин в концентрации 300 мг/л [197].

Сотрудниками ВНИИВиВ Дорошенко Н.П. и Куприковой А.С. показано позитивное влияние цефотаксима на регенерацию меристем винограда сорта Крестовский на этапе ввода и последующих этапах пролиферации и ризогенеза [51, 52].

Майоровой Ю.А. установлено, что цефотаксим в концентрации от 0,1 до 0,5 мг/л и канамицин в концентрации 10 мг/л исключает из питательной среды средовую и посадочную инфекцию при работе с культурой вишни [78].

Учёные Всероссийского НИИ картофельного хозяйства для подавления роста микроорганизмов-контаминантов, упрощения способа и снижения затрат при выращивании растений *in vitro* предложили в состав агаризованной питательной среды, содержащей минеральные соли, сахарозу и регуляторы роста дополнительно вводить 25-100 мг/л тетраметилтиурамдисульфида (ТМТД) или ТМТД и фундазол в количестве 1-20 мг/л, или ТМТД и фундазол в сочетании с метиленовым синим 2,5-50 мг/л и бриллиантовым зеленым 1-10 мг/л, или для выращивания растений *in vitro* использовать раствор минеральных солей без органических добавок и перлит с добавлением тетраметилтиурамсульфида (ТМТД) в количестве 20-100 мг/л или нистатина 20-100 мг/л [54].

Некоторые исследователи предлагают использовать в составе питательной среды гидролизат казеина в концентрации 0,5-1,0 г/л, провоцирующий развитие

микробиоты, для повышения надежности отбора стерильных эксплантов на этапе введения в культуру на 10-30% [6, 66].

В последнее время появились новые методы в медицине, технические новшества, которые можно с успехом использовать и при микроразмножении растений. Например, выделение меристематической верхушки растения с помощью лазера в стерильной камере позволит достигнуть полной стерильности при введении эксплантов в культуру *in vitro*, уменьшить долю ручного труда в данной технологии [142].

Используемые в клональном микроразмножении плодовых культур стерилизаторы зачастую токсичны для человека, а также не дают полного освобождения эксплантов и сред от посадочной и средовой инфекции. Использование антибиотиков для защиты от инфекции в культуре растительных тканей мало освещено в литературе. Технические средства поддержания стерильности типа вычленения меристемы с помощью лазера, являются дорогостоящими методами. Таким образом, подбор стерилизаторов и антибиотиков для защиты эксплантов и сред от посадочной и средовой инфекции является актуальным элементом повышения эффективности клонального микроразмножения плодовых культур, в частности, вегетативно размножаемых подвоев яблони.

1.4 Использование стимуляторов роста для клонального микроразмножения плодовых культур

Важным элементом технологии производства безвирусного посадочного материала в культуре *in vitro* является применение регуляторов роста.

Чаще всего используют природные регуляторы роста – фитогормоны (метаболиты самих растений) и их синтетические аналоги: цитокинины: природный — зеатин, синтетические - 6-бензиламинопурин (БАП), 6-фурфураминопурин (кинетин), 2-изопентениладенин (2ip); ауксины: природный ауксин - индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) и его синтетические аналоги — индолил-3-масляную кислоту (ИМК), α -нафтил-уксусную кислоту (α -НУК); гиббереллины (ГК); вита-

мины: аскорбиновую кислоту, пиридоксин HCl, никотиновую кислоту, тиамин HCl и др. Они участвуют в регуляции процессов жизнедеятельности, в значительной мере определяя характер и темпы роста и развития эксплантов [43, 46, 64, 70, 84, 89, 103, 112, 133, 176, 191, 210].

Литературные источники содержат множество данных о концентрациях, сочетаниях, времени введения в культуру *in vitro* перечисленных фитогормонов.

По мнению некоторых авторов [14, 25, 130, 173, 179, 180, 214], наиболее полный набор регуляторов роста в питательной среде повышает эффективность регенерации. Другие [145, 151, 213] считают оптимальным набором для регенерации меристематических верхушек яблони и груши введение в среду ИМК, БАП, ГК в концентрации от 0,1 до 0,5 мг/л.

Бутенко Р.Г., Катаева Н.В., Viligas A.N. и др. выявили, что соотношение ауксинов и цитокининов в питательной среде является основным фактором, определяющим коэффициент размножения яблони [21, 62, 207].

Ряд авторов считают, что целесообразно применять цитокинины и ауксины совместно [88, 107, 109, 136, 184, 185, 205, 215]. Например, D. Dunstan et al. выявил, что микрорастения подвоя яблони М 4 на этапах введения в культуру и собственно микроразмножения образуют максимальное количество хорошо развитых побегов на среде, содержащей 1,15 мг/л БАП и 0,15 - 0,20 мг/л ИМК [153].

Шорников Д.Г. рекомендует в качестве регуляторов роста при микроразмножении лимонника китайского использовать 6-БАП или зеатин (1-2 мг/л) в сочетании с ИМК — 0,1 мг/л. Тот же автор отмечает, что высокую морфогенную активность листовых тканей жимолости стимулирует комбинация 1 мг/л ИУК и 4 мг/л 6-БАП [136].

M. Laimer et al. (1988) предложил на этапе введения в культуру при микроразмножении яблони использовать 2,0 мг/л БАП совместно с ИУК 0,4 мг/л [177].

Пугачёв Р.М. считает, что при микроклональном размножении сливы следует поддерживать концентрацию БАП в среде 0,5-0,75 мг/л в зависимости от пloidности эксплантов при концентрации ИМК до 0,1 мг/л [107].

Райков И.А. считает, что культивирование первичных эксплантов чёрной смородины целесообразно проводить на питательной среде, содержащей помимо цитокинина и ауксина (БАП и ИМК в концентрации 0,05 мг/л) ещё и гибберелловую кислоту (наиболее эффективна концентрация 0,5 мг/л) [109].

Одновременное образование побегов и корней у узловых сегментов *Costus spesiosus* (Koen.) наблюдалось в среде МС, содержащей 50 г/л сахарозы, 5 мкМ 6-БАП, 1 мкМ НУК и 10 мкМ аденинсульфата. Повышение числа побегов было в такой же среде, но при добавлении 7 мкМ 6-БАП [185].

Успешный рост побегов сливы китайской (*Prunus salicina*) достигался при использовании WPM-среды с 0,05-0,1 мг/л ИМК, 0,2 мг/л бензиладенина, 0,3 мг/л кинетина и 1,0 г/л гидролизата казеина [215].

По данным Тихомировой Л.И., на этапе собственно микроразмножения для *Iris sibirica* необходимо использовать питательные среды, содержащие 5 -7,5 мкМ БАП, дополненные 0,1 мкМ НУК и 0,1 мкМ ИМК, при этом через один пассаж снижая их концентрацию до 1 мкМ БАП. Для *Iris ensata* наибольший коэффициент размножения (3,4) был получен на среде с 10 мкМ БАП и pH 5,0. Для *Iris hybrida* выше среднего значения числа побегов и высоты растений наблюдали на средах с 1,0 мкМ БАП и 1,0-2,5 мкМ БАП + 0,1 мкМ НУК + 0,1 мкМ ИМК [88].

Лучшие результаты по образованию побегов при микроразмножении вишни степной (*Cerasus fruticosa* Pallas) получали на среде РМ с 1 мг/л бензиламинопурина, 0,1 мг/л ИМК и 10-20 г/л сахарозы [205].

На этапе образования стеблей фиалки африканской сорта *Nicole*, по данным бразильских учёных, включение ауксинов и цитокинина обязательно. Более эффективными были концентрации 0,2 мг/л кинетина и 0,2 мг/л нафтилуксусной кислоты. На втором этапе (мультипликация) наибольшее число жизнеспособных побегов было при добавлении 0,5 мг/л 6-бензиладенина [184].

Существует другая точка зрения, согласно которой высокая гормональная насыщенность питательной среды приводит к угнетению эксплантов вплоть до их гибели [133]. Чтобы избежать этого, многие авторы предлагают на первых двух

этапах микроразмножения растений использовать только БАП [5, 55, 123, 156, 202].

К примеру, Леонтьев-Орлов и др. (1988) считают, что на этапе введения в культуру *in vitro* побегов яблони добавление в среду только БАП положительно влияло как на рост, так и ризогенез. Дополнительное введение ГК и ИМК в концентрациях 0,1 и 10,0 мг/л в присутствии БАП привело к ингибированию ризогенеза на среде с 1,0 мг/л ИМК, независимо от концентрации ГК. При этом наблюдалось зарастание меристематических верхушек каллусом. Переход экспланта к каллусогенезу авторы объясняют нарушением эндогенного химического баланса под влиянием факторов питательной среды. Зарастание каллусом апекса вызывается нарушением процесса образования проводящей системы, в результате меристема оказывается изолированной от корней. Клетки этой ткани, лишаясь продуктов питания, теряют свои меристематические свойства и начинают неорганизованно делиться. Процесс охватывает весь эксплант и завершается его гибелью. Также исследователи предполагают, что раневая поверхность экспланта яблони и прилегающие к ней клетки обладают высокой чувствительностью к регуляторам роста [74].

Матушкина О.В. также считает, что наиболее эффективно при введении в культуру *in vitro* яблони и груши добавление в среду БАП в концентрации не более 0,5 мг/л. Присутствие в питательной среде других регуляторов роста – ГК (0,02 мг/л) и ИМК (0,02 мг/л) является не целесообразным [81].

Мнение Леонтьева-Орлова и др. и Матушкиной О.В. разделяет Майорова Ю.А., которая предлагает использовать б-БАП в концентрации 0,5-1,0 мг/л для культивирования гибридов вишни, причём не комбинировать цитокинин с ауксинами, т.к. это ведёт, по её мнению, к каллусообразованию и фенотипическим изменениям растений в дальнейшем [78].

Корнацкий С.А. для стимуляции бокового ветвления у эксплантов сливы предлагает применять в составе питательной среды б-БАП в такой же концентрации (0,5-1,0 мг/л), а в пассаже, предшествующем укоренению побегов,

снижать концентрацию 6-БАП до 0,2-0,25 мг/л. Такой приём повышает выход побегов длиной более 1,5 см в 1,2-1,4 раза [66].

Лучшие результаты по размножению земляники, малины черной и малино-ежевичных гибридов получены Соловых Н.В. и др. на средах МС и QL, содержащих 1,0 мг/л 6-БАП. Эффективность укоренения микрочеренков составила от 65 до 100%, адаптация к условиям *in vivo* 75-95% в зависимости от вида растения [115].

Волосевич Н.Н. показано статистически значимое влияние на размножение малины белорусского сортимента (Аленушка, Бальзам и Метеор) *in vitro* цитокинина 6-БА, который в оптимальной концентрации 0,5 мг/л обеспечивал высокий коэффициент размножения (от 4,06 до 5,50), и хорошее развитие надземной части растений-регенерантов (от 0,56 см до 0,79 см) у всех сортов [28].

По мнению Лапинской М.П., на этапе микроразмножения гладиолуса наиболее эффективны 6-бензиламинопуридин в концентрации 1,0-2,0 мг/л и 2-изопентениладенин в концентрации 0,1 -1,0 мг/л. Использование регуляторов роста позволило повысить коэффициент размножения гладиолуса в 2 раза [73].

Наилучшее воздействие на развитие зародышей орхидных растений (*Phalaenopsis amabilis* и *Phalaenopsis* «Nebula») оказал 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л; в этом варианте была наибольшая скорость развития микрорастений [165].

Большинство учёных придерживаются мнения, что на этапе введения в культуру *in vitro* оптимальная концентрация БАП составляет от 0,5 до 1,5 мг/л, а на этапе собственно микроразмножения - до 1,5- 3,0 мг/л [5, 103, 122, 155, 203]. Использование более высоких концентраций БАП (свыше 3,0 мг/л) на этапе пролиферации приводит к формированию эксплантов с очень короткими побегами красноватого цвета, которые не пригодны для укоренения [122].

Однако, по мнению Fira Alexandru и др., яблони сортов Precose de Ardeal и Silvan успешно размножаются на МС с 7 мг/л бензиламинопурина. Процент укоренения (укореняли на 1/2 среды МС с 1мг/л ИМК) при этом составлял у первого сорта 90,6 %, у второго – 60,9 % [160].

Некоторые исследователи предлагают на первых двух этапах микроразмножения вместо цитокининов использовать другие ауксины или гибберелины. Например, Харамильо Р.К. считает, что оптимальной концентрацией для размножения хризантем является среда, содержащая 0,5 мг/л ИУК, при этом коэффициент размножения составляет в среднем 9 единиц за один пассаж [40].

По мнению Ланской Л.Е., для получения высокого процента стерильных и жизнеспособных эксплантатов сливы на этапе введения в культуру методом меристем целесообразно использовать среду Нича+ГК -1 мг/л, независимо от сортовой принадлежности [72].

Самые хорошие всходы *Passiflora setacea* бразильские ученые получили из скарифицированных семян на $\frac{1}{2}$ среде МС с 20 мг/л ГК [187].

Другие авторы рекомендуют вместо цитокининов пуринового ряда использовать *цитокинины ряда дифенилмочевины*, в частности тидиазурон (М-фенил-К-1,2,3-тидiazолил-5-мочевину), который обладает большей активностью [146, 194]

В частности, Алексеенко Л.В. на этапе пролиферации при клональном микроразмножении нейтральнодневных и ремонтантных сортов земляники продемонстрирована возможность замены 6 - БАП тидиазуоном в концентрациях вдвое меньших (0,5 мг/л) по сравнению с оптимальной концентрацией 6-БАП (1,0 мг/л) [6].

По данным Вовк В.В., цитокинины структурного ряда дифенилмочевины действуют в несколько раз эффективнее 6-БАП (производное аденина) на стадии размножения. Рекомендуемые концентрации: для 4-PU - 0,4 мг/л, для TDZ - 0,1 мг/л, а для 6-БАП - 2 мг/л. Применение производных дифенилмочевины (4-PU и TDZ) повышает степень адаптации меристем ремонтантной малины в условиях *in vitro* до 100%. В присутствии 4-PU, выживают и хорошо развиваются меристемы минимальных размеров. Это может иметь особое значение при освобождении растительного материала от вирусной инфекции [27].

Присутствие тидиазурона на этапе пролиферации побегов, по данным James D.J., Thurbon I. J., усиливало ризогенез на этапе укоренения [172].

Райков И.А. считает, что введение в культуру *in vitro* первичных эксплантов смородины чёрной с применением СРРУ в концентрации 0,2 мг/л увеличивает выход жизнеспособных регенератов [109]. По мнению Челябинца Д.Н. это же актуально и для первичных эксплантов малины [134].

По данным литовских ученых, оптимальными условиями для микроразмножения *Aronia melanocarpa in vitro* оказались: МС-среда с добавлением 0,3 мкМ нафтилуксусной кислоты и 10 мкМ тидиазурона, рН 5,8 [169].

Использование *различных цитокининов* (кинетина, зеатина по сравнению с БАП) на этапе собственно микроразмножения у сортов яблони Еллоу спур, Старк спур Голден и Голден Делишес показало, что наиболее быстрое размножение обеспечивал БАП, зеатин ускорял рост побегов. Из изучаемых сортов наиболее чувствительны к действию цитокининов был сорт Старк спур Голден [159]

Шорников Д.Г. установил, что на этапе клонального микроразмножения актинидии наиболее эффективным регулятором роста является зеатин в концентрации 1-2 мг/л [136].

По мнению Матушкиной О.В., снижение уровня витрификации побегов обеспечивается, в зависимости от генотипа, за счет уменьшения концентрации БАП в среде до 0,5 мг/л или использования более слабого цитокинина - кинетина (5,0 мг/л) [81].

Сведения о замене дорогостоящих фитогормонов *веществами другой природы* в литературных источниках встречаются редко.

Шорников Д.Г. предложил сочетать препараты гибберелловой кислоты (1мг/л) и 6-БАП (1 мг/л) со спиртовым экстрактом корня элеутерококка для стимуляции побегообразования эксплантов элеутерококка колючего [136].

И.М. Фартизинова (1999) предложила замену традиционным стимуляторам роста: согласно её исследованиям использование настойки лимонника (15-20 капель/л) при микроразмножении груши обеспечивает сокращение сроков

получения полноценных регенерантов, увеличение коэффициента размножения, снижение себестоимости питательной среды [93].

Этим же автором в 1996 году было предложено для микроклонального размножения подвоев яблони в качестве стимулятора роста применять экстракт родиолы в концентрации 10-30 капель/л [92].

Дорошенко Н.П. и Куприкова А.С. для повышения эффективности клонального микроразмножения ценных донских аборигенных сортов винограда: Цимлянский черный, Красностоп золотовский, Кумшацкий, Сибирьковский и др. вводили в состав питательной среды препараты эмигим и салициловую кислоту [51, 52].

Майоровой Ю.А. для повышения коэффициента размножения гибридов вишни предложено использовать в качестве добавок в питательную среду новые БАВ: биоантарную кислоту в концентрации от 0,5 до 1,0 мг/л (повышает коэффициент размножения до 20,4) и К-УНИ 2,0 мг/л (повышает коэффициент размножения до 4,4) [78].

Упадышев М.Т. утверждает, что фенольные соединения повышают эффективность размножения растений на этапах пролиферации, укоренения и адаптации. Фенолкарбоновые кислоты (А. с. № 1706481, патент РФ № 2111653) с одной гидроксильной группой (сиреневая, феруловая, л-кумаровая) стимулируют побегообразование, кислоты с несколькими гидроксильными группами (галловая, хлорогеновая) и флоридзин - ризогенез [2, 91].

Добавление 2 мг/л метатополина в среду МС с В₅-витаминами и 4 мг/л 6-бензиладенина, по мнению Venmahioul Venamar, генерировало оптимальное число побегов с приемлемыми признаками [186].

На этапе микроразмножения ежевики сорта Thornless Evergreen хорошие результаты получены Fira Alexandra при использовании гелкарина GP-812 (2 г/л). Добавка смолы гуара, по мнению этого же автора, уменьшала интенсивность размножения, но микрорастения развивались более сильными и выровненными [161].

Укоренение. По мнению Высоцкого В.А., контроль ризогенеза у размноженных *in vitro* побегов возможно осуществлять путём изменения состава пита-

тельных сред на этапе, предшествующем укоренению, способа аппликации индуктора ризогенеза и, в отдельных случаях, изменением температурных условий культивирования [33]. Температура относится к физическим факторам культивирования. В этой главе рассмотрим составы питательных сред на этапе, предшествующем укоренению, и способы аппликации, виды и концентрации индуктора ризогенеза. В первую очередь, проанализируем мнения учёных по поводу того, какие изменения состава питательных сред в субкультивированиях, предшествующих укоренению, благоприятно влияют на процесс ризогенеза.

Некоторые учёные считают целесообразным непосредственно перед этапом укоренения дополнять среду (на фоне БАП 1,0-2,0 мг/л) аденин-сульфатом в концентрации 50 мг/л, или, в зависимости от генотипа, антиоксидантом (АК, Ж, ПВП). Микропобеги при этом приобретают повышенную ризогенную активность: ускоряется корнеобразование, повышается укореняемость и улучшается качество корневой системы [81, 106, 191].

К. Magyar-Tabori, J. Dobranszki, I. Hudak установили, что наивысшая степень укоренения (76 %) микропобегов яблони сорта «Royal Gala» была зафиксирована при культивировании перед укоренением на среде, содержащей 1,0 мг/л бензиладенина в течение 4 недель [182].

Пугачёв Р.М. предлагает при укоренении гибридов сливы предварительное культивирование проводить на безгормональной среде, затем культивировать экспланты по 2 недели на свету и в темноте, на питательной среде QL с половинным составом макросолей, дополненной регуляторами роста (0,001 мг/л эпибрасинолида, 0,5-1,0 мг/л ИМК) [107].

Важным условием является то, до какой степени развились микропобеги в предыдущих субкультивированиях. По данным Корнацкого С.А., нецелесообразно использовать для укоренения побеги после первых трех пассажей и побеги длиной менее 1,5 см ввиду их низкой укореняемости. Процент побегов длиной более 1,5 см возрастает во 2-м - 7-м пассажах и зависит от сортовых особенностей и концентрации 6-БАП [66].

Теперь рассмотрим, какие способы аппликации, виды и концентрации индуктора ризогенеза используются в технологии микроклонального размножения. Наиболее часто применяемым ауксином является *индолилмасляная кислота (ИМК)*. По результатам исследований Sriskandrajah S., Mullins M., ИМК в концентрации 10 μ M стимулировало образование корней у яблони до 80% [204].

Шорников Д.Г. предложил при укоренении микропобегов актинидии и жимолости использовать среды Кворина-Лепорье, в модификации А. Стандарди (1984), и 0,5 Мурасиге-Скуга (1962), содержащих 0,5-1 мг/л ИМК [136].

Волосевич Н.Н. считает оптимальной концентрацией для укоренения малины белорусского сортимента ИМК 0,1 мг/л, такая концентрация обеспечивает полное укоренение и хорошо развитую корневую систему у растений-регенерантов малины [28].

Майорова Ю.А. предлагает для укоренения гибридов вишни использовать ИМК в концентрации 0,5-0,8 мг/л [78].

Среда 0,5 МС с добавлением 2 мг/л ИМК наиболее пригодна для корнеобразования микрорастений вишни степной [205].

Наиболее эффективным способом укоренения побегов сливы на агаризованной питательной среде является использование тальковых пудр ИМК с концентрацией 0,125 %, 0,25 % и ИУК с концентрацией 0,25, 0,5 % [66].

Некоторые учёные предлагают использовать *другие ауксины*. Например, G. Ancora и др. (1981) отмечают, что для укоренения микропобегов сортов яблони наиболее эффективно использовать нафтилуксусную (1,0 мг/л), чем индолилуксусную и индолилмасляные кислоты [143].

Корнеобразование *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, по мнению Pati Pratar Kumar, лучше проходит на МС-среде с добавлением 5 мкМ α -НУК [141].

Тихомирова Л.И. предлагает для укоренения ириса использовать питательные среды, дополненные 3 мкМ НУК [88].

W.D. Lane, J.M. McDougald указывают на сортовую реакцию воздействия нафтилуксусной кислоты. Так, концентрация НУК в среде для ризогенеза клоно-

вых подвоев яблони М 9, М 26 и М 27 выше, чем для сорта Macspur (0,1-0,33 μM). Одновременно выше и степень укоренения — 85 % и 58 % соответственно [178].

Ряд исследователей отмечают одинаковое воздействие двух видов ауксинов. К примеру, наиболее интенсивное развитие корневой системы гладиолуса, согласно Лапинской М.П., происходит на половинной жидкой питательной среде Мурасиге-Скуга в присутствии ИМК или НУК в концентрациях 0,5-1,0 мг/л [73].

Другие используют несколько ауксинов совместно, а иногда комбинируют на этапе ризогенеза ауксин и цитокинин. В частности, на этапе корнеобразования фиалки африканской сорта Nicole лучшие результаты по корнеобразованию и сухой массе надземных органов были в вариантах с добавкой 0,5 мг/л 6-бензиладенина + 0,1 мг/л нафтилукусусной к-ты, 0,05 мг/л 6-бензиладенина + 0,1 мг/л нафтилукусусной к-ты и 0,08 мг/л 6-бензиладенина + 2,0 мг/л индолилукусусной кислоты [184].

По результатам исследований ряда учёных, *кратковременное воздействие ауксина* на микропобеги оказывает большее стимулирующее влияние, чем постоянное его присутствие в среде. Для этого конгломерат побегов предварительно культивируют на средах с пониженным содержанием 6-бензиламинопурина (до 0,25 мг/л), а затем обрабатывают базальную часть микропобегов ИМК в различной концентрации и экспозиции: 100 мг/л в течение 30 мин, 30 мг/л - 18 часов (способствует более раннему началу корнеобразования (на 4-5 дней), повышению укореняемости на 10-39%, лучшему развитию корневой системы, а также снижению или отсутствию каллусообразования), 2,0-3,0 мг/л - 4-7 дней в темноте (15,9-50,0% стимулирующий эффект на процессы корнеобразования). После этого побеги пересаживают на среду свободную от гормонов [27, 33, 80, 106].

Райков И.А. советует для этой цели применение импульсной обработки не укоренённых растений чёрной смородины в растворе ИМК с диапазоном концентраций от 5 до 7,5 мг/мл [109].

Укоренение микрорастений фисташки проходило оптимально, по данным Venmahioul Venamar и др., при обработке 2 % ИМК [186].

Существует также способ массового укоренения пробирочных растений *непосредственно в почвенном субстрате*, минуя стадию укоренения на питательных средах [27, 80, 143].

Перспективно, по мнению Пугачёва Р.М., использование технологии укоренения *ex vitro* на ионитных субстратах [107].

Некоторые исследователи пытаются *заменить ауксины препаратами, обладающими похожим действием*. Например, по данным Чернышева и др., применение черказа и борина (кремнийорганические соединения) повышало укореняемость эксплантов земляники и малины на 25-30 % [59].

Исследователи R. Messina и G. Costa (1990) выявили некоторое стимулирующее действие паклбутразола на корнеобразование *in vitro* сортов киви Хайворд и Томури, однако положительный эффект был намного ниже, чем при использовании 0,3-1 мг/л индолилмасляной кислоты или при комбинации ИМК и паклбутразола. При этом, у микрочеренков подвоев персика одновременное применение ИМК и паклбутразола значительно увеличивало длину и число корней (Alsalihi et al 2004) [183].

Naija S. и др. доказали участие полиаминов в контроле окоренения и взаимодействие с ауксинами во время физиологической фазы окоренения. Были получены следующие результаты по опыту: окореняемость ММ 106 *in vitro* составляла 96,7 % после 6 дней культуры в темноте на среде с добавкой ауксина и перевода на вторую среду без регуляторов роста на 25 дней на свету. Без ауксина в первой среде побеги не окоренялись. Путресцин (PUT), спермидин (SPD), циклогексилламин (CHA) и аминокуанидин (AG) повышали укореняемость при использовании в первой культуре без ИУК. Дифлуорометилорнитин (DFMO), внесённый в первую среду с ИУК, ингибировал укоренение. При внесении вместе с ИМК PUT не влиял на повышение уровня эндогенных ИУК и индолил-3-ацетиласпарагиновой кислоты в побегах, но индивидуально повышал их уровни. Сходные данные получены по SPD, CHA и AG [171].

Индийскими учёными предложен в качестве стимулятора роста микропобегов орхидеи *Dendrobium nobile* триаконтанол (TRIA) - рисовый воск, используется

как БАД, парфюмерная добавка, являющаяся регулятором роста (стоимость 25 г – 75 руб.). При добавлении в питательную среду данного компонента в определенной концентрации 93 % эксплантов образовывали микропобеги, а при использовании этого вещества в другой концентрации удавалось достичь 92 % уровня укоренения микропобегов [198].

Существует мнение у тайландских ученых, что укоренение банана хорошо протекает на среде МС без добавления регуляторов роста [175].

Часть исследователей предлагает использовать одновременно с ауксином *добавки*, а именно совместное применение ауксина и антиоксиданта (лимонная и аскорбиновая кислоты, поливинилпирролидон) стимулирует ризогенез подвоев и сортов яблони и груши на 13,4-40,0 % [27, 80, 106].

Микрорастения сливы китайской (*Prunus salicina*) успешно укореняли на 0,5 среде МС с добавлением 0,2-0,5 мг/л ИМК, 15 г/л сахарозы и 20-40 мг/л флороглюцина [215].

На основании вышеизложенного можно сделать вывод о том, что нет единого мнения о влиянии регуляторов роста на успех микроклонального размножения плодовых культур.

1.5 Физические факторы культивирования эксплантов *in vitro*

К физическим факторам выращивания относятся температура, условия освещения, влажность воздуха и др.

По мнению Матушкиной О.В., на первых двух этапах освещенность колеблется от 1000 до 3000 Лк, фотопериод 14 – 16 часов, но эти параметры зависят от культуры. Высокая интенсивность света может вызывать хлорозы и задерживать развитие, но при переносе в почву эти растения чувствуют себя лучше и растут энергичнее [81].

Мексиканские ученые утверждают, что увеличение продолжительности фотопериод / темнота с 8:16 ч до 16:8 ч увеличивает свежую и сухую биомассу и длину побегов хризантем [154].

Корнацкий С.А. предложил культивирование пролиферирующих культур, а также укоренение побегов и адаптацию микрорастений проводить в культивационном помещении при длительности светового периода 16 час, освещенности 3,5 тыс. лк [66].

Спектральный состав света также играет важную роль.

Некоторые исследователи указывают на синий свет как основной компонент морфогенеза. А красный свет, по их мнению, у различных культур вызывает различную реакцию: стимулирует образование почек у табака, образование побегов у салата, укоренение - у березы [61].

По данным Беляковой Л.В., Высоцкого В.А., культивирование земляники сортов Амулет, Профьюжен, Пурпуровая и Ред Гонтлет под лампами синего и красного света способствовало более интенсивному укоренению и лучшему развитию корневой системы. Рентабельность производства при этом повысилась в 1,4-1,5 раза по сравнению со стандартной технологией [26, 137].

Алексеев Л.В. также рекомендует для ускорения процесса укоренения эксплантов земляники использовать облучение синим и красным светом [6].

Лучшие результаты культивирования эксплантов различных сортов гладиолуса, согласно исследованиям Лапинской М.П., обеспечивало облучение красным и зеленым светом, тогда как белый и синий свет оказались малоэффективными с точки зрения развития дополнительных побегов [73].

По мнению итальянских учёных Rosario Muleo и Stefano Morini, элонгация и рост стебля микрорастений подвоев яблони М 9 активнее происходит при красном спектре освещения эксплантов в фитотроне и замедляется при синем спектре. Также при красном спектре освещения снижается степень апикального доминирования и усиливается ветвление (мультипликация побегов), при синем спектре освещения повышается степень апикального доминирования и уменьшается мультипликация побегов [190].

Те же авторы выявили, что мультипликация (увеличение числа) побегов подвоя яблони ММ 106 в культуре *in vitro* является результатом взаимодействия двух биологических процессов: дифференциация боковых почек и развитие но-

вых побегов, и оба эти процесса регулируются изменением спектрального состава света. Синий и ультрафиолетовый спектр света увеличивают число дифференцировавшихся из апикальной меристемы почек, противоположную реакцию вызывают красный, жёлтый и зелёный спектр света [189].

Оптимальным решением относительно спектрального состава света, по мнению Харамильо Р.К., является оборудование лаборатории установками с люминесцентными лампами, спектральный состав которых близок к естественному, а тепловое излучение невелико [40].

Ряд учёных считают, что выдерживание эксплантов в темноте в течение некоторого промежутка времени повышает эффективность клонального микроразмножения. В частности, по данным Матушкиной О.В., увеличению образования адвентивных побегов у плодовых культур на 10,0-40,0 % способствует культивирование листовых пластинок и каллусных тканей в течение первых двух недель в темноте и при пониженных температурах (до +4° С) [81].

Шорников Д.Г. отмечает высокую морфогенную активность листовых тканей жимолости при культивировании эксплантов в течение 14 - 17 суток в условиях полной темноты [136].

При выращивании орхидных растений (*Phalaenopsis amabilis* и *Phalaenopsis "Nebula"*) Gow Wee-Peng и др. рекомендуют выдерживать экспланты сначала 60 дней в темноте, а затем 45 дней на свету [165].

Температура и влажность воздуха играет важную роль в жизни микрорастений *in vitro*.

Ряд исследователей отмечают, что температура культивирования обычно варьирует в интервале 22 – 26 °С днем и 18 – 22 °С ночью. Оптимальная относительная влажность воздуха – 65–70 %. В некоторых случаях понижение температуры ведет к повышению эффективности размножения. В целом, для повышения коэффициента размножения необходимо каждому виду с учетом его естественного ареала произрастания подбирать индивидуальные условия культивирования [33, 37, 40, 66, 68].

По мнению Харамильо Р.К., оптимальный температурный диапазон для клонального микроразмножения составляет - + 21–25 ° С. При пониженных температурах, как правило, наблюдается формирование укороченных побегов с большим числом междоузлий, а при высоких (выше +26 ° С) - элонгация побегов и междоузлий [40, 41].

Корнацкий С.А. предложил культивирование пролиферирующих культур, а также укоренение побегов и адаптацию микрорастений проводить при температуре 24-26 ° С, влажности воздуха 50-60 % [66].

Таким образом, по поводу применяемых физических факторов культивирования эксплантов *in vitro*, мнения учёных сходятся в том, что необходимо каждому виду с учетом его естественного ареала произрастания подбирать индивидуальные условия культивирования.

1.6 Особенности исходного растительного материала при введении в культуру *in vitro* и дальнейшем микроразмножении

Генотипическая реакция растений при их культивировании in vitro. В культуре *in vitro*, по мнению многих исследователей, у большинства плодовых и ягодных культур на всех этапах микроразмножения ярко проявляются сортовые и видовые особенности, и коэффициент размножения в большей степени зависит от генотипа, чем от модели размножения *in vitro* [33, 34, 75, 81, 108, 109, 122, 178].

Существует мнение, что лучше размножаются культурой тканей двудольные травянистые, чем однодольные и древесные растения [36, 38, 62, 135].

Согласно Р. Voxus, М. Quorin, те виды древесных растений, которые хорошо размножаются вегетативно черенками, успешно размножаются и в культуре *in vitro* [147]. Однако это не всегда так. Опыты, проведённые Высоцким В.А. с рядом растений *Rubus* не подтвердили эту точку зрения [34].

Высоцкий В.А. также отмечает, что у древесных плодовых растений подвойные формы обладают большей регенерационной способностью и характеризуются большим коэффициентом размножения, чем сорта. Генотипическая реак-

ция проявляется и между подвойными формами, например, число дополнительных побегов у подвойных форм груши Березка и Желтая, колебалось от 5 до 12 в зависимости от формы [35].

Эту закономерность подтверждают данные О.А. Леонтьева-Орлова: меристематические верхушки привоев яблони развивались слабее, чем подвои. Также исследователь отмечает сортовые различия при клональном микроразмножении яблони: сорта яблони Мелба и Антоновка обыкновенная отличаются более интенсивным ростом, чем Коричное Новое и Лобо, побеги, у которых были в 4-6 раз короче [75].

По мнению Ильиной Н.С., при культивировании *in vitro* листовых эксплантатов малины красной наибольший выход каллусов отмечен у ремонтантных сортов. Регенеранты получены у всех форм, но их наибольший выход наблюдался в листовых каллусах дикорастущей лесной малины. Успех культивирования листовых эксплантатов малины красной определяется прежде всего генотипом исходных растений, во вторую очередь составом питательных сред [57].

Сорта хризантемы, по данным мексиканских ученых, сильно различаются по возможности микроразмножения: коэффициент размножения составляет в зависимости от генотипа: 1:8 до 1:29 [206].

Таким образом, все учёные единогласно утверждают, что генотип растений оказывает большое влияние на успех клонального микроразмножения.

Происхождение экспланта. Происхождение экспланта – это местоположение отделяемой части на растении, а также сами исходные растения (взрослые деревья, сеянцы в ювенильной фазе). Многими исследователями установлено, что экспланты растений в ювенильной фазе у большинства плодовых культур имеют большую способность к регенерации, мультипликации и ризогенезу, чем экспланты взрослых деревьев [24, 38, 40, 60, 63].

Тихомирова Л.И. считает, что для микрклонального размножения сортов и гибридов *Iris hybrida*, *Iris Ensata*, *Iri.sibirica* оптимальными являются органы цвет-

ка, а именно ось соцветия, трубка околоцветника, соединение околоцветник-завязь [88].

Zeng Lihui и др. определяли оптимальные условия для размножения *in vitro* *Citrus reticulata*. В качестве эксплантатов брали сегменты эпикотили длиной 1 см без разрезания и продольно разрезанные на 2 равные части. Разрезанные эпикотили дали лучшие результаты по сравнению с целыми [167].

Gow Wee-Peng и др. установили, что формирование зародыша орхидных растений (*Phalaenopsis amabilis* и *Phalaenopsis "Nebula"*) имеет наибольшую частоту у основания срезанного листа [165].

Алексеев Л.В. рекомендует для введения в стерильную культуру земляники использовать экспланты, вычлняемые из активно растущих столонов, а при дефиците исходного материала - базальные фрагменты цветочных почек [6].

Лучшим регенерационным потенциалом, по мнению ряда исследователей, обладают верхушечные почки, по сравнению с боковыми [116, 123, 150]. Эта закономерность объясняется специфическим содержанием эндогенных регуляторов роста (ауксиноподобных веществ) в верхушечных почках [38].

Сроки изоляции. Проявление регенерационной способности эксплантов и в дальнейшем качество полученных методом *in vitro* культур во многом зависит от сроков изоляции эксплантов с исходных маточных растений [104, 181].

Большинство исследователей [37, 40, 63, 73, 78, 81, 83, 118, 146] считают, что лучшим сроком введения в культуру *in vitro* является фаза выхода из покоя и активный рост.

Пугачёв Р.М. считает, что оптимальным временем изоляции при клональном микроразмножении сливы является фаза интенсивного роста побегов интактного растения [107].

Вовк В.В. установил, что оптимальными сроками выделения меристем малины является период с середины мая до начала июня, когда длина побегов возобновления составляет 5-20 см, а дифференциация цветочных почек еще не произошла [27].

С другой стороны, для вишни и некоторых подвоев яблони удачное введение эксплантов в культуру с последующей пролиферацией побегов было проведено при использовании в качестве исходного материала растений, находящихся в состоянии покоя [38].

Исследования Харамильо Р.К. (2009 г.) показали, что для хризантем также оптимальным сезоном изоляции первичных эксплантов оказался период, при котором экспланты характеризуются низкой регенерационной способностью - с октября до конца декабря. Эти различия можно объяснить физиологическим циклом развития растений [40].

Такой эффект наблюдается и у сирени. Набиевой А.Ю. показана возможность индукции развития зачаточного побега пазушных почек сортов «Мадам Лемуан» и «Красавица Москвы», изолированных с растений в состоянии физиологического покоя [85].

Размер эксплантов. Размер вводимых в культуру *in vitro* эксплантов имеет большое значение. Чем меньше размер изолируемого апекса, тем больше вероятность оздоровления. Минимальная концентрация или полное отсутствие вирусных частиц, по мнению Высоцкого В.А, характерны для точек роста (небольшое количество слоев клеток размером менее 0,1 мм. Причина этого явления до конца не ясна. Автор предполагает, что пониженная концентрация вирусных частиц в активно делящихся меристематических клетках связана с отсутствием в последних развитой проводящей системы. Кроме того, исследователь объясняет это и физиологическими особенностями клетки, в частности, специфическим балансом биологически активных веществ (например, ауксинов), а также проницаемостью стенок меристематических клеток. Не исключается также возможное ингибирующее влияние на репликацию вирусных частиц отдельных компонентов питательной среды - ауксинов, цитокининов и др. Так как внутри точки роста побега собственно меристема образует только небольшое количество слоев клеток размером менее 0,1 мм, то, в зависимости от технических возможностей, отсекаются кусочки ткани длиной от 0,1 до 0,4 мм, которые состоят из меристемы и смежных слоев ткани с 1-2 листовыми зачатками [32].

Однако жизнеспособность меристематических тканей зачастую очень низкая. По мнению Калинина Ф.Л. и др. приживаемость апикальных верхушек размером 0,1-0,2 мм без листовых примордиев составляет 1-10 % [60].

Поэтому, если оздоровление от вирусов не является основной задачей, целесообразно использовать экспланты размером 0,5-2,0 мм, состоящие из конуса нарастания и двух-трех листовых примордиев и подстилающего слоя ткани [63, 74, 81, 123]. Экспланты среднего размера легко регенерируют и незначительно инфицированы.

По результатам исследований L.P. Wang, N. Hong, G.P. Wang, W.X. Xu, R. Michelutti, A.M. Wang, при введении в культуру *in vitro* верхушечной ткани почки размером менее 2 мм достигается оздоровление груши от вируса Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV). А при введении в культуру верхушки размером менее 0,5 мм достигается оздоровление груши от вируса Apple stem grooving virus (ASGV) [209].

С увеличением размера экспланта от апикальной меристемы до почки, включающей примордиальную зону и часть наружных листьев (от 0,1 до 10 мм) инфицированность возрастает до 80-90%, но приживаемость намного выше [74, 75].

Например, Харамильо Р.К. экспериментально установлено, что оптимальный размер первичных эксплантов хризантемы составил: для побегов - черенок с 2 узлами, а для листовых эксплантов - сегмент размером 1,0x1,0 - 1,5x1,5 см [40].

Оптимальная длина листового экспланта орхидных растений (*Phalaenopsis amabilis* и *Phalaenopsis "Nebula"*), по данным Gow Wee-Peng, также составляет 1 см [165].

Ориентация на среде. По мнению Матушкиной О.В., морфогенетический потенциал соматических тканей зависит не только от типа эксплантов, но и ориентации листовых пластинок на питательной среде. Более высокой регенерацией обладают ткани стеблей и листьев, которые целесообразно располагать адаксиально [81]. По сведениям тайландских ученых, лучшая приживаемость почек ба-

нана *Musa balbisiana* “Kluai Hin” наблюдается при соприкосновении почек абаксиальной частью со средой МС [175].

По мнению Vered Naor, Meira Ziv, Tirtza Zahavi, корни и каллусы малого размера появлялись на стеблевых сегментах винограда сорта Шардоне, помещенных в прямой позиции на среду без гормонов или с дополнением 1,1 мг/л НУК и 0,45 мг/л бензиладенина на 10-20 день [192].

Таким образом, учёные утверждают, что генотип растений, происхождение экспланта, сроки изоляции, размер эксплантов, ориентация их на среде оказывают большое влияние на успех микроразмножения и являются теми инструментами, оптимизацией которых можно повысить эффективность всей технологии.

1.7 Адаптация оздоровленных мериклонов к нестерильным условиям среды

Субстраты. При адаптации микрорастений *ex vitro* в практике микроразмножения используют большое количество видов субстратов.

Например, для акклиматизации валерианы лекарственной предлагают использовать смесь торфа и перлита в соотношении 2:1, и, как показывает практика, это обеспечивает приживаемость не менее 95% [188].

Что касается растений винограда *in vitro*, Батукаев М.С. предлагает для адаптации в условиях *in vivo* использовать цеолитовый субстрат фракций 1-4 мм в пакетах и 2-5 мм в защищенном грунте. При этом обеспечивается хорошее формирование как корневой системы, так и надземной части растений [10].

Обратимся к исследованиям бразильских ученых, по мнению которых, влияние на рост молодых растений *Cattleya forbezii* на этапе адаптации *ex vitro* оказывает ряд субстратов в порядке убывания положительного действия: ксаксим, гравий + торф, торф, гравий. Для *Laelia purpurata* образован ряд: ксаксим, гравий + торф = торф, ксаксим, гравий [174].

Приживаемость микрорастений фисташки на 81,5% обеспечивает культивирование их на субстрате из смеси торфа + перлита + вермикулита (1:1:1) в теплице. [186].

Соловых Н.В. и др. проводилось изучение эффективности адаптации пробирочных растений ежевики, бойсенберри (малинно-ежевичный гибрид), черной малины *in vivo* в пленочных теплицах с воздушно-капельным орошением. Высадку проводили в мае-июне в субстрат, состоящий из равных долей торфа, почвы и песка. Адаптация *in vivo* растений, имеющих на момент высадки хорошо развитую корневую систему, составляла от 72 до 85 % в зависимости от генотипа. Максимальную способность к адаптации продемонстрировала ежевика. Потеря некоторого количества укорененных растений компенсируется значительной экономией труда. Уже к середине сентября большинство растений достигает товарных кондиций (2-5 стеблей длиной не менее 25 см, хорошо развитая корневая система) [117].

Регенеранты малины красной в процессе их адаптации на торфяном субстрате «Двина» приживались после первого и второго этапов адаптации на 71,5-85,7 %, а в маточнике растений-регенерантов - 84,5- 96,7 % в зависимости от сорта [113].

Согласно Волосевич Н.Н., для предварительно укорененных *in vitro* растений-регенерантов малины приживаемость 68–97 % и хорошее развитие корневой системы наблюдаются при адаптации на торфо-песчаном субстрате. Для адаптации *ex vitro* малины без предварительного укоренения *in vitro* оптимальным являлся субстрат БИОНА-112, обеспечивающий 78–97 % приживаемости растений-регенерантов, максимальный объем корневой системы (до 4,10 мл) и длину надземной части (до 10,37 см), а некоторые сорта лучше адаптировались (72 %) и развивались на смеси БИОНА-112 и перлита [28].

По мнению Корнацкого С.А., при высадке микрорастений в нестерильные условия следует использовать субстрат, состоящий из торфа и песка в соотношении 2:1, а микрорастения следует пересаживать с частью субстрата, в котором проводилось укоренение микрочеренков [66].

Имеется успешный опыт адаптации растений вишни *ex vitro* Майоровой Ю.А., которая предлагает высаживать их в стерильный перлит, увлажненный водным раствором минеральных солей культуральной среды, расположенный над нестерильным почвенным субстратом, под пленочное укрытие [3].

Адаптация на гидропонике. Ряд исследователей предлагают адаптировать микропобеги *ex vitro* не на субстратах, а на гидропонике. К примеру, обратимся к опыту румынских коллег, которые предлагают полученные после микроразмножения (на среде МС + 0,7 мг/л БАП) побеги ежевики *Rubus laciniatus* и *Rubus fruticosus* переносить на гидропонику с плавающими лотками. Данный прием устраняет необходимость в этапе *in vitro* корнеобразования и фазы акклиматизации на твердом субстрате [200].

Наилучшие показатели по высоте побега, числу корней и общей длине корней при адаптации регенерантов вишни к условиям *ex vitro* при сравнении разных субстратов (речной песок, керамзит, гидропонная установка «Минивит» с жидкой питательной средой) зарегистрированы на гидропонной установке (приживаемость растений-регенерантов 92, 80, 100 % соответственно) [102].

Совмещение укоренения и адаптации. Совмещение этапов укоренения и адаптации мериклонов позволяет не только упростить технологию, но и зачастую добиться больших результатов. К примеру, применение приёма на сливе позволило добиться укореняемости в пределах 75,0-100,0 % в зависимости от сорта, снизить потребность в микрочеренках в 3,2 раза, а также исключить дополнительную пересадку и тем самым повысить до 100,0% выход адаптированных растений после культивирования в стерильных условиях, обеспечивая 2-х месячный забег в развитии растений в сравнении с контролем [66].

Райков И.А. придерживается этой же точки зрения и предлагает укоренение растений чёрной смородины и малины проводить одновременно с адаптацией в мини парниках на торфяном субстрате с добавлением песка в соотношении 1:3 [109]. Однако, существует другая точка зрения. В частности,

Соловых Н.В. считает, что высадка в теплицу растений ежевики без корней снижает процент выживших *in vivo* до 40-75 [117].

Обработки препаратами. Обработка адаптантов различными средствами защиты и стимуляторами роста оказывает благоприятное воздействие. Например, Ребровым А.Н. установлено положительное действие препарата эмистим на активизацию развития растений во время доращивания *ex vitro*. [110]. Пучачёв Р.М. считает, что эффективным является использование 0,2% бенлата, снижающего вероятность поражения растений патогенной микрофлорой, и абсцизовой кислоты (3×10^{-5} мг/л) снижающей транспирацию. Обработка растений регуляторами роста (ГК₃ 10 мг/л или ЭБ 0,01 мг/л) с культивированием их при высокой интенсивности света, перед переносом в условия открытого грунта, благоприятно сказываются на их приживаемости, без заметного прекращения роста [107].

Физические факторы культивирования при адаптации. Физические факторы культивирования адаптантов, такие как рН, температура, влажность воздуха и др. имеют большое значение. К примеру, Вовк В. В. установил, что при адаптации укорененных растений малины к почвенному субстрату большое значение имеет уровень рН. Высокая приживаемость наблюдается, если этот показатель не превышает 7,0. Оптимальным сроком для переноса растений в почвенный субстрат является период с сентября по март включительно, а в весенне-летний период выпад растений значительно увеличивается из-за повышения температуры (выше + 25 ° С) [27].

Возможность использовать пониженную температуру как средство воздействия на пробирочные растения гладиолуса, позволила, по мнению Лапинской М.П, повысить их приживаемость в нестерильных субстратах до 90-100% в течение 3-4-х месяцев [73]. Опыт Корнацкого С.А., проведенный при подготовке микрорастений к пересадке в нестерильные условия путем адаптации надземной части к влажности воздуха 50 – 60 %, указывает, что их жизнеспособность зависит от степени развития корневой системы, а после пересадки в нестерилизованный субстрат - от температуры окружающей среды. Повышение темпе-

ратуры воздуха в культивационном помещении в интервале от 25 ° до 35 ° С приводит к резкому уменьшению числа прижившихся растений [66].

Интересен тот факт, что при пересадке неадаптированных пробирочных растений в стерилизованный субстрат в условия влажности воздуха, близкой к 100 %, приживаемость растений сливы не зависит от наличия корней, их числа и длины. Соблюдение указанных требований позволяет вовсе исключить потерю выращенных растений [66].

Проанализировав вышеприведённые данные, можно сказать, что существует большое число мнений о том, как следует проводить адаптацию микрорастений к условиям *ex vitro*, и нет единой технологии. К тому же, каждый вид и сорт растений требует индивидуальных условий адаптации. Поэтому поиск оптимальных решений для каждого конкретного сортообразца по-прежнему актуален.

Усовершенствование метода клонального микроразмножения плодовых растений является многокомпонентным процессом, включающим в себя оптимизацию широкого спектра факторов на всех этапах микроразмножения, таких как подбор оптимальных составов питательных сред и композиций ростовых веществ, эффективных и безопасных стерилизаторов и антибиотиков для снижения посадочной инфекции, оптимизацию сроков введения в культуру *in vitro*, факторов адаптации к нестерильным условиям среды и других.

Как видно из обзора литературных данных, нет единого мнения ученых о влиянии всех этих элементов технологии на успех клонального микроразмножения плодовых культур. К тому же для каждого вида и сорта растений оптимальный набор факторов культивирования индивидуален. Для подвоев серии СК технология клонального микроразмножения не была адаптирована.

Стоит отметить, что важными проблемами данной технологии являются повышение ее безопасности и снижение себестоимости. Дело в том, что некоторые используемые при клональном микроразмножении препараты являются токсичными для человека, такие как сулема, 6-бензиламинопурин; а также дорогостоящими компонентами, например гиббереллиновая кислота, 6-бензиламинопурин, индолилмасляная кислота, бактериологический агар-агар. Поэтому замена или ча-

стичная замена данных препаратов веществами, сходными с ними по действию, но более экономичными и безопасными, позволит повысить безопасность технологии клонального микроразмножения и снизить ее себестоимость.

Экспериментальные данные по оптимизации различных элементов культивирования *in vitro* подвоев яблони серии СК и ММ 106 на всех этапах микроразмножения, а также исследования по повышению безопасности и снижению себестоимости данной технологии приведены далее в главе «Результаты исследования».

2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объекты исследований

Объектами исследований явились различные химические соединения – компоненты питательных сред, а также приёмы культивирования *in vitro* подвоев яблони СК 2, СК 3, СК 4, СК 7 (селекции СКЗНИИСиВ), ММ 106 (селекции Мертон-Моллинской опытной станции). Предметом изучения явилась методика кло-нального микроразмножения подвоев яблони. Исследования выполнены в лабора-тории биотехнологии СКЗНИИСиВ в 2010-2015 гг.

Характеристика использованных препаратов

Стимуляторы роста. Испытанные в работе стимуляторы роста были со-зданы в ФГБОУ ВПО КубГТУ. В таблице 1 представлена их характеристика.

Таблица 1 – Характеристика химических соединений

№	Шифр или триви- альное название	Состав
1	Л-1	2-метил-2,5-диэтокси-2,5-дигидрофуран
2	I-1	15 % 2-фуранкарбоновой кислоты, 40 % 3-амино-4-гидрокси-2-оксодикарбоновая кисло- та, 7 % янтарной кислоты, 10 % винной кислоты, 15% яблочной кислоты, 13 % малеиновой кислоты
3	II-2	20 % 2-фуранкарбоновой кислоты 30 % 3-амино-4-гидрокси-2-оксодикарбоновая кисло- та, 20 % винной кислоты, 15 % яблочной кислоты, 15 % малеиновой кислоты
4	Фуrolан	98,9 %-ный 2-(1,3-диоксоланил-2) -фуран
5	Янтарная кислота	97,5 %-ная 1,4-бутандиовая кислота
6	Сукцинат калия	дикалиевая соль янтарной кислоты
7	Сукцинат натрия	динатриевая соль янтарной кислоты
8	Кротонолактон	97,5 %-ный 2-(5Н) -фуранон
9	«Кавказ»	35 %-ный 2-(5Н) -фуранон
10	«Универсальный»	85 %-ная 1,4-бутандиовая кислота (янтарная кислота)

Данные регуляторы роста являются производными органических кислот, а также препаратами, синтезированными на основе фурфурола, полученного при переработке отходов с.-х. производства. Выбор в пользу именно этих обладающих ростовой активностью, но ранее не испытанных в технологии клонального микроразмножения препаратов был сделан потому, что они являются малотоксичными, экологически чистыми, экономичными регуляторами роста нового поколения, используемыми в микродозах.

Все вещества добавлялись в среду перед автоклавированием в концентрации 0,4 - 40 мг/л. В качестве контроля использована стандартная композиция ростовых веществ 1 мг/л БАП, 0,5 мг/л ГК, 0,1 мг/л ИМК.

Препараты «Универсальный» и «Кавказ», полученные в результате окисления фурфурола перекисью водорода, являются композиционными.

Препарат «Универсальный» представляет собой композицию, содержащую до 85% янтарной кислоты, до 5 % - комплекс малеиновой и фумаровой кислот и до 10% кротонолактона. Это кристаллический порошок желтого цвета с характерным запахом, растворимый в воде до 5 %. Препарат «Универсальный» - малотоксичное соединение ($LD_{50}=2297-2675$ мг/кг) с не резко выраженными кумулятивными свойствами, кожной токсичностью не обладает [125].

Препарат «Кавказ» (кротонолактон 35 %-ный раствор) - композиция, содержащая не менее 35 % кротонолактона и не менее 35 % смеси янтарной, малеиновой, фумаровой кислот - жидкость красно-желтого цвета, хорошо растворимая в воде. Препарат «Кавказ» относится к малотоксичным соединениям ($LD_{50}=2230-1074$ мг/кг), не обладает кумулятивными, кожно-резорбтивными, мутагенными, канцерогенными, эмбриотоксическими и гонадотоксическими свойствами. ДОК препарата в зерновых культурах с позиций комплексного гигиенического нормирования установлен на уровне 0,5 мг/кг, ПДК для воды водоемов - 0,065 мг/дм³ [124].

Кротонолактон (2(5H) -фуранон) - бесцветная жидкость, с характерным запахом, хорошо растворимая в воде и органических растворителях, представляющая композицию изомеров лактона с двойной связью в α , β - (84,1 %) и

β , δ -положении (15,9 %). 2(5H) -фуранон относится к среднетоксичным соединениям ($LD_{50}=527$ мг/кг) [101].

Препарат фуролан - бесцветная жидкость со слабым специфическим ацетальным запахом, содержащая 98,89 % действующего вещества, 2- (1,3- диоксоланил-2) фурана, растворимая в воде и хорошо растворимая в органических растворителях. Фуролан относится к среднетоксичным соединениям ($LD_{50}=511-626$ мг/кг), кумулятивными, кожно-резорбтивными, мутагенными, аллергенными, тератогенными и эмбриотоксическими свойствами не обладает. МДУ препарата в продуктах растительного происхождения 0,05-3 мг/кг, ПДК для воды водоемов - 0,00083 мг/л [95].

Сукцинат калия и натрия – калиевая и натриевая соль янтарной кислоты, применяются в пищевой промышленности как регуляторы кислотности, содержатся во всех живых клетках, также применяются как БАДы [45, 119].

Янтарная кислота – органическая кислота, содержится в незначительном количестве в буром угле, янтаре, в растениях и животных организмах; является промежуточным продуктом трикарбоновых кислот цикла. Ее используют для получения некоторых пластмасс, полиэфирных смол, красителей, инсектицидов, лекарственных веществ, а также для синтеза полиядерных ароматических углеводов [139].

Антибиотики. На этапе введения экплантов в культуру *in vitro* были испытаны антибиотики с целью снижения уровня контаминации экплантов инфекцией и повышения выхода регенерировавших микропобегов.

Цефотаксим — лекарственное средство, полусинтетический антибиотик группы цефалоспоринов III поколения, широкого спектра действия, для парентерального введения. Препарат эффективен в отношении многих грамположительных аэробов и анаэробов и обладает высокой активностью к грамотрицательным бактериям. Влияет бактерицидно на штаммы бактерий, стойких к пенициллину, аминогликозидам, сульфаниламидам [132].

Тетрациклин - бактериостатический антибиотик из группы тетрациклинов. Активен в отношении грамположительных микроорганизмов, включая продуци-

рующие пенициллиназу штаммы), грамотрицательных микроорганизмов, большинства энтеробактерий [120].

Нистатин - антибиотик из группы полиенов, обладает фунгистатическим действием. Высокоактивный в отношении дрожжеподобных грибов препарат. В структуре антибиотика имеются двойные связи, обладающие высокой тропностью к стероловым структурам цитоплазматической мембраны грибов, что способствует встраиванию молекулы препарата в мембрану клетки и образованию большого количества каналов, через которые осуществляется бесконтрольный транспорт электролитов; повышение осмолярности внутри клетки приводит к ее гибели. Толерантность развивается медленно [87].

Гризеофульвин - противомикозный антибиотик, эффективен в отношении грибов рода *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* [42].

В связи с постоянным обновлением штаммового состава микроорганизмов, обновлением препаратов были испытаны антибиотики нового поколения: аугментин, ксенаквин, макропен, цефепим.

Аугментин относится к группе комбинированных пенициллинов. Действующие вещества: амоксициллин (в виде амоксициллина тригидрата), клавулановая кислота (в виде калия клавуланата). Амоксициллин - это полусинтетический антибиотик широкого спектра действия, активный против многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Следует отметить, что амоксициллин разрушается под действием микробных ферментов (беталактамаз) и не действует на микроорганизмы, которые продуцируют эти ферменты. Клавулановая кислота - это бета-лактам, структурно родственный пенициллинам, который обладает способностью инактивировать беталактамазы [8].

Ксенактивин относится к группе фторхинолонов. Фторхинолоны – интенсивно развивающаяся группа синтетических антимикробных препаратов, объединенных единым механизмом – ингибированием ключевого фермента микробной клетки – ДНК-гиразы. Ломефлоксацин (действующее вещество препарата) предложен для асептики недавно и является новым препаратом этой группы, про-

являет высокую активность в отношении грамположительных микробов, имеет хорошие фармако-кинетические свойства [67].

Макропен относится к группе макролидных антибиотиков. По механизму действия на микробную клетку они относятся к ингибиторам синтеза белка. Действуют преимущественно на грамположительные микробы; проявляют активность в отношении некоторых грамотрицательных микробов, микоплазм [79].

Цефепим – антибиотик группы цефалоспоринов IV поколения. Цефалоспорины IV поколения появились в асептике в последние годы и характеризуются более широким спектром антимикробного действия, чем цефалоспорины III поколения. Они проявляют высокую активность в отношении грамотрицательных бактерий. Цефалоспорины IV поколения проявляют высокую стабильность в отношении хромосомных и плазмидных беталактамаз [131].

Стерилизаторы. На этапе введения экплантов в культуру *in vitro* нами протестирован ряд не применявшихся ранее в клональном микроразмножении препаратов для стерилизации экплантов.

Фосфопаг – дезинфицирующее средство на основе гуанидина (полигексаметиленгуанидин фосфат - 20 %). Средство фосфопаг предназначено: для дезинфекции поверхностей в помещениях, жесткой мебели, поверхностей аппаратов, приборов, санитарно-технического оборудования. Рекомендуется использование препарата для борьбы с плесневыми грибами. Эффективен против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Воздействует не только на аэробную и анаэробную микрофлору, но и подавляет вирусы. Относится к IV классу опасности - малоопасные вещества [128, 129].

Скор, КЭ - системный фунгицид с длительным профилактическим и выраженным лечебным действием, для борьбы с паршой, мучнистой росой, курчавости листьев фитофторозом и альтернариозом и другими грибными заболеваниями. Действующее вещество: дифеноконазол, в концентрации 250 г/л. Относится к третьему классу опасности - умеренно опасное вещество [114].

Эупарен - фунгицид широкого спектра действия. Химическая группа – сульфамиды. Применяется против мильдю, оидиума, парши, фитофтороза,

пятнистостей, серой, плодовой и монилиальной гнилей на винограде, яблоне, груше, пасленовых, землянике, малине, косточковых. Обладает хорошим акарицидным действием против красного и плодового клеща. Эупарен малотоксичен для теплокровных, кумулятивные свойства слабо выражены. Относится к третьему классу опасности [138].

Делан - универсальный фунгицид контактного действия, высокоэффективен в борьбе со многими грибными болезнями плодовых культур и винограда. Относится к третьему классу опасности - умеренно опасное вещество [44].

Также были использованы уже известные в технологии клонального микроразмножения стерилизаторы, испытана их эффективность для подвоев яблони серии СК и ММ 106.

Перекись водорода (H_2O_2) применяется в основном для стерилизации семян, в концентрациях до 30 % с экспозицией 20-60 минут. После стерилизации достаточно промыть материал в одной порции стерильной воды в течении 2-3 минут. Оставшийся пергидроль быстро разлагается. Недостаток - очень большая экспозиция [47].

Бытовой препарат «Белизна». Активным компонентом является гипохлорит натрия Гипохлорит натрия ($NaClO$) применяется для стерилизации в концентрациях 0,5-5 % с экспозицией 1-20 мин. Недостатком является высокая токсичность для клеток. После стерилизации необходима промывка в 8-10 порциях стерильной воды [47].

В качестве стандарта нами было использовано широко применяемое в технологии клонального микроразмножения вещество – сулема.

Ртуть двухлористая (сулема) $HgCl_2$ - универсальный стерилизующий агент. Используется в концентрации 0,1 % с экспозицией 1-10 мин. в зависимости от вида растительной ткани. Раствор можно использовать до 4 раз. После стерилизации необходима промывка стерильной водой в 2-3 порциях по 2-3 минуты каждая. Недостаток – высокая токсичность для человека. Относится к первому классу опасности - вещества чрезвычайно опасные [47].

2.2 Методы исследований

При работе с культурой тканей мы пользовались общепринятыми методами:

Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / под ред. Е.Н. Джигадло - Орел: ГНУ ВНИИСПК- 2005 [47];

Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений: автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора сельскохозяйственных наук В.А. Высоцкий. – М., 1998 [33];

Методические рекомендации по применению искусственной культуры тканей и органов в генетико-селекционных работах с плодовыми, - Мичуринск, 1987г. [82];

Рекомендации по выращиванию безвирусного посадочного материала плодово-ягодных культур и винограда / М.: Колос. 1980 [111];

Доспехов, Б.А. Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных / Б.А. Доспехов. – М.: Колос, 1972 [53].

В исследованиях использовано оборудование клонального микроразмножения *in vitro*:

- стерилизатор ВК-30;
- шкаф сушильный ШС-80 (0 +200) ;
- дистиллятор ДЭ-10;
- термостат с воздушным охлаждением ТСО-1/80;
- рециркулятор воздуха бактерицидный ОБР-30;
- облучатель ОБН-1х30;
- весы аналитические Shinko HTR-220-E;
- мешалка магнитная С-MAG HS 7;
- ламинарный бокс С-1,2(код 110.120) ;
- микроскоп Биомед3И (инвертированный) ;
- рН-метр рН-150И;
- люксметр ТКА-люкс.

Исследования проводились в течение 4 этапов клонального микроразмножения. Схема постановки опытов приведена на рисунке 1.



Рисунок 1 – Схема постановки опытов

На этапе введения в культуру in vitro изучили стерилизаторы и антибиотики. На этапе собственно микроразмножения провели испытание ранее не применявшихся в клональном микроразмножении регуляторов роста и подобрали оптимальные рецепты питательных сред для изучаемых подвоев яблони. На этапе ризогенеза осуществили подбор композиций ростовых веществ. На этапе адаптации мериклонов к нестерильным условиям среды выявили оптимальную степень развития стебля и корневой системы микрорастений для начала адаптации, подобрали оптимальный состав субстратов и объем культивационных сосудов.

Поддержание стерильности. На первых трёх этапах клонального микроразмножения поддерживали стерильность питательной среды, посуды, инструмента, материалов и т.д. Стерилизацию посуды и инструментов проводили обработкой сухим жаром в сушильных шкафах при температуре 180 - 200° С в течение

нии 1,5-2 часов. Стерилизацию инструментов, кроме того, проводили в боксе периодически во время работы, погружая инструмент в стаканчик с 96 % этанолом и обжигая его в пламени спиртовки. Стерильные инструменты использовали только для одноразовой манипуляции. Перед повторной манипуляцией инструменты снова обжигали. Инструмент всегда находился в операционной и дополнительно стерилизовался во время включения бактерицидных ламп.

При подготовке стерильной комнаты обрабатывались спиртом поверхности всех столов. Перед работой в боксе исследователю необходимо было тщательно вымыть руки с мылом и щеткой под струей теплой воды, переодеться в стерильный халат, сменную обувь, надеть марлевую повязку. В боксе провести дополнительную дезинфекцию рук, протирая их спиртом. Во время работы двери в операционную держали закрытыми, избегали движения руками над открытыми культуральными сосудами с питательной средой. Производя извлечение или посадку ткани, конгломерата почек, микрорастения пробирки или колбы держали, по возможности, горизонтально во избежание попадания в них пыли или инфекции, посадку выполняли как можно быстрее, сводя до минимума время, при котором культуральные сосуды остаются открытыми, после посадки обжигали горлышко сосуда в пламени спиртовки и закрывали пробкой.

Техника стерилизации растительного материала. У почек подвоев яблони снимали кроющие чешуи, с черенка снимали кору и срезали почку с частью древесины, (щиток как для окулировки) и промывали в проточной воде в течение 15-20 минут. Все эти манипуляции проводили в нестерильных условиях. Дальнейшие работы вели в стерильных условиях бокса. В операционной заранее подготавливали сосуд с раствором стерилизующего агента, колбы с проавтоклавированной в течение 30 минут при давлении 1,5 атмосферы, водой, емкость для использованной воды, стерильные чашки Петри, с фильтрами из фильтровальной бумаги. Очищенный и подготовленный растительный материал, каждый в своем сосуде (если подготавливается для вычленения несколько сортов или гибридов), на необходимое время заливали стерилизующим агентом, активно перемешивали. По истечении времени стерилизации раствор сливали и заливали объекты стерильной

водой на 2-3 минуты. Промывку проводили в 2-4 порциях воды. Простерилизованные и промытые объекты помещали в чашки Петри на фильтры. Подготовленный таким образом материал использовали для вычленения меристем.

Особенности исходного материала. Для введения в культуру *in vitro* отбирались верхушечные почки с черенков подвоев СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106. В культуру *in vitro* вводились экспланты размером 1-2 мм, которые располагали в культивационных сосудах так, чтобы они соприкасались абаксиальной частью со средой.

Питательные среды, условия культивирования. При клональном микроразмножения *in vitro* подвоев яблони применяли минеральные основы сред по прописи Мурасиге-Скуга [189]. Для приготовления маточных растворов макро- и микроэлементов использовали неорганические соли отечественного производства марки х.ч. или ч.д.а. Среды автоклавировали при температуре 120 ° С и давлении 1 атм в течение 20 мин в вертикальных автоклавах ВК-30. Все работы по стерилизации и плановые пересадки растительного материала осуществляли в ламинар-боксе С-1,2 (код 110.120).

Культивирование микропобегов осуществляли в условиях стандартного фотопериода 16/8 (день - 16 часов, ночь - 8 часов), освещенности 2500-3000 люкс, температуре +23±3 ° С и влажности 50-60 %. Каждые 30-40 суток проводили субкультивирование новых побегов на свежую питательную среду.

На этапе введения эксплантов в культуру *in vitro* использовали среду Мурасиге-Скуга с половинным содержанием минеральных солей, дополненную 6-БАП 0,4 мг/л. В состав сред отдельно вносили 400-500 мг/л антибиотиков.

Для поддержания нормального роста на этапе мультипликации микропобегов *in vitro* в среду МС с полным составом солей вносили регуляторы роста: 6-бензиламинопуридин (1,0 мг/л), гибберелловую кислоту (0,5 мг/л), идолилмасляную кислоту (0,1 мг/л), препараты с шифром I-1 II-2, Л-1, кротонолактон, янтарную кислоту, сукцинаты калия и натрия, препараты «Кавказ», «Универсальный», «Фуrolан» (0,4 –40 мг/л, см. табл.1). Все регуляторы роста, смеси витаминов до-

бавляли в среды после автоклавирования. В качестве основного желирующего агента применяли агар-агар бактериологический. Основным источником углеводного питания на этапе микроразмножения являлась сахароза (20-30 г/л). Питательные среды дополняли витаминами по Мурасиге-Скугу.

Опыты по укоренению размноженных сортов проводили на средах Мурасиге-Скуга с половинным составом солей. В качестве индуктора ризогенеза применяли ИМК, которую добавляли непосредственно в среду укоренения в концентрации 1 – 2,5 мг/л, после чего растения переводили в условия стандартного фотопериода. Укорененные микрорастения переносили в поликарбонатные теплицы для прохождения этапа адаптации и дальнейшего культивирования.

При оценке результативности микроразмножения учитывали: уровень регенерации эксплантов (отношение числа регенерировавших эксплантов к числу высаженных), образование раневого каллуса, число побегов, сформированных каждым эксплантом, в качестве интегрального показателя эффективности пролиферации рассчитывали коэффициент размножения (отношение суммы всех сформированных побегов в каждом варианте к числу исходных эксплантов), число листьев у экспланта, интенсивность окраски листьев (хлороз или здоровая интенсивно зелёная окраска листьев), наличие стебля, общее состояние мериклонов по 5-балльной шкале.

На этапе ризогенеза фиксировали число укорененных и неукоренившихся микропобегов и по этим данным рассчитывали частоту укоренения в процентах, отмечали количество побегов с каллусом.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Результаты испытаний ранее не использовавшихся в культуре *in vitro* стимуляторов роста

Традиционно в технологии клонального микроразмножения используют природные регуляторы роста – фитогормоны (метаболиты самих растений) и их синтетические аналоги. Они участвуют в регуляции процессов жизнедеятельности, в значительной мере определяя характер и темпы роста и развития эксплантов [43, 46, 64, 70, 84, 89, 103, 112, 133, 176, 191, 210]. Однако, стандартно используемые стимуляторы роста являются дорогостоящими препаратами: 1 г 6-БАП– 3390,5 руб., 1 г ГК – 7773,8 руб. по данным сайта Sigma-Aldrich в августе 2015 г. [140, 164], а также опасными веществами (ГК умеренно опасна, 6-БАП токсичен). В современных условиях происходит постоянное быстрое обновление препаратов, также синтезируются новые соединения, обладающие рострегулирующими свойствами, ещё не испытанные при микроразмножении растений. В связи с этим актуальным является испытание и подбор новых, менее опасных, более экономичных препаратов ростовых веществ с эффективностью на уровне контроля (6-БАП, ИМК, ГК) и выше. Поэтому нами был проведён ряд экспериментов по испытанию ростовой активности ранее не использовавшихся в клональном микроразмножении малотоксичных, экологически чистых, экономичных препаратов нового поколения.

В первой серии опытов испытано 4 регулятора роста: Л-1, I-1, II-2, фуrolан в концентрации 4 - 0,4 мг/л. Все вещества добавлялись в среду перед автоклавированием. В качестве стандартного варианта использована композиция ростовых веществ 1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л ИМК и 0,5 мг/л ГК.

Росторегулирующую активность исследуемых веществ оценивали по следующим показателям: приживаемость эксплантов, число листьев у экспланта, интенсивность окраски листьев (хлороз или здоровая интенсивно зелёная окраска

листьев), наличие стебля, число растений, выросших из одной меристемы (коэффициент размножения), наличие каллуса, интенсивность ризогенеза, общее состояние мериклонов по 5-балльной шкале. Результаты испытаний препаратов в концентрации 0,4 мг/л приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Состояние эксплантов (подвой серии СК и ММ106) на средах с различными ростовыми веществами (концентрация 0,4 мг/л) к третьему passages

Ростовое вещество	Число листьев на одном экспланте, шт.	Коэффициент размножения	Общее состояние микрорастений по 5-балльной шкале, балл.	Число растений с интенсивной зелёной окраской листьев, %	Число растений со стеблем, %	Число растений с каллусом у основания микропобега более 4 мм, %	Число растений с корнями, %
Л-1	5,3	3,1	3,6	50	28	3,8	0
I-1	4,6	3,2	4,1	47	42	2,3	0
II-2	4,4	3,2	3,5	41	26	2,9	0
Фурулан	5,4	3,2	4,2	61	39	2,2	0
6-БАП 1 мг/л + ИМК 0,1 мг/л + ГК 0,5 мг/л (st)	4,8	3,2	3,8	52	36	2,9	0
Без ростовых веществ (контроль)	3,0	1	3,2	35	30	2,9	0
НСР ₀₅	0,8	0,9	0,4	9	6	0,6	

Из таблицы 2 видно, что препараты I-1 и фурулан в концентрации 0,4 мг/л благоприятно влияют на общее состояние эксплантов (4,1 и 4,2 балла к третьему passages соответственно), стандарт – 3,8 баллов (различие между вариантами «фурулан» и «стандарт» существенно). Среда с препаратом I-1 оказывает наибольший эффект удлинения: доля эксплантов, развивших стебель, составила 42 % к третьему passages (стандарт – 36 %, различие существенно, рисунок 2).



Рисунок 2 – Регенерация микропобегов из эксплантов подвоев серии СК *in vitro*

По числу развившихся у эксплантов листьев выделились среды с препаратами фуролан (5,4 шт.) и Л-1 (5,3 шт.), стандарт – 4,8 шт., существенного различия со стандартным вариантом не отмечено. Максимальная доля эксплантов со здоровой зелёной окраской листьев образуется на среде с фуроланом (61 %, контроль – 52 % к третьему пассажу, различие существенно). Большой каллусообразовательной способностью обладает препарат Л-1: доля мериклонов, регенерировавших каллус у основания побегов, составила 3,8 %, в контрольном и стандартном вариантах – 2,9 %, различие существенно (таблица 2, рисунок 2). Полученные результаты исследований отражены в публикациях [12, 20, 90].

Установлено, что изученные препараты в концентрации 0,4 мг/л оказывают мультиплицирующее воздействие на растения (коэффициент размножения 3,1 - 3,2; стандарт – 3,2 к третьему пассажу). Корнеобразующего воздействия на мериклоны у изученных ростовых веществ не выявлено (таблица 2).

В литературных источниках содержатся сведения о том, что основным фактором, определяющим коэффициент размножения яблони, является соотношение цитокининов и ауксинов в питательной среде [21, 62, 207].

Мнения авторов расходятся лишь в том, применять ли на первых двух этапах микроразмножения растений цитокинины и ауксины совместно или использовать только БАП. Приводятся аргументы как в ту, так и в другую сторону.

Например, D. Dunstan et al. выявил, что микрорастения подвоя яблони М 4 на этапах введения в культуру и собственно микроразмножения образуют максимальное количество хорошо развитых побегов на среде, содержащей 1,15 мг/л БАП и 0,15 - 0,2 мг/л ИМК [153].

Сторонники другой точки зрения считают, что высокая гормональная насыщенность питательной среды приводит к угнетению эксплантов вплоть до их гибели [133], и, чтобы избежать этого, предлагают на первых двух этапах микроразмножения растений использовать только БАП [5, 55, 123, 156, 202].

Сведения о замене дорогостоящих фитогормонов веществами другой природы в литературных источниках встречаются редко.

Например, Шорников Д.Г. предложил сочетать препараты гибберелловой кислоты (1мг/л) и 6-БАП (1 мг/л) со спиртовым экстрактом корня элеутерококка для стимуляции побегообразования эксплантов элеутерококка колючего [136].

И.М. Фартизинова (1999) предложила замену традиционным стимуляторам роста: согласно её исследованиям использование настойки лимонника (15-20 капель/л) при микроразмножении груши обеспечивает сокращение сроков получения полноценных регенерантов, увеличение коэффициента размножения, снижение себестоимости питательной среды [93].

Этим же автором в 1996 году было предложено для микрклонального размножения подвоев яблони в качестве стимулятора роста применять экстракт родиолы в концентрации 10-30 капель/л [92].

Таким образом, изученные препараты в концентрации 0,4 мг/л оказывают на микропобеги сходное с цитокининами действие и могут быть использованы для клонального микроразмножения подвоев яблони наравне с композицией БАП и ауксинов.

Способность к стимуляции роста микрообегов *in vitro* у препаратов была также выявлена в десятикратно увеличенной концентрации. Оценка росторегулирующей активности исследуемых веществ в концентрации 4 мг/л приведена в таблице 3.

Таблица 3 – Состояние эксплантов (подвой серии СК и ММ106) на средах с различными ростовыми (концентрация 4 мг/л) веществами к третьему пассажиру

Ростовое вещество	Число листьев на одном экспланте, шт.	Коэффициент размножения	Общее состояние микрорастений по 5-балльной шкале, балл.	Число растений с интенсивной зелёной окраской листьев, %	Число растений со стеблем, %	Число растений с каллусом у основания микропобега более 4 мм, %	Число растений с корнями, %
Л-1	3,5	3,0	3,1	50	11,6	10,0	0
I-1	5,9	3,8	3,8	47	45,0	0	0
II-2	4,7	3,3	3,2	41	17,3	10,0	0
Фуролан	6,3	3,9	4,1	68	55,6	4,3	0
6-БАП 1 мг/л + ИМК 0,1 мг/л + ГК 0,5 мг/л (st)	4,0	3,3	3,5	40	21,0	4,5	0
Без ростовых веществ (контроль)	3,0	1	3,0	37	20,0	4,2	0
НСР ₀₅	1,3	0,4	0,4	11	17	3,7	

Из таблицы 3 видно, что в концентрации 4 мг/л к третьему пассажиру по влиянию на общее состояние мериклонов выделились препараты фуролан (4,1 балла, различие со стандартом существенно), I-1 (3,8 балла, различие со стандартным вариантом (3,5 балла) несущественно). Среда с фуроланом и препаратом I-1 оказывают наибольший эффект удлинения: доля эксплантов, развивших стебель, соответственно 55,6 и 45 % (стандарт – 21 %, различие существенно).

Максимальная доля эксплантов со здоровой зелёной окраской листьев образуется на среде с фуроланом (68 %, стандарт – 40 %, различие существенно). По каллусогенезу выделились препараты II-2 и Л-1: доля мериклонов, регенерировавших каллус у основания побегов, - 10 %, стандарт – 4,5 % (табл. 3).

В концентрации 4 мг/л препараты фуролан и I-1 оказывают эффективное мультиплицирующее воздействие на растения: коэффициент размножения 3,9 и 3,8 соответственно (в стандартном варианте: 3,3, различие в обоих вариантах существенно, контрольный вариант из-за низкого коэффициента размножения в

расчёт не брали). Корнеобразующего воздействия на мериклоны у изученных ростовых веществ в концентрации 4 мг/л также не выявлено (таблица 3).

Установлено, что наибольшее число листьев (6,3 шт.) образуется на среде с фуроланом; растения, выращенные на средах с добавлением вещества I-1, регенерируют, в среднем, 5,9 листа на экспланте (стандарт – 4,0 листа, различие существенно в первом случае, таблица 3). Данные результаты исследований отражены в публикациях [12, 20, 90].

Таким образом, воздействие изученных препаратов на микропобеги в концентрации 4 мг/л также сходное с цитокининами (увеличение коэффициента размножения на 0,5-0,6 единиц), к тому же происходит улучшение общего состояния микропобегов: увеличивается число образовавшихся листьев на побег, больший процент эксплантов формирует здоровую зелёную окраску листьев и стеблей.

В литературе отмечено влияние некоторых компонентов среды на усиление пролиферации микропобегов и улучшение их общего состояния.

Например, Райков И.А. и Челябин Д.Н. считают, что положительное влияние на пролиферацию дополнительных побегов чёрной смородины и малины оказывает витаминно-минеральный комплекс «Компливит» в концентрации 2 г/л [109, 134].

Добавление 2 мг/л метатополлина в среду МС с В₅-витаминами и 4 мг/л 6-бензиладенина, по мнению Venmahiou Venamar, генерировало оптимальное число побегов с приемлемыми признаками [186].

Майоровой Ю.А. для повышения коэффициента размножения гибридов вишни предложено использовать в качестве добавок в питательную среду новые БАВ: биоантарную кислоту в концентрации от 0,5 до 1,0 мг/л (повышает коэффициент размножения до 20,4) и К-УНИ 2,0 мг/л (повышает коэффициент размножения до 4,4) [78].

Упадышев М.Т. утверждает, что фенольные соединения повышают эффективность размножения растений на этапах пролиферации, укоренения и адаптации. Фенолкарбоновые кислоты с одной гидроксильной группой (сиреневая,

феруловая, л-кумаровая) стимулируют побегообразование, кислоты с несколькими гидроксильными группами (галловая, хлорогеновая) и флоридзин - ризогенез [2, 91].

На этапе микроразмножения ежевики сорта Thornless Evergreen хорошие результаты получены Fira Alexandra при использовании гелкарина GP-812 (2 г/л). Добавка смолы гуара, по мнению этого же автора, уменьшала интенсивность размножения, но микрорастения развивались более сильными и выравненными [161].

Так и в нашем случае, препараты фуrolан, I-1 способствуют развитию сильных, выравненных микропобегов, со здоровой зелёной окраской, а также стимулируют пролиферацию.

На рисунке 3 приведены фотографии микропобегов подвоя СК 4 на средах с фуrolаном и стандартной композицией ростовых веществ: БАП 1,0 мг/л, ГК 0,5 мг/л.



Рисунок 3 - Микрорастения подвоя СК 4: слева на среде с фуrolаном 4 мг/л, справа – на среде с БАП и гиббереллиновой кислотой (стандарт)

Для сравнения эффективности изучаемых стимуляторов роста между собой и в концентрациях 0,4 и 4 мг/л на диаграмме рисунка 4 сопоставили средние значения всех параметров.

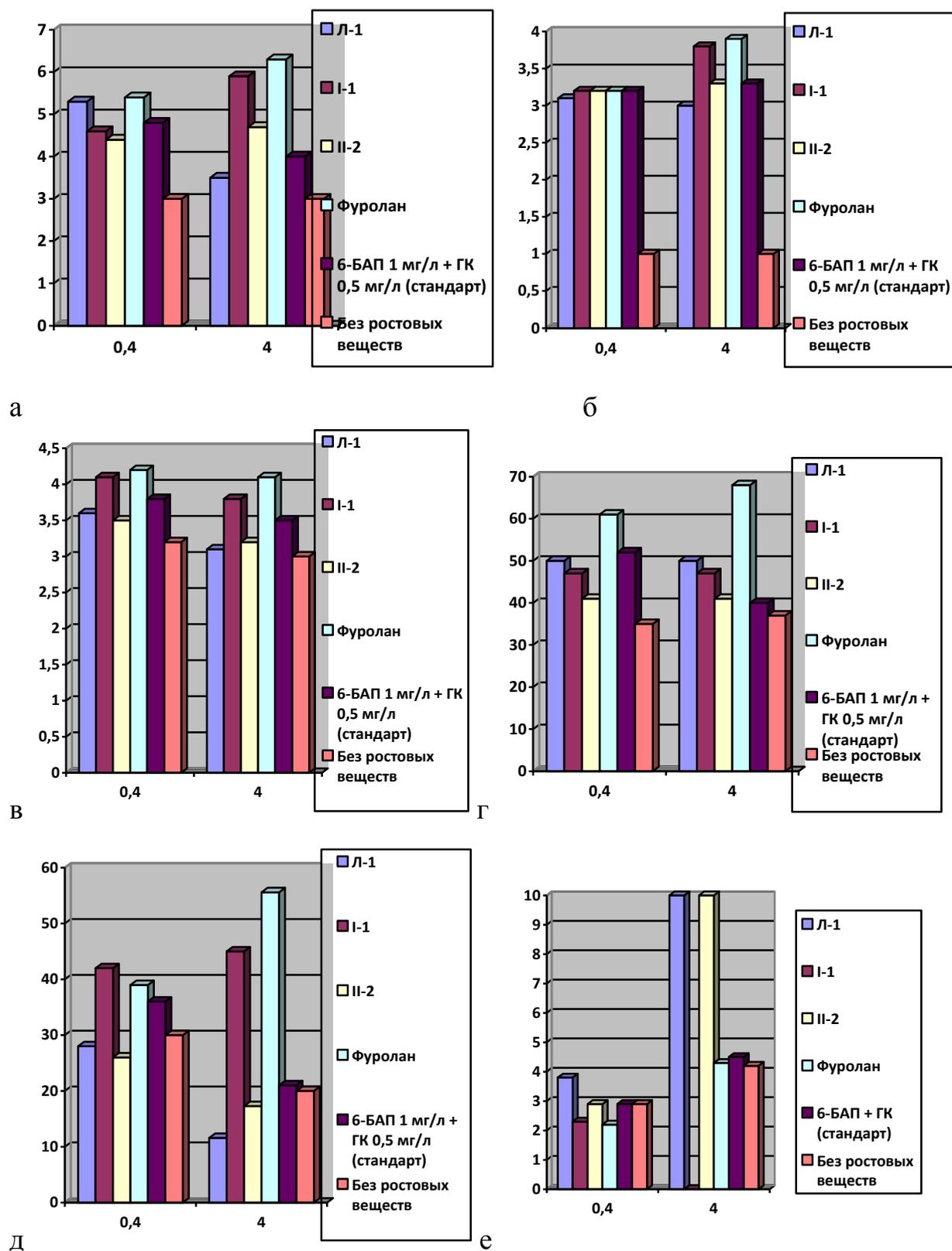


Рисунок 4 – Значения исследуемых параметров ростовой активности экспериментальных стимуляторов роста в концентрации 0,4 и 4 мг/л питательной среды: а – число листьев на 1 эксплант; б – коэффициент размножения; в – общее состояние по 5 б. шкале; г – процентная доля микрорастений с интенсивной зелёной окраской листьев; д - процентная доля микрорастений с выполненным стеблем; е - процентная доля микрорастений с каллюсом.

Из диаграммы видим, что к третьему passages на фотосинтетическую активность (стандартное окрашивание эксплантов в зелёный цвет) эффективнее других препаратов влияет (стимулирует) фуrolан в обеих изученных концентрациях 0,4 и 4 мг/л питательной среды (рис. 4 г). Этот же препарат, но только в одной концентрации 4 мг/л показал максимальную способность стимулировать рост стеблей (побегов) у мериклонов, т.е. проявил себя как аналог гиббереллинов (рис. 4 д).

В концентрации 4 мг/л питательной среды препарат фуrolан выделился среди других изучаемых стимуляторов роста в качестве индуктора побего- и листообразования (цитокининовая активность, рис. 4, а, б).

По положительному влиянию на общее состояние эксплантов выделились фуrolан, а также препарат I-1 в обеих изученных концентрациях (рис. 4 в).

Индукцию каллюсогенеза наиболее эффективно стимулируют препараты Л-1 и П-2 в концентрации 4 мг/л (рис. 4 е).

Целью следующей серии опытов было выявление оптимальной концентрации выделившегося ростового вещества фуrolан. Испытаны 4 концентрации: 0,4 мг/л, 4 мг/л, 8 мг/л, 40 мг/л. Результаты исследования приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Состояние эксплантов (подвой серии СК и ММ106) к третьему passages на средах с препаратом фуrolан в различных концентрациях

Варианты	Число листьев на одном экспланте, шт.	Коэффициент размножения	Общее состояние микрорастений по 5-балльной шкале, балл.	Число растений с интенсивной зелёной окраской листьев, %	Число растений со стеблем, %	Число растений с каллусом у основания микропобега более 4 мм, %	Число растений с корнями, %
Фуrolан 0,4 мг/л	5,5	3,3	3,8	60,0	40,2	2,1	0
Фуrolан 4 мг/л	6,1	4,1	4,2	70,0	62,1	4,2	0
Фуrolан 8 мг/л	2,0	3,0	3,4	56,3	60,5	0	0
Фуrolан 40 мг/л	1,0	3,0	2,5	0	20,0	0	0
6-БАП 1 мг/л + ИМК 0,1 мг/л + ГК 0,5 мг/л (st)	3,9	3,2	3,4	41,0	23,0	4,4	0
Без ростовых веществ (контроль)	2,9	1	3,0	35,0	19,0	4,0	0
НСР ₀₅	1,9	0,5	0,6	14	19,3	2	

Согласно данным таблицы 4, по всем показателям качества микропобегов выделились экспланты на среде с фуруланом в концентрации 4 мг/л (различие со стандартом по всем показателям существенно). При концентрации ростовых веществ 40 мг/л происходит угнетение микропобегов. Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [12].

Далее в ходе экспериментов были испытаны 8 вариантов среды Мурасиге-Скуга с добавлением ростовых веществ: препарат «Кавказ» (кротонолактон 35%), кротонолактон чистый, сукцинат калия, сукцинат натрия, янтарная кислота, препарат «Универсальный», 6-БАП 1,0 мг/л, ИМК 0,1 мг/л и ГК 0,5 мг/л (стандарт). На первом этапе опыта, при сравнении препаратов между собой и с контролем все компоненты добавляли в среду в концентрации 4 мг/л.

Микрорастения культивировали 1-й месяц в малом объеме среды (в пробирках), 2-й месяц – в большом (в 100 мл колбах) в фитотроне при 16 ч фотопериоде. Через пассаж отбирали стандартные микропобеги, способные к укоренению с 5 и более нормально развитыми листьями, длиной побегов не менее 20 мм, без признаков хлороза, витрификации, фасциации, заражения грибной или бактериальной инфекцией согласно ГОСТ 54051-2010 [39]. Выход стандартных микропобегов, способных к укоренению, указан на рисунке 5.

Установлено, что на среде с добавлением сукцината калия 4 мг/л максимальная доля эксплантов (63,9%) регенерирует микропобеги (это на 6,7% выше стандарта, различие существенно). На уровне стандарта (55,8%) выделился кротонолактон 100% (рисунок 5).

Токсического воздействия экспериментальных препаратов на экспланты подвоев яблони не выявлено.

Таким образом, из протестированных стимуляторов роста все препараты оказались безопасными для эксплантов подвоев яблони, максимальную эффективность в регенерации микропобегов проявил сукцинат калия в концентрации 4 мг/л. Полученные результаты отражены в статье Бесединой Е.Н. с соавторами [11].

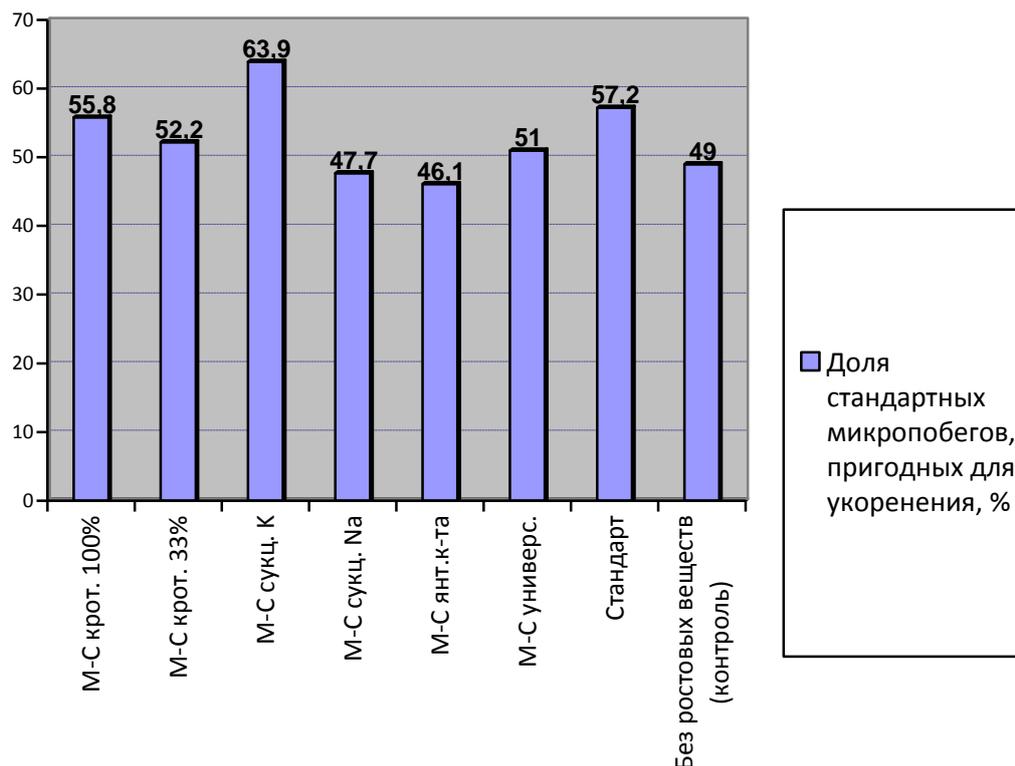


Рисунок 5 – Выход стандартных микропобегов, способных к укоренению, подвоев серии СК и ММ 106 после 1 пассажа, %, $HCp_{05} = 4,9$

Как известно из литературных данных, ростом, дифференциацией, органо-генезом растений управляют фитогормоны. Цитокинины стимулируют у листьев рост в фазе растяжения, а также клеточные деления. Они осуществляют общую стимуляцию обмена веществ, что проявляется в усилении биосинтеза нуклеиновых кислот и белков, и значительно замедляют старение клеток, способны вызывать вторичное зеленение пожелтевших листьев. В ряде случаев цитокинины стимулируют образование фенольных веществ и пигментов. Усиление биосинтетических процессов под влиянием цитокининов способствует притоку аминокислот, фосфатов и т.д. к местам, где они локализуются (растущие плоды, семена, клубни), проявляется так называемая аттрагирующая активность цитокининов. Кроме того, цитокинины вызывают заложение и рост стеблевых почек у недифференцированных каллусов [64, 77].

Гиббереллины усиливают рост стеблей за счет вытягивания, но не увеличения числа междоузлий, вызывают прорастание семян и образование партенокарпических плодов, индуцируют стрелкование розеточных форм растений, нарушают период покоя. Стимулируя рост стебля, гиббереллин одновременно способен подавлять рост боковых побегов и корней, уменьшать размеры листьев [64].

Ауксины активируют рост отрезков coleoptилей, стеблей, листьев, корней, вызывают тропические изгибы, стимулируют образование корней у черенков растений [64].

При культивировании микрорастений *in vitro* наиболее важным у цитокининов является свойство вызывать заложение и рост дополнительных розеток у недифференцированных каллусов, у ауксинов – способность стимулировать образование корней у микрочеренков растений, а у гиббереллинов - усиливать рост стеблей за счет вытягивания [64].

Сравнивая приведённые характеристики стандартных стимуляторов роста, пришли к выводу, что действие сукцината калия 4 мг/л и фуrolана 4 мг/л близко по своим результатам (регенерация микропобегов, развитие листьев) к комплексному влиянию 6-БАП 1 мг/л, гиббереллиновой кислоты 0,5 мг/л, ИМК 0,1 мг/л.

Целью следующего опыта было выявление оптимальной концентрации сукцината калия в среде. Было испытано 4 концентрации: 0,4 мг/л, 4 мг/л, 8 мг/л. Все вещества добавлялись в среду МС перед автоклавированием. В качестве стандартного варианта использована композиция ростовых веществ 1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л ИМК и 0,5 мг/л ГК, в качестве контроля – среда без ростовых веществ. Оценивали выход стандартных микропобегов, способных к дальнейшему укоренению. Результаты опыта приведены на рисунке 6.

Оптимальной концентрацией сукцината калия, как видно из рисунка 6, оказалась 4 мг/л. Выход стандартных микропобегов, способных к дальнейшему укоренению, на средах с сукцинатом калия в данной концентрации составляет 63,9 %, что на 6,5 % выше, чем в стандартном варианте (различие выхода микропобегов существенно). Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н. с соавторами [11].

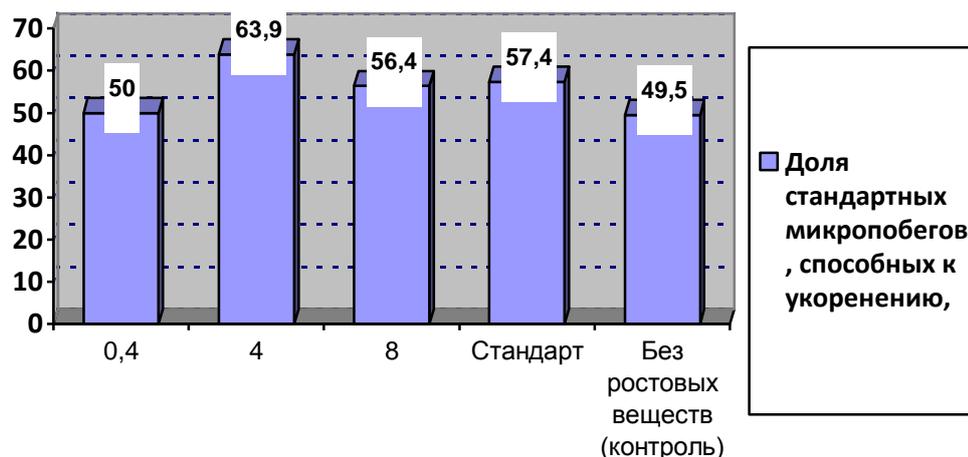


Рисунок 6 – Выход стандартных микрообегов, способных к укоренению подвоев серии СК и ММ 106 после 1 пассажа на средах с сукцинатом калия в различных концентрациях, мг/л, %, стандарт 6-БАП 1,0 мг/л, ИМК 0,1 мг/л и ГК 0,5 мг/л, $НСР_{05} = 6,3$

Далее сравнили между собой два выделившихся препарата фурулан и сукцинат калия в концентрации 4 мг/л. Аналогично предыдущему методу, в качестве стандартного варианта использована композиция ростовых веществ 1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л ИМК и 0,5 мг/л ГК, в качестве контроля – среда без ростовых веществ. Оценивали выход стандартных микрообегов, способных к дальнейшему укоренению (рисунок 7).

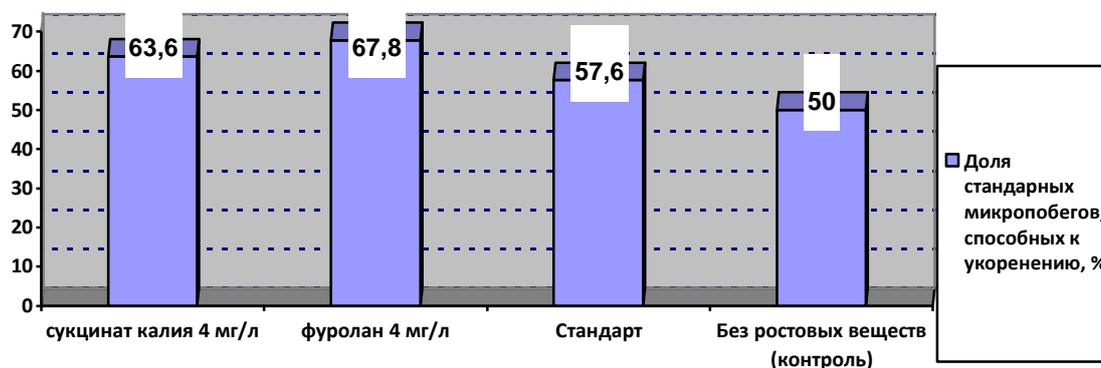


Рисунок 7 – Выход стандартных микрообегов, способных к укоренению подвоев серии СК и ММ 106 после 1 пассажа на средах с фуруланом и сукцинатом калия в концентрации 4 мг/л, %, стандарт 6-БАП 1,0 мг/л, ИМК 0,1 мг/л и ГК 0,5 мг/л, $НСР_{05} = 9,1$

Выявили, что при сравнении выхода стандартных микропобегов, пригодных для укоренения (с 5 и более нормально развитых листьев, длиной побегов не менее 20 мм, без признаков хлороза, витрификации, фасциации, заражения грибной или бактериальной инфекцией согласно ГОСТ 54051-2010) на средах с препаратами фуролан и сукцинат калия, существенно больший выход по сравнению со стандартом отмечен в варианте фуролан 4 мг/л (рисунок 7). На способ клонального микроразмножения подвоев яблони с использованием в качестве стимулятора роста препарата фуролан получен патент РФ [99].

Важным фактором эффективности клонального микроразмножения является генотипическая реакция различных подвоев на компоненты питательных сред, в частности, регуляторы роста. С целью изучения генотипической восприимчивости подвоев к выделившимся препаратам фуролан и сукцинат калия *in vitro*, проведена регенерация эксплантов подвоев СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106 на среде МС с различными композициями ростовых веществ. В качестве стандартного варианта использована композиция ростовых веществ 1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л ИМК и 0,5 мг/л ГК, в качестве контроля – среда без ростовых веществ. Оценивали выход стандартных микропобегов, способных к дальнейшему укоренению. В каждом варианте опыта высажено 100 эксплантов. Результаты исследований приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Уровень регенерации микропобегов (%) у эксплантов экспериментальных подвоев

Подвой / стимулятор роста	СК 2	СК 3	СК 4	СК 7	ММ 106	среднее
Сукцинат калия 4 мг/л	83,3	45,4	66,7	60,4	63,7	63,9
Фуролан 4 мг/л	88,4	50,2	70,5	63,3	66,8	67,8
6-БАП 1 мг/л + ИМК 0,1 мг/л + ГК 0,5 мг/л (st)	69,7	42,5	62,1	55,3	56,6	57,2
МС без ростовых веществ (контроль)	59,5	35,4	54,6	47,5	49,4	49,0
среднее	75,2	43,4	63,5	56,6	59,1	НСР ₀₅ = 6,9

При сравнении выхода стандартных микропобегов *in vitro* у различных подвоев на средах с изученными видами и композициями ростовых веществ выявили, что максимально регенерируют экспланты подвоя СК 2, далее по регенерационной способности в порядке убывания следуют СК 4, ММ 106, СК 7, СК 3. Существенно уровень регенерации различается между подвоями СК 3 и всеми другими подвоями, СК 7 и СК 4, СК 7 и СК 2, СК 4 и СК 2 (таблица 5). Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [12].

В условиях *in vivo*, в маточнике, продуктивность данных подвоев иная: максимальный выход отводков отмечен у подвоя СК 4 (до 15 стандартных вертикальных отводков с куста на пятый год, до 252 тыс.шт./га горизонтальных отводков), далее по продуктивности отводков в порядке убывания следуют СК 7 (до 13 стандартных вертикальных отводков с куста, до 240 тыс.шт./га горизонтальных отводков), СК 3 (выход стандартных горизонтальных отводков 222 тыс.шт./га), СК 2 (до 14 стандартных вертикальных отводков с куста, до 220 тыс.шт./га горизонтальных отводков), ММ 106 (5-6 стандартных вертикальных отводков с куста, выход горизонтальных отводков – 140-150 тыс.шт./га) [7]. Такое различие объясняется специфической реакцией генотипа на условия культивирования *in vitro*.

Применение на этапах введения в культуру *in vitro*, а также регенерации и мультипликации микропобегов новых в клональном микроразмножении стимуляторов роста, аналогичных по своему действию стандартной композиции 6-БАП, ГК, ИМК, но более экономичных, позволяет снизить себестоимость оригинального посадочного материала подвоев яблони, как конечного продукта технологии клонального микроразмножения. Кроме того, данные препараты, в частности фуrolан, при использовании его в среде МС в качестве стимулятора роста, повышает выход стандартных микропобегов, способных к дальнейшему укоренению на 10 % относительно стандарта (композиции 6-БАП, ГК, ИМК) и улучшает качество микропобегов (число листьев, интенсивность окраски и др.), что, в конечном счёте, повышает эффективность всей технологии.

Одновременно с изучением новых ростовых веществ в процессе совершенствования методики клонального микроразмножения подвоев яблони (СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106) изучено 7 вариантов питательных сред Мурасиге-Скуга с различным содержанием традиционных стимуляторов роста: 6-БАП, ИМК, α -НУК. Задача – подбор наиболее эффективных композиций фитогормонов. Контроль - среда, приготовленная по В.А. Высоцкому и др. [1, 5, 18, 20]. Культивировалось свыше сотни эксплантов. Произведено 4 пассажа. Пролиферация эксплантов началась на 2-м пассаже.

Максимальный коэффициент размножения микропобегов (4 ед.) получен на средах № 3, 4, 5. В контроле - 1,9 (таблица 6).

Таблица 6 - Составы питательных сред и результат клонального микроразмножения подвоев яблони

№	Компоненты среды	St	1	2	3	4	5	6
1	Макросоли МС мг/л	50	50	50	50	50	50	50
2	Микросоли МС мг/л	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3	Хелат железа мг/л	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
4	Мезоинозит мг/л	100	100	100	100	100	100	100
5	В ₁ мг/л	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
6	В ₆ мг/л	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
7	Рр мг/л	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
8	С мг/л	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
9	6-БАП мг/л	1,0	0,5	1,0	2,0	2,0	1,5	0,5
10	ИМК мг/л	0,2	0,1	0,0	0,2	0,0	0,05	0,1
11	α -НУК мг/л	0,0	0,0	0,2	0,0	0,2	0,05	0,1
12	Сахароза г/л	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
13	Агар-агар г/л	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Коэффициент размножения		1,4	2,1	3,1	4,5	4,7	4,6	2,9
НСР ₀₅		1,2						

Лучшие показатели размножения микропобегов получены на средах с повышенным содержанием 6-БАП (варианты 3, 4, 5) и соотношением 6-БАП к ИМК, в котором содержание 6-БАП значительно превышает содержание ИМК (вариант 5). Полученные результаты в целом соответствуют современным представлениям о ростовой активности использованных препаратов [33, 41, 121, 195] и приведены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [12].

Важным элементом этапа регенерации и мультипликации является получение крупных жизнеспособных микропобегов, способных к дальнейшему укоренению. Чтобы добиться энергичной регенерации микропобегов в экспериментальные питательные среды добавлены гибберелловая кислота, увеличено содержание 6-БАП и исключена аминокислота глицин. Изучено 4 варианта питательных сред Мурасиге-Скуга с 50 % солевым составом, различным содержанием 6-БАП и ГК (таблица 7). Оцека качества микропобегов проводилась через 30 дней культивирования на данных средах. В каждом варианте опыта участвовало 50 микропобегов. Результаты регенерации микропобегов экспериментальных подвоев яблони на питательной среде МС в различных модификациях представлены в таблице 8.

Анализ таблицы 8 показывает, что на питательной среде МС-3 развиваются микропобеги высотой, в среднем, 37 мм, что больше, чем на среде М-С 2 (средняя величина микропобегов 28 мм) и М-С 1 (26 мм). Большая величина регенерированных микропобегов позволяет им накопить большее количество ассимилятов и проявить высокую жизнеспособность в дальнейшем. Основное отличие среды М-С 3 от других изученных питательных сред в высоком содержании ГК. Кроме того, выделившаяся среда (М-С 3) отличается незначительным увеличением содержания цитокининов (6-БАП 0,7 мг/л). Анализ различий между подвоями показал, что на всех изученных питательных средах микропобеги подвоя СК 4 развиваются более крупными (31-42 мм), чем других типов подвоев (21-40 мм).

Таблица 7 – Варианты питательной среды Мурасиге и Скуга для интродукции *in vitro* эксплантов подвоев яблони

состав	модификации среды МС, мг/л		
	М-С 4 (st)	М-С 5	М-С 6
макроэлементы	50%	50%	50%
микроэлементы	50%	50%	50%
Fe-хелат	50%	50%	50%
витамины	С-1; В ₁ -1; В ₆ 0,5; РР-0,5; мезоинозит	С-1; В ₁ -1; В ₆ 0,5; РР-0,5; мезоинозит	С-1; В ₁ -1; В ₆ 0,5; РР-0,5; мезоинозит
ГК	-	0,5	1,5
6-БАП	0,5	0,6	0,7
сахароза	20000	20000	20000
агар-агар	8000	8000	8000

Таблица 8. Величина микропобегов подвоев яблони, полученных в результате регенерации меристем *in vitro* на питательной среде МС в различных модификациях

Подвой	Величина микропобегов на питательной среде различного состава, в среднем, мм		
	М-С 4 st	М-С 5	М-С 6
СК 2	30	33	40
СК 3	21	21	33
СК 4	31	36	42
СК 7	21	22	35
ММ 106	25	27	37
в среднем	26	28	37

Таким образом, на питательной среде, отличающейся от других изученных питательных сред высоким содержанием гибберелловой кислоты (1,5 мг/л) и содержащей 6-БАП 0,7 мг/л, развиваются микропобеги высотой, в среднем, 37 мм, что больше, чем на среде, содержащей ГК 0,5 мг/л (средняя величина микропобегов 28 мм) и на среде, не содержащей ГК (26 мм). Результаты данных исследований отражены в статье Бунцевича Л.Л. с соавторами [19].

Важным этапом технологии клонального микроразмножения является этап ризогенеза микропобегов. На данном этапе нами была изучена способность к укоренению *in vitro* подвоев яблони при различных концентрациях индолилмасляной кислоты. Было изучено 4 концентрации ИМК: 1,0 мг/л (стандарт), 1,5 мг/л, 2,0 мг/л, 2,5 мг/л. В каждом варианте опыта 100 микропобегов. Среду готовили по прописи Мурасиге-Скуга. Оценивали процентную долю укоренившихся микропобегов. Результаты опыта приведены в таблице 9.

Таблица 9 – Доля укоренившихся микропобегов *in vitro* (%) подвоев яблони при различных концентрациях ИМК

Подвой / концентрация, мг/л	СК 2	СК 3	СК 7	ММ 106
1,0	60,0	58,0	64,0	69,0
1,5	64,0	61,0	68,0	78,0
2,0	68,0	65,0	75,0	90,0
2,5	50,0	48,0	52,0	54,0

Установлено, что максимально интенсивно экспланты образуют корни при концентрации ИМК в среде 2,0 мг/л. Степень укоренения при этом достигает 65-90 % в зависимости от подвоя. С помощью статистической обработки выявили, что для вариантов концентрации ИМК 1,0-2,0 мг/л коэффициент корреляции по всем типам подвоев равен 1, что означает, что с повышением концентрации ИМК от 1,0 мг/л до 2,0 мг/л способность к укоренению микрорастений подвоев возрастает. Дальнейшее повышение концентрации до 2,5 мг/л ведёт к снижению способности к укоренению. Таким образом, оптимальной концентрацией ИМК в среде для укоренения подвоев СК 2, СК 3, СК 7, ММ 106 является 2,0 мг/л (таблица 9). Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [12].

На рисунке 8 даны фотографии укоренившихся микрорастений подвоя СК 2



Рисунок 8 – Укоренённые микрорастения подвоя СК 2

Можно заключить, что при испытании ранее не применявшихся в клональном микроразмножении малотоксичных, экологически чистых, экономичных стимуляторов роста (производных органических кислот и фуранона) по основным показателям качества эксплантов выделились препарат фуролан и сукцинат калия. Оптимальной концентрацией для обоих препаратов оказалась 4 мг/л. При сравнении этих препаратов между собой максимальную эффективность проявил фуролан.

Сравнивая приведённые характеристики стандартных стимуляторов роста, пришли к выводу, что действие сукцината калия и фуrolана близко по своим результатам (регенерация микропобегов, развитие листьев) к комплексному влиянию 6-БАП 1 мг/л, ИМК 0,1 мг/л и гиббереллиновой кислоты 0,5 мг/л.

Максимальной регенерационной способностью на средах с препаратами фуrolан и сукцинат калия обладают экспланты подвоя СК 2, далее по регенерационной способности в порядке убывания следуют СК 4, ММ 106, СК 7, СК 3.

В связи с этим возможно использование препаратов фуrolан и сукцинат калия как менее опасных, более экономичных аналогов традиционно используемым ростовым веществам (комплекс 6-БАП, ИМК, ГК) с эффективностью на том же уровне и выше, что значительно снизит себестоимость оздоровленного посадочного материала и повысит безопасность технологии клонального микроразмножения подвоев яблони.

При испытании питательных сред Мурасиге-Скуга с различным содержанием традиционных стимуляторов роста лучшие показатели коэффициента размножения микропобегов получены на средах с повышенным содержанием 6-БАП и соотношением 6-БАП и ИМК, в котором содержание 6-БАП значительно превышает содержание ИМК. На питательной среде, отличающейся от других изученных питательных сред высоким содержанием гибберелловой кислоты (1,5 мг/л) и содержащей 6-БАП 0,7 мг/л, развиваются микропобеги высотой, в среднем, 37 мм, что больше, чем на среде, содержащей ГК 0,5 мг/л (средняя величина микропобегов 28 мм) и на среде, не содержащей ГК (26 мм). Применение таких питательных сред позволяет повысить коэффициент размножения и качество микропобегов, а, соответственно, в конечном счёте, и выход оригинального посадочного материала подвоев яблони.

При анализе укоренения эксплантов выявили, что максимальная укореняемость отмечена у подвоев ММ 106. На всех типах подвоев (СК 2, СК 3, СК 7, ММ 106) прослеживается тенденция: при концентрации ИМК 2,0 мг/л максимально интенсивно происходит укоренение у всех типов подвоев. Повышение доли

укоренившихся микропобегов позволяет повисить эффективность всей технологии клонального микроразмножения подвоев яблони.

3.2 Структурообразующие компоненты и минеральный состав питательных сред для размножения и оздоровления подвоев яблони *in vitro*

В настоящее время в условиях рыночной экономики актуально снижение себестоимости технологии клонального микроразмножения и оздоровления растений и одновременно повышение выхода микрорастений. В связи с тем, что традиционно используемый в данной технологии агар-агар является дорогостоящим препаратом: 9625,4 руб./кг по данным сайта Catrosa в августе 2015 г. [4], было проведено исследование по созданию питательных сред на основе альтернативных структурообразователей.

В мировой практике известны случаи замены агар-агара другими желирующими компонентами. Например, по данным Упадышева М.Т., использование гомополисахарида в качестве заменителя агар-агара обеспечивало повышение коэффициента размножения в 1,2-2,3 раза и выхода пригодных для укоренения побегов - в 1,9-6,5 раза [94].

Бразильские ученые при клональном микроразмножении стрелиции (*Strelitzia reginae*) испытывали эффективность таких желирующих материалов, как агароза, агар, фитогель (Phytigel). Лучшие результаты достигались при использовании фитогеля [152].

Одной из целей нашего исследования явилась замена в среде, приготавливаемой по прописи Мурасиге-Скуга, агар-агара на картофельный крахмал.

В опыте 3 варианта:

- 1) Среда МС, в которой в качестве желирующего компонента использован агар-агар бактериологический 8 г/л среды;
- 2) Среда с минеральной основой по Мурасиге-Скугу, вместо агар-агара введён пищевой картофельный крахмал 40 г/л среды;

3) Среда с минеральной основой по Мурасиге-Скугу в качестве желирующих компонентов использованы одновременно агар-агар бактериологический 4 г/л среды и пищевой картофельный крахмал 20 г/л среды.

Состояние микропобегов оценивали по показателям количества здоровых развитых листьев на микрорастении и интенсивности окраски листьев и стеблей через 30-40 дней культивирования на испытуемых средах.

Результаты эксперимента приведены в таблице 10.

Таблица 10 — Результаты изучения картофельного крахмала как структурообразователя питательных сред

Исследуемые показатели	Пассажи	М-С + агар-агар (стандарт)			М-С + крахмал			М-С + агар + крахмал			НСР ₀₅
		СК 2	СК 3	СК 4	СК 2	СК 3	СК 4	СК 2	СК 3	СК 4	
Количество листьев, шт	1	5	4	5	8	9	11	9	4	6	
	2	9	7	6	7	5	12	5	7	5	
	3	6	10	6	4	10	7	6	8	4	
	в среднем	7	7	6	6	8	10	7	6	5	1,1
Интенсивность окраски, баллы	1	4	4	4	5	5	5	4	4	4	
	2	5	4	4	5	5	5	4	4	4	
	3	4	4	4	5	4	5	4	4	5	
	в среднем	4	4	4	5	5	5	4	4	4	0,4

Согласно результатам эксперимента (таблица 10), на питательных средах с крахмалом микрорастения семечковых культур развивают большее количество листьев (6-10 шт.) и более интенсивно накапливают хлорофилл (плотность зеленого цвета поверхности листа 5 баллов), чем в стандартном варианте на агаризованной питательной среде (6-7 шт. листьев и 4 балла плотность цвета, различие существенно).

Однако, при застывании поверхность сред на основе крахмала неровная, бугристая, что делает такую среду нетехнологичной, соответственно, использова-

ние крахмала в качестве желирующего компонента питательных сред в клональном микроразмножении подвоев яблони затруднено. Учитывая положительное влияние замены агар-агара на крахмал в питательной среде на рост и развитие микропобегов, данный вопрос требует дальнейшей проработки. Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [12].

Известно, что при определённых характеристиках (содержание ионов Ca^{2+} , соответствующее 0,9-1,2 % для студней с пониженным содержанием сахара 45 %), пектин способен образовывать прочные студни, прочность которых свыше 93,31 кПа [56]. В связи с поиском заменителей агар-агара, был проведён опыт по созданию питательных сред на основе высокоэтерифицированного (степень этерификации 58-62%) яблочно-цитрусового пектина медленной скорости желирования (время желирования примерно 30 минут) WECJ-5 с прочностью геля $150 \pm 5^\circ \text{SAG}$, $\text{pH}=3 \pm 0,3$, содержанием сахарозы 20 %.

Среды готовились по прописи Мурасиге-Скуга, автоклавирование проводилось при давлении 1 атм в течение 20 минут, за исключением варианта 3. В опыте 4 варианта:

- 1 – 8 г пектина на 1 л среды,
- 2 – 8 г пектина+ 8 г агар-агара на 1 л среды,
- 3 - 8 г пектина+ 8 г агар-агара на 1 л среды без автоклавирования,
- 4 – 8 г агар-агара на 1 л среды (контроль).

Оценивали технологические качества среды и учитывали долю эксплантов, регенерировавших микропобеги к 1 пассажу. Результаты опыта приведены в таблице 11.

Таблица 11 - Результаты изучения яблочно-цитрусового пектина как структурообразователя питательных сред

№	Вариант среды	Доля эксплантов, регенерировавших микропобеги, %
1	МС + 8 г пектина на 1 л среды	Нетехнологичная среда
2	МС + 8 г пектина+ 8 г агар-агара на 1 л среды	Нетехнологичная среда
3	МС + 8 г пектина+ 8 г агар-агара на 1 л среды без автоклавирования	0
4	МС + 8 г агар-агара на 1 л среды (контроль)	60

Среды № 1 и 2 оказались жидкими, то есть нетехнологичными в работе с апикальными меристемами.

Среда № 3 по консистенции соответствовала контролю, рН среды составил 4, то есть чрезвычайно кислый для большинства плодовых растений, в том числе клоновых подвоев яблони. Экспланты, культивируемые на этой среде, испытывали угнетение и погибали в течение 1-2 месяцев (таблица 11).

Среда № 4 (контроль) была оптимальной по технологическим качествам (прочный студень) и благоприятной для развития микропобегов подвоев яблони (доля эксплантов, регенерировавших микропобеги, составила 60%, таблица 11). Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [12].

Ещё одним направлением оптимизации клонального микроразмножения является подбор наиболее эффективных составов макро- и микроэлементов.

Как известно из литературы, для многих видов растений, в том числе и для подвоев яблони, широко используемой является среда Мурасиге-Скуга (Murashige T., Skoog F., 1962), которая изначально была разработана для тканей табака. Эта среда отличается большим содержанием неорганического азота, который стимулирует процессы органогенеза и соматического эмбриогенеза [40, 81, 173, 204, 214].

Кроме Мурасиге-Скуга для размножения растений *in vitro* применяются другие питательные среды. Например, Н.И. Туровская (1989) на этапе введения в культуру *in vitro* испытала на подвоях яблони 54-118 и 62-396 среды Гамборга [163], Нича-Нича [195], Уайта [212] одновременно со средой Мурасиге-Скуга. В результате через два месяца культивирования эксплантов, достигших фазы розетки, было в 4,5-5 раз больше на среде Гамборга, чем Мурасиге-Скуга. На среде Уайта экспланты полностью погибли спустя 3 месяца, а на среде Нича-Нича в этот же период - отставали в развитии [123]. Этим же учёным (1994) на этапе собственно микроразмножения была изучена среда Ллойда-Маккауна (Lloyd G.W., Mc Cown V.H., 1980) и сравнена с Мурасиге-Скуга и Гамборга. Наилучшим вариантом для груши сорта Осенняя Яковлева стала среда Ллойда-Маккауна (коэффици-

ент размножения составил 23,3). А для подвоев яблони 62-396 и 54-118 оптимальной оказалась среда Гамборга: все побеги подвоя 62-396 и 83% подвоя 54-118 через 6 недель культивирования достигли оптимальных для клонирования размеров. На среде Мурасиге-Скуга только 67% побегов достигли таких же размеров [122].

В некоторых случаях воздействие на микрорастения среды Мурасиге-Скуга и её аналогов оказывается идентичным. Например, Ломовская Л.В. отмечает, что микроразмножение груши одинаково протекает как на среде Мурасиге-Скуга, так Ли Фоссарда [76]. Р.Н. Zimmerman предложил на начальном этапе культивировать меристематические верхушки яблони на модифицированной среде Боксуса (Boxus), свободной от гормонов, а затем перенести их на стандартную среду [214].

В нашем эксперименте на этапе мультипликации микропобегов подвоев яблони были испытаны часто применяемые среды Мурасиге-Скуга и Боксуса. В каждом варианте опыта учитывали по 100 микропобегов. Через 30 дней культивирования микропобегов на испытываемых средах, была проведена оценка их состояния по показателям: общее состояние растений (по 5-балльной шкале), количество листьев на микропобег. Сравнительные результаты показателей развития микропобегов на средах Боксуса и Мурасиге-Скуга приведены в таблице 12.

Таблица 12 — Средние показатели развития микропобегов и количества листьев на них за один пассаж *in vitro*

Сорт	Общее состояние микропобегов, баллы (в среднем)		Среднее количество листьев через 30 дней культивации, шт.	
	Среда МС (стандарт)	Среда Боксуса	Среда МС (стандарт)	Среда Боксуса
СК 2	5	4	7	5
СК 3	4	3	4	2
СК 4	5	3	6	4
СК 7	4	3	5	3
ММ 106	5	3	5	3
среднее	4,6	3,2	5,4	3,4
НСР ₀₅	0,7		1,1	

Как видно из таблицы 12, общее состояние микропобегов всех подвоев на среде МС существенно выше (4,6 балла), чем на среде Боксуса (3,2 балла). Среднее количество развитых листьев на микропобег также существенно выше на среде МС (5,4 шт.) по сравнению с микропобегами на среде Боксуса (3,4 шт.) у всех изучаемых подвоев.

Таким образом, для клонального микроразмножения подвоев яблони серии СК и ММ 106 целесообразно применять среду Мурасиге-Скуга. Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [12].

Анализ полученных данных позволил сделать вывод о том, что оптимальной средой для культивирования подвоев яблони серии СК является среда с минеральным составом по прописи Мурасиге-Скуга с заменой агар-агара на картофельный крахмал.

3.3 Эффективность антибиотиков различных групп и поколений для оздоровления мериклонов подвоев яблони от инфекций различной этиологии

Питательные среды и мериклоны являются благоприятным субстратом для развития грибной и бактериальной микрофлоры [33, 66, 78, 121]. В настоящее время в плодовых маточниках Краснодарского края, из которых берётся исходный материал для клонального микроразмножения, циркулируют такие опасные заболевания, как бактериальный ожог (*Ergwinia amilovora*, подкарантинный объект), бактериальный некроз (или стеблевой рак, *Pseudomonas syringae*), корневой рак (*Agrobacterium tumefaciens*) и др.[105]. Клональное микроразмножение с помощью меристем освобождает растения от большинства инфекций, как вирусной, так и фитоплазменной, бактериальной, грибной этиологии. При этом в процессе микроразмножения проводится санация инфекции, как занесённой в культуру *in vitro* с самими эксплантами, так и попавшей из внешней среды во время пассажей. Для повышения эффективности санации, помимо мероприятий по поддержанию стерильности, используют антибиотики [33, 71].

На этапе работы с антибиотиками из контаминированных объектов (мериклоны вегетативно-размножаемых подвоев серии СК, питательные среды с мериклонами) при содействии сотрудников кафедры микробиологии и защиты растений КубГАУ Горьковенко В.С. и Коростелёвой Л.А. выделены чистые культуры микроорганизмов, определена их родовая и видовая принадлежность (рисунок 9).



Рисунок 9 - Колонии эпифитных дрожжей и грибов, выделенные в контаминированных питательных средах и мериклонах

Установлено, что засоряют сосуды с питательными средами и контаминировуют мериклоны колонии эпифитных дрожжей и грибов *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus album*, *Cryptococcus laurentii* (дрожжи), *Penicillium cyclosum* (грибы, рис. 9), а также ряд не идентифицированных объектов, занесённых туда из окружающей среды с нестерильными эксплантами или др. путём. Результаты данных исследований отражены в публикациях [17, 20].

Изучали влияние комплексных антибиотиков на средовую инфекцию, посадочную инфекцию, на рост растений, а также на эффективность лечения эксплан-

тов, заражённых во время пассажей бактериальными или грибными болезнями. В процессе культивирования пробирочных растений осуществляли контроль за наличием бактериального и грибного заражения, за развитием растений.

Проведён анализ эффективности группы антибиотиков: цефотаксим, тетрациклин, нистатин. В первую очередь изучено влияние антибиотиков на средовую инфекцию. Эксплантаты отбирали в фазу активного роста. Верхушечные и боковые почки поверхностно стерилизовали водным мыльным раствором в течение 10 минут при тщательном помешивании и промывали час проточной водой. Почки стерилизовали 0,1 % раствором сулемы в течение 3 мин., при активном перемешивании стерилизующего раствора. Затем проводили двухкратную промывку дистиллированной водой в течение 6 мин.

Питательную среду готовили по прописи Мурасиге-Скуга с 0,5 мг/л 6-БАП. Антибиотики растворяли в стерильной воде и добавляли в сосуды с питательной средой непосредственно перед автоклавированием. Концентрация препаратов 0,5; 10; 100; 200 мг/л. В качестве контроля использовали среду без антибиотиков. Ревизия состояния эксплантов проходила через 30-35 дней от посадки. Результаты изучения эффективности антибиотиков приведены в таблицах 13, 14, 15 и на рисунке 10.

Таблица 13 – Результативность введения в культуру *in vitro* клонового подвоя СК 2 на среды с различными антибиотиками

Среда	Посажено эксплан- тов, шт.	Инфицировано эксплантов		Экспланты инфекции без	
		шт.	%	шт.	%
Контроль (без антибиотика)	100	70,0	70,0	30,0	30,0
Цефотаксим 0,5 мг/л	100	40,0	40,0	60,0	60,0
Цефотаксим 10 мг/л	100	33,0	33,0	67,0	67,0
Цефотаксим 100 мг/л	100	56,0	56,0	44,0	44,0
Цефотаксим 200 мг/л	100	33,0	33,0	67,0	67,0
Тетрациклин 0,5 мг/л	100	33,0	33,0	67,0	67,0
Тетрациклин 10 мг/л	100	33,0	33,0	67,0	67,0
Тетрациклин 100 мг/л	100	60,0	60,0	40,0	40,0
Тетрациклин 200 мг/л	100	33,0	33,0	67,0	67,0
Нистатин 0,5 мг/л	100	33,0	33,0	67,0	67,0
Нистатин 10 мг/л	100	44,0	44,0	56,0	56,0
Нистатин 100 мг/л	100	88,0	88,0	12,0	12,0
Нистатин 200 мг/л	100	25,0	25,0	75,0	75,0
НСР ₀₅		12,0	12,0	12,0	12,0

Как видно из таблицы 13, максимальная доля прижившихся, нормально развитых (75%) микрорастений отмечена при использовании нистатина в концентрации 200 мг/л. Добавление в среду любого антибиотика из протестированных, кроме тетрациклина 100 мг/л и нистатина 100 мг/л, существенно повышает жизнеспособность эксплантов ($НСП_{05}=12$).

Таблица 14 – Результативность введения в культуру *in vitro* подвоя СК 3 на среды с различными антибиотиками

Среда	Посажено эксплан- тов, шт.	Инфицировано эксплантов, %		Экспланты без инфекции, %	
		шт.	%	шт.	%
Контроль (без антибиотика)	100	80	80	20,0	20,0
Цефотаксим 0,5 мг/л	100	60,0	60,0	40,0	40,0
Цефотаксим 10 мг/л	100	80,0	80,0	20,0	20,0
Цефотаксим 100 мг/л	100	60,0	60,0	40,0,	40,0,
Цефотаксим 200 мг/л	100	40,0	40,0	60,0	60,0
Тетрациклин 100 мг/л	100	40,0	40,0	60,0	60,0
Тетрациклин 200 мг/л	100	50,0	50,0	50,0	50,0
Нистатин 0,5 мг/л	100	60,0	60,0	40,0	40,0
Нистатин 10 мг/л	100	60,0	60,0	40,0	40,0
Нистатин 100 мг/л	100	100,0	100,0	0,0	0,0
Нистатин 200 мг/л	100	75,0	75,0	25,0	25,0
$НСП_{05}$		13,0	13,0	13,0	13,0

Согласно таблице 14, для подвоя СК 3 наиболее эффективным оказались цефотаксим в концентрации 200 мг/л (60% здоровых эксплантов) и тетрациклин 100 мг/л (60% здоровых эксплантов). Существенно по сравнению с контролем повышают жизнеспособность эксплантов также препараты цефотаксим в концентрации 0,5 мг/л, 100 мг/л, 200 мг/л, тетрациклин 100 мг/л, 200 мг/л, нистатин 0,5 мг/л, 10 мг/л ($НСП_{05}=13$).

Таблица 15 – Результативность введения в культуру *in vitro* подвоя ММ 106 на среды с различными антибиотиками

Среда	Посажено экплантов, шт.	Инфицировано и некротировало эксплантов		Экспланты без инфекции	
		шт.	%	шт.	%
Контроль (без антибиотика)	100	65,0	65,0	35,0	35,0
Цефотаксим 0,5 мг/л	100	80,0	80,0	20,0	20,0
Цефотаксим 10 мг/л	100	75,0	75,0	25,0	25,0
Цефотаксим 100 мг/л	100	75,0	75,0	25,0	25,0
Цефотаксим 200 мг/л	100	100,0	100,0	0,0	0,0
Тетрациклин 100 мг/л	100	100,0	100,0	0,0	0,0
Тетрациклин 200 мг/л	100	100,0	100,0	0,0	0,0
Нистатин 0,5 мг/л	100	100,0	100,0	0,0	0,0
Нистатин 10 мг/л	100	70,0	70,0	25,0	25,0
Нистатин 100 мг/л	100	60,0	60,0	40,0	40,0
Нистатин 200 мг/л	100	40,0	40,0	60,0	60,0
НСР ₀₅		14,0	14,0	14,0	14,0

Для подвоя ММ 106 (таблица 15) эффективным оказался антибиотик нистатин 200 мг/л (60% здоровых экплантов). Он единственный из протестированных препаратов существенно повышает жизнеспособность экплантов (относительно контроля, НСР₀₅=14).

Провели анализ сортовой реакции подвоев на введение антибиотиков в питательные среды (рисунок 10).

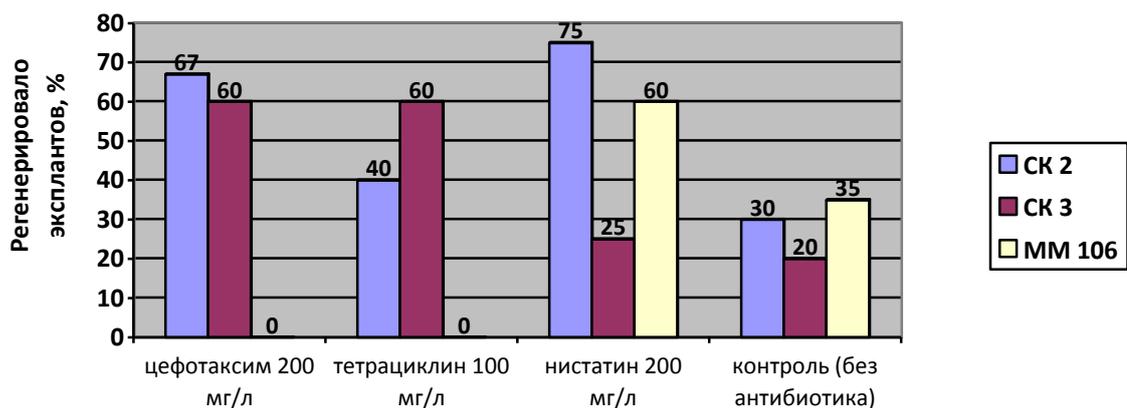


Рисунок 10 - Эффективность антибиотиков при введении в культуру *in vitro* клоновых подвоев СК и ММ 106

Анализируя результаты (рисунок 10) можно отметить, что морфогенетическая реакция эксплантов на антибиотики сортоспецифичная. Установлено, что значительное количество введенных эксплантов ММ 106 некротирует (25-100%). Количество нормально развитых апексов, дающих начало конгломерату микро-растений, для разных подвоев колеблется от 0 до 75 (рисунок 11). Питательные среды с содержанием антибиотика нистатин в концентрации 200 мг/л оказались благоприятны для подвоев СК 2 (75% здоровых эксплантов) и ММ 106 (60% здоровых эксплантов), для подвоев СК 3 максимальный выход нормально развитых микропобегов наблюдается на средах с антибиотиками тетрациклин 100 мг/л и цефотаксим 200 мг/л (60% здоровых эксплантов в обоих вариантах). Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [13].

Важным аспектом применения антибиотиков является определение порядка ввода их в среду: до или после автоклавирования. Использовали среду Мурасиге-Скуга с 0,5 мг/л 6-БАП. Антибиотики растворяли в стерильной воде и добавляли в питательные среды непосредственно до и после автоклавирования.

В таблице 16 приведены результаты воздействия на среду и экспланты антибиотиков при добавлении их в среду непосредственно перед автоклавированием и после автоклавирования в охлажденную до 45 °С среду. В качестве контроля использовали среду без антибиотиков. Инфекцию в среде регистрировали в течение месяца.

Таблица 16 – Результаты инфицированности эксплантов при использовании антибиотиков до и после автоклавирования

Среда	Доля инфицированных эксплантов при добавлении антибиотика до автоклавирования, %	Доля инфицированных эксплантов при добавлении антибиотика после автоклавирования, %
Контроль (без антибиотика)	75,0	98,0
Цефотаксим 200 мг/л	17,0	89,0
Тетрациклин 100 мг/л	26,0	65,0
Нистатин 200 мг/л	44,0	91,0
НСР ₀₅		26,0

Было отмечено, что на контрольной среде и на средах с антибиотиком нистатином наблюдалась инфекция в толще среды. На средах с антибиотиками цефотаксим и тетрациклин наблюдалась поверхностная инфекция. Данные таблицы 16 показывают очень высокий процент инфицированности среды при добавлении антибиотиков после автоклавирования. Значительно меньшая инфицированность проявляется при добавлении антибиотиков перед автоклавированием. Различие между вариантами «до» и «после» автоклавирования существенно по каждому виду антибиотиков. Проанализировав полученные данные при добавлении антибиотиков, можно сделать вывод о том, что метод «после автоклавирования» является нерациональным в использовании.

Сравнительная характеристика использования антибиотиков до и после автоклавирования приведена на рисунке 11.

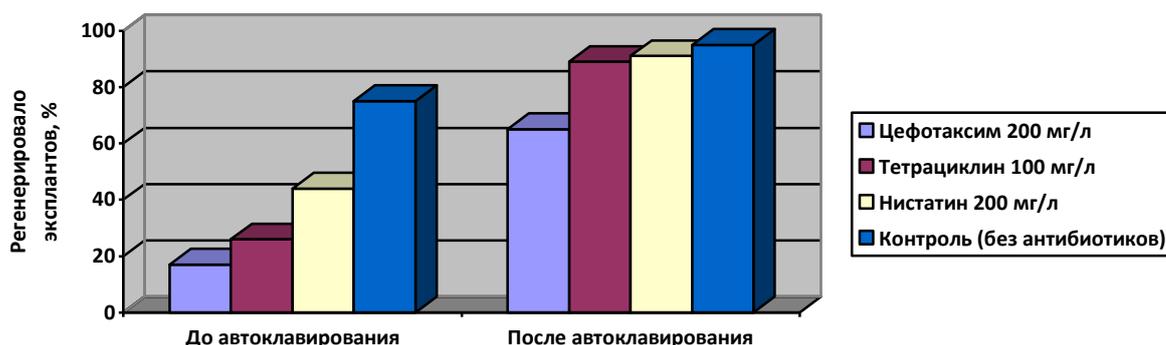


Рисунок 11 - Использование антибиотиков до и после автоклавирования

Как видно из рисунка 11, значительно меньшая инфицированность эксплантов наблюдается при добавлении в среду антибиотиков до автоклавирования. Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [13].

Для определения влияния антибиотиков на рост микробопоголов экспланты СК 2 культивировали на средах с антибиотиками в течение 1-го месяца. Для культивирования использовали среду Мурасиге-Скуга с 0,5 мг/л 6-БАП. Применяли антибиотики: цефотаксим, тетрациклин и нистатин. Антибиотики растворяли в

стерильной воде и добавляли в питательную среду непосредственно перед автоклавированием. Концентрация антибиотиков среде 0,5, 10, 100 и 200 мг/л. В качестве контроля использовали среду без антибиотиков (таблица 17).

Таблица 17 – Коэффициент размножения микробега СК 2 на средах с антибиотиками в различных концентрациях

Антибиотик	Концентрация антибиотиков, мг/л					
	0,5	10	20	50	100	200
Цефотаксим	2,4	2,9	1,0	1,0	1,8	2,0
Тетрациклин	1,0	1,0	3,0	3,2	1,8	2,7
Нистатин	3,6	1,5	2,1	2,4	2,7	4,3
Контроль	2,2	2,1	2,2	2,3	2,0	2,2
<i>HCP₀₅</i>	1,3	1,0	1,0	1,1	0,7	1,3

Микробеги подвоя СК 2 по-разному вели себя на опытных средах. На контрольной среде побеги развивались хорошо. Коэффициент размножения 2,2 (таблица 17).

На питательных средах с цефотаксимом во всех испытываемых концентрациях можно отметить, что микробеги развивались положительно, однако, в концентрациях 20 мг/л и 50 мг/л мультипликации микробега не происходит (рисунок 12).



Рисунок 12 – Микробеги подвоя СК 2 на средах слева направо: с антибиотиком тетрациклин 200 мг/л, цефотаксимом 50 мг/л, нистатином 200 мг/л

Максимальный коэффициент размножения наблюдался в концентрации 10 мг/л и составляет 2,9 (таблица 17).

На наличие тетрациклина в концентрации 50 мг/л побеги реагировали положительно, коэффициент на данной среде наивысший и составляет 3,2 (таблица 16). На среде с тетрациклином в концентрации 20 мг/л наблюдалась витрификация побегов. На средах с тетрациклином 100 и 200 мг/л микропобеги развивались слабые и умеренно-зеленого цвета (рисунок 12).

Максимальная стимуляция процессов роста побегов отмечена при концентрации 200 мг/л антибиотика нистатина, что доказывает коэффициент размножения, равный 4,3 (различие с контролем существенно). Нистатин в данной концентрации заметно ускорял развитие микропобегов (рисунок 12). Побеги на наличие в питательной среде нистатина в концентрациях 0,5 и 100 мг/л реагировали положительно, коэффициент размножения составил 3,6; 2,7 соответственно (различие с контролем существенно, таблица 17). Антибиотик нистатин в концентрации 10 мг/л стимулировал развитие каллуса, микропобеги развивались умеренно-зелёного цвета.

Таким образом, проанализировав полученные данные серии проведённых опытов с антибиотиками цефотаксим, тетрациклин, нистатин выявили, что по влиянию антибиотиков на средовую и посадочную инфекцию и на рост и развитие растений, наилучшее влияние на микропобеги оказывает нистатин 200 мг/л: коэффициент размножения на среде с данным антибиотиком равен 4,3, в этой же концентрации нистатин обладает saniрующим эффектом 60-75 % для подвоев СК 2 и ММ 106. Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [13].

При оценке результатов серии опытов можно сделать следующие выводы: добавлять антибиотики в питательную среду следует непосредственно перед автоклавированием; для подавления средовой и посадочной инфекции эксплантов подвоев яблони добавлять в питательную среду нистатин в концентрации 200 мг/л. В результате опыта было установлено, что нистатин в данной концентрации положительно влияет на рост экспериментальных растений.

В связи с постоянным обновлением штаммового состава микроорганизмов, обновлением препаратов были испытаны антибиотики нового поколения: аугментин, ксенаквин, макропен, цефепим, а также гризеофульвин, в качестве стандарта использовали нистатин. Антибиотики вводились в среду Мурасиге-Скуга перед автоклавированием в рекомендуемых производителем концентрациях 400-500 мг/л действующего вещества. Ростовые вещества не добавляли. Культивировали верхушечные почки. Время введения в культуру – третья декада марта. В каждом варианте высажено на питательные среды 60 шт. эксплантов. Эффективность препаратов оценивали учетом числа выживших и развивших побеги эксплантов в процентном соотношении к числу изначально высаженных. Степень регенерации эксплантов (в %) к моменту первого пассажа различных подвоев на средах с испытываемыми антибиотиками указана в таблицах 18-22 и на рисунке 13.

Таблица 18 – Действие антибиотиков на экспланты подвоя СК 2

Антибиотик	Доля регенерировавших эксплантов после первого пассажа, %
Аугментин 400 мг/л	25
Гризеофульвин 500 мг/л	70
Контроль (без антибиотиков)	50
Ксенаквин 400 мг/л	0
Макропен 400 мг/л	0
Нистатин 200 мг/л (стандарт)	40
Цефепим 500 мг/л	55
НСР ₀₅	17,7

Таблица 19 – Действие антибиотиков на экспланты подвоя СК 3

Антибиотик	Доля регенерировавших эксплантов после первого пассажа, %
Аугментин 400 мг/л	20
Гризеофульвин 500 мг/л	30
Контроль (без антибиотиков)	10
Ксенаквин 400 мг/л	5
Макропен 400 мг/л	0
Нистатин 200 мг/л (стандарт)	0
Цефепим 500 мг/л	25
НСР ₀₅	10,9

Таблица 20 – Действие антибиотиков на экспланты подвоя СК 4

Антибиотик	Доля регенерировавших эксплантов после первого пассажа, %
Аугментин 400 мг/л	45
Гризеофульвин 500 мг/л	85
Контроль (без антибиотиков)	45
Ксенаквин 400 мг/л	5
Макропен 400 мг/л	25
Нистатин 200 мг/л (стандарт)	45
Цефепим 500 мг/л	70
НСР ₀₅	23,7

Таблица 21 – Действие антибиотиков на экспланты подвоя СК 7

Антибиотик	Доля регенерировавших эксплантов после первого пассажа, %
Аугментин 400 мг/л	65
Гризеофульвин 500 мг/л	65
Контроль (без антибиотиков)	65
Ксенаквин 400 мг/л	0
Макропен 400 мг/л	0
Нистатин 200 мг/л (стандарт)	10
Цефепим 500 мг/л	75
НСР ₀₅	27,5

Таблица 22 – Действие антибиотиков на экспланты подвоя ММ 106

Антибиотик	Доля регенерировавших эксплантов после первого пассажа, %
Аугментин 400 мг/л	75
Гризеофульвин 500 мг/л	85
Контроль (без антибиотиков)	45
Ксенаквин 400 мг/л	10
Макропен 400 мг/л	10
Нистатин 200 мг/л (стандарт)	75
Цефепим 500 мг/л	30
НСР ₀₅	28,3

Анализ данных таблиц 18-22 и рисунка 13 показывает, что растения реагируют на антибиотики сортоспецифично. По всей видимости, это связано с генетическими особенностями сортов и их специфической реакцией на искусственные условия среды *in vitro* и особенностями их взаимодействия с патогенами. Макси-

мальный saniрующий эффект на подвоях СК 2, СК 3, СК 4, ММ 106 проявил антибиотик гризеофульвин (различие с контролем существенно), на подвое СК 7 – цефепим в концентрации 500 мг/л (регенерация на 10 % выше, чем в контрольном варианте и в варианте с гризеофульвином, различие несущественно). Доля регенерировавших эксплантов для подвоя СК 3 существенно выше также в варианте с применением цефепима, а для ММ 106 – аугментина и нистатина. Стоит отметить, что экспланты подвоя СК 7 на средах с добавлением антибиотика гризеофульвин регенерировали на 65 %. Таким образом, антибиотик гризеофульвин в концентрации 500 мг/л обладает наиболее стабильным saniрующим эффектом (таблицы 18-22, рис. 13).

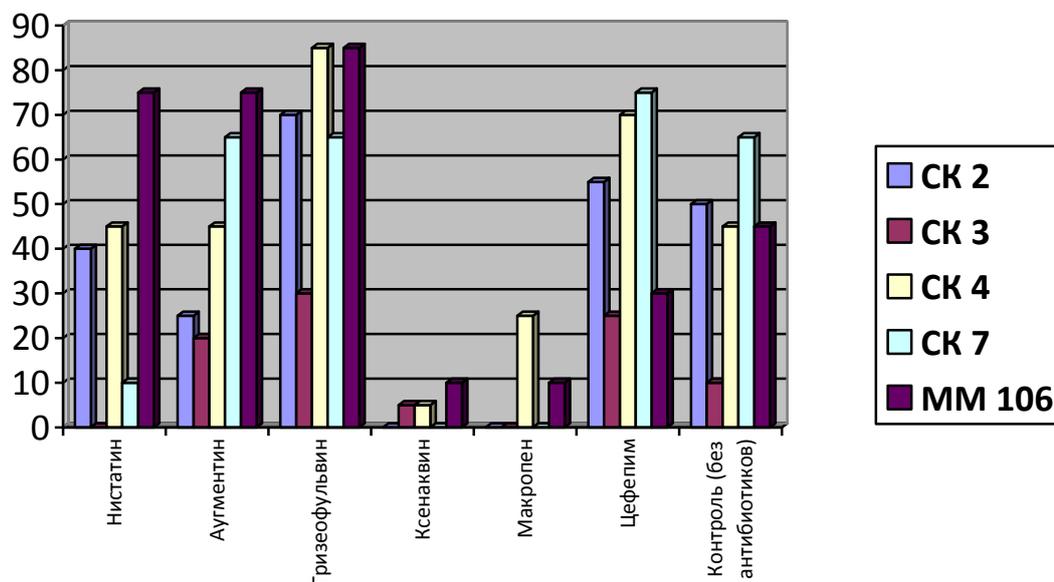


Рисунок 13 – Уровень регенерации эксплантов экспериментальных подвоев на средах с различными антибиотиками (%)

Антибиотики ксенаквин и макропен оказывают угнетающее воздействие на экспланты (таблицы 18-22, рисунок 13).

Таким образом, для санации эксплантов подвоев СК 2, СК 3, СК 4 и ММ 106 при введении их в культуру *in vitro* следует добавлять в санитарную среду антибиотик гризеофульвин в концентрации 500 мг/л. На способ клонального микроразмножения и оздоровления подвоев яблони *in vitro* с использованием анти-

биотика гризеофульвин получен патент [100]. Для освобождения от инфекции эксплантов подвоя СК 7 следует использовать антибиотик цефепим в концентрации 500 мг/л. Антибиотики ксенаквин и макропен добавлять в среду не рекомендуется, так как они оказывают угнетающее действие на растения.

Препараты аугментин, ксенаквин, макропен, цефепим, нистатин применяли также нанесением раствора антибиотика на поверхность инфицированной среды в культивационный сосуд (200 мг/л). После этого наблюдали за развитием растений и инфекции. Данные о результатах эксперимента приведены в таблице 23.

Таблица 23 – Оздоровление мериклонов вегетативно-размножаемых подвоев серии СК и ММ 106 от посадочной инфекции путём поверхностной обработки среды (200 мг/л)

Название антибиотика	Число обработанных эксплантов		Число оздоровленных (санированных) эксплантов	
	шт.	%	шт.	%
Аугментин	50	100	0	0
Ксенаквин	50	10	0	0
Макропен	50	100	0	0
Нистатин	50	100	0	0
Цефепим	50	100	0	0

Анализ данных таблицы 23 показывает, что поверхностная обработка инфицированных мериклонов положительного результата не дала.

Следует заключить, по влиянию антибиотиков на средовую и посадочную инфекцию и на рост и развитие растений, благоприятное влияние на микропобеги оказывает нистатин 200 мг/л: коэффициент размножения на среде с данным антибиотиком равен 4,3, в этой же концентрации нистатин обладает санирующим эффектом 60-75 % для подвоев СК 2 и ММ 106.

Однако, наиболее стабильным санирующим эффектом для подвоев СК 2, СК 3, СК 4, СК 7 и ММ 106 (доля регенерировавших эксплантов относительно изначально введённых в стерильную культуру 65-85%) обладает антибиотик гризеофульвин 500 мг/л.

3.4 Подбор эффективных и безопасных стерилизаторов для санации эксплантов подвоев яблони

На этапе введения экплантов в культуру *in vitro* нами протестирован ряд не применявшихся ранее в клональном микроразмножении препаратов для стерилизации экплантов наравне с уже известными в данной технологии стерилизаторами, была испытана их эффективность для подвоев яблони серии СК и ММ 106.

Цель эксперимента – снизить посадочную инфекцию и повысить выход здоровых экплантов. За основу для проведения эксперимента была взята методика Высоцкого В.А. и др. [33, 47, 71]. Для стерилизации использованы ранее не применявшиеся в клональном микроразмножении подвоев яблони препараты фосфопаг, скор, эупарен, делан. Выбор в пользу данных веществ был сделан потому, что они являются умеренно опасными и малоопасными: скор, эупарен, делан относятся к третьему классу опасности, фосфопаг – к четвёртому. Экспериментальные препараты обладают различным спектром действия: скор – системный фунгицид, делан – контактный фунгицид, эупарен эффективен против грибных болезней и клещей, фосфопаг обладает противомикозной, антибактериальной, а также противовирусной активностью. В качестве контроля высажены не стерилизованные меристемы, а в качестве стандарта взят йодид ртути, широко применяемый в клональном микроразмножении стерилизатор, который относится к первому классу опасности - чрезвычайно опасные вещества (таблица 24).

Установлено, что максимальный выход стерильных экплантов обеспечивает препарат фосфопаг 0,5 г/100 мл (65%, различие среднего значения по двум повторностям со стандартом существенно, таблица 24). Другие экспериментальные препараты, как видно из таблицы 24, оказались неэффективными стерилизаторами экплантов подвоев яблони. Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [13].

Таблица 24 - Анализ эффективности стерилизующих препаратов при обработке эксплантов перед посадкой

Стерилизующий агент	Повторности	Посажено эксплантов, шт.	Инфицировано, шт.	Выход, шт.	Доля жизнеспособных эксплантов, %	
					по повторностям	в среднем
без стерилизации (контроль)	1	100	100	0	0	0
	2	100	100	0	0	
Фосфопаг 0,5г/100мл г	1	100	50	50	50,0	65
	2	100	20	80	80,0	
Скор 0,2г/100мл	1	90	60	30	33,3	16,7
	2	90	90	0	0,0	
Эупарен 0,2г/100мл	1	90	80	20	22,2	11,1
	2	100	100	0	0,0	
Делан 0,2г/100мл	1	100	90	10	10,0	5
	2	90	90	0	0,0	
HgI ₂ 0,1г/100мл (стандарт)	1	450	260	190	42,2	25,3
	2	240	220	20	8,3	
НСР ₀₅					17,6	22,7

В качестве замены высокотоксичному, но наиболее известному препарату сулемы был также испытан малотоксичный для человека и эффективный стерилизатор гидропирит. Объектами для подбора эффективных стерилизаторов послужили экспланты подвоев яблони серии СК и ММ 106. Исследовали 15% водный раствор гидропирита ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \times \text{H}_2\text{O}_2$) в различных экспозициях.

В опыте 3 варианта:

1. Обработка эксплантов водой (контроль).
2. Обработка эксплантов йодидом ртути (HgI_2) 0,1 % с экспозицией 3 минуты (стандарт).
3. Обработка эксплантов 15% раствором гидропирита ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \times \text{H}_2\text{O}_2$) - время стерилизации 10, 20, 30 минут.

После поверхностной обработки эксплантов их поместили на санитарную питательную среду по Мурасиге и Скугу, состоящую из минеральных солей, витаминов, сахарозы, агара, без ростовых веществ.

В течение месяца проводились наблюдения за регенерацией микропобегов. Оценивалось проявление стерилизующей активности вещества, т.е. обеспечение

максимального количества стерильных эксплантов, а также влияние препаратов на регенерацию эксплантов. Результаты исследования представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Анализ эффективности стерилизующих веществ при предпосадочной поверхностной обработке эксплантов подвоев серии СК и ММ 106

Количество эксплантов	Стерилизующее вещество									
	Без обработки (контроль)		HgJ ₂ 0,1% (стандарт)		15% раствор гидропирита экспозиция 10 мин.		15% раствор гидропирита экспозиция 20 мин.		15% раствор гидропирита экспозиция 30 мин.	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Посажено	200	100	200	100	200	100	200	100	200	100
Инфицировано	200	100	80	40	200	100	180	90	140	70

Анализ данных таблицы 25 показывает, что максимальный выход санированных здоровых эксплантов подвоев яблони (60 %) обеспечивает стерилизация в водном растворе иодида ртути (HgJ₂) 0,1 %. Только 30 %-ную степень оздоровления обеспечивает стерилизация в водном 15 %-м растворе гидропирита с экспозицией в 30 минут (таблица 25). Дальнейшее уменьшение времени экспозиции ведёт к уменьшению выхода здоровых эксплантов до 10 % при стерилизации в течение 20 минут, и полному отсутствию здоровых эксплантов при экспозиции 10 минут (таблица 25).

Важно отметить, что длительное нахождение эксплантов в стерилизующем растворе гидропирита (30 мин), необходимое для достижения максимального эффекта санации, неблагоприятно сказывается на жизнеспособности оздоровленных эксплантов при дальнейшем культивировании *in vitro*. Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [13].

Таким образом, применение 15 % раствора гидропирита для стерилизации эксплантов вегетативно-размножаемых подвоев нецелесообразно в силу низкого выхода санированного материала. По этой причине поиски эффективного стерилизатора продолжены.

Так в ходе исследований по подбору наиболее эффективного и безопасного стерилизующего средства для санации эксплантов подвоев яблони испытан бытовой препарат «Белизна» (действующее вещество - гипохлорит натрия), разбавленный водой в соотношении 1:1; 1:2 и 1:4. Время экспозиции 4 минуты. В качестве стандарта использовали 0,1 % раствор йодида ртути (HgJ₂).

Результаты исследований изложены в таблице 26.

Таблица 26 – Результативность стерилизации эксплантов при введении в культуру *in vitro* эксплантов подвоев яблони серии СК

Стерилизующий реагент	Эффективность стерилизации, %	Сортообразец			В среднем
		СК 2	СК 3	СК 4	
HgJ ₂ , 0,1%, стандарт	жизнеспособные	58,9	84,3	72,2	71,8
	инфицированные	5,8	5,2	0,0	3,7
	некроз	35,3	10,5	27,8	24,5
«Белизна» 1:1	жизнеспособные	64,2	57,2	80,7	67,4
	инфицированные	0,0	0,0	0,0	0,0
	некроз	35,8	42,8	19,3	32,6
«Белизна» 1:2	жизнеспособные	77,6	69,3	79,6	75,5
	инфицированные	8,4	7,7	6,8	7,6
	некроз	14,0	23,0	13,6	16,9
«Белизна» 1:4	жизнеспособные	52,0	51,4	54,0	52,5
	инфицированные	37,7	36,2	36,7	36,9
	некроз	10,3	12,4	9,3	10,7
НСР ₀₅	жизнеспособные	12,8	17,2	14,5	

Анализ полученных данных показывает, что максимально сильнодействующим стерилизатором является бытовой препарат «Белизна» в разведении 1:1. Инфицированных эксплантов в этом варианте опыта не было. Однако, действие реагента на меристемы было довольно жестким. При этом, четко прослеживается реакция испытуемых образцов. Так наиболее толерантным к стерилизующему агенту был образец СК 4. В данном варианте отмечен самый высокий выход жизнеспособных эксплантов (80,7 %) и наиболее низкий процент (19,3 %) погибших. У образцов СК 2 и СК 3 выход живых меристем составил 64,2 и 57,2 %, а погибших от токсичного действия стерилизатора 35,8 и 42,8 %, соответственно (таблица 26).

Действие препарата «Белизна» в разведении 1:2 было более мягким. Выход живых эксплантов составил 77,6 % у СК 2 (различие существенно) и 69,3 % у СК 3. Значительно ниже было количество погибших эксплантов: СК 2 - 14,3 и СК 3 - 23,0 %. У образца СК 4 эти показатели составили 79,6 и 13,6 %. Однако, в варианте с разведением «Белизны» 1:2 отмечено наличие инфицированных эксплантов, составившее для образцов СК 2, СК 3, СК 4 – 8,4; 7,7 и 6,8 %, соответственно.

Самый низкий эффект стерилизации отмечен в варианте опыта с использованием препарата «Белизна» в разведении 1:4. Так, количество инфицированных эксплантов у образцов СК 2, СК 3, СК 4 составило 37,7; 36,2; 36,7; а выход жизнеспособных эксплантов 52,0; 51,3 и 54,0 %, соответственно. В то же время действие препарата на растительную ткань здесь было наиболее мягким, так как количество погибших эксплантов было в пределах 9,3-12,4 % (таблица 26).

В стандартном варианте с использованием 0,1 % раствора йодида ртути также отмечен выпад эксплантов от токсичного действия препарата. Следует отметить, что в этом варианте опыта также прослеживается различная реакция сортообразцов на действие реагента. Так, у образца СК 3 отмечен наиболее высокий выход жизнеспособных меристем 84,3 % и низкий процент (10,5) погибших. У образца СК 4 выход живых меристем несколько ниже 72,2 %, а погибших 27,8 %, наиболее чувствительным к стерилизатору был образец СК 2: количество погибших меристем здесь было самым высоким и составило 35,3 % (таблица 26). Полученные результаты отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [13].

Этап введения эксплантов в культуру *in vitro* является очень важным этапом технологии. В этот период от находящейся на эксплантах инфекции может погибнуть значительная часть вводимого материала, вплоть до 100 % гибели. Чтобы предотвратить это неблагоприятное явление применяют стерилизацию эксплантов. Самым известным и широко применяемым стерилизатором является высокотоксичный препарат сулема (первый класс опасности). Нами в ходе исследований были подобраны эффективные и безопасные препараты для санации эксплантов подвоев яблони от инфекции, такие как бытовой препарат «Белизна» (гипохлорит

натрия) в разведении 1:2, малоопасное вещество четвёртого класса опасности (доля жизнеспособных эксплантов 75,5% от изначально высаженных), а также фосфаг, препарат четвёртого класса опасности (доля жизнеспособных эксплантов 65% от изначально высаженных).

3.5 Оптимизация сроков введения в культуру *in vitro* и другие условия успешного клонального микроразмножения подвоев яблони

Важным аспектом микроклонального размножения являются сроки изоляции исходного материала с маточных растений и сроки введения в культуру *in vitro* эксплантов. От срока изоляции эксплантов с исходных маточных растений в значительной степени зависит проявление регенерационной способности эксплантов. В связи с этим, были проведены опыты, в ходе которых экспланты подвоев яблони СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106 вводили в культуру *in vitro* в разные месяцы с февраля по июль. Использовали среду МС с половинным содержанием минеральных солей, дополненную 6-БАП 0,4 мг/л. В течение месяца проводились наблюдения за регенерацией микропобегов. Оценивалась доля регенерировавших эксплантов к числу изначально высаженных. Результаты эксперимента приведены в таблице 27.

Таблица 27 – Доля регенерировавших эксплантов серии СК и ММ 106, введённых в культуру *in vitro* в разные месяцы к моменту первого пассажа, %

Месяц/ подвой	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь	Июль
СК 2	0,0	68,8	45,9	74,9	64,1	36,3
СК 3	0,0	52,4	32,1	78,6	54,2	29,1
СК 4	0,0	70,0	45,4	49,1	51,5	46,2
СК 7	0,0	52,4	58,8	64,6	63,2	38,8
ММ 106	0,0	54,8	56,1	70,6	74,1	35,1
среднее	0,0	59,7	47,7	67,6	61,4	37,1
НСР ₀₅						6,5

Согласно данным таблицы 27, благоприятными сроками изоляции и культивирования меристем подвоев яблони оказались март-июнь с некоторым снижением в апреле. Доля регенерировавших эксплантов, высаженных *in vitro* в период март-июнь через месяц после введения в культуру составляет 47,7-67,6 % (в среднем). По месяцам средний уровень регенерации эксплантов составил в марте – 59,7 %, апреле – 47,7 %, мае 67,6 %, июне 61,4 % (таблица 27). Длина светового дня в эти месяцы увеличивалась от 11ч 10 мин в начале марта до максимальной продолжительности 15 ч 38 мин 22 июня и снизилась до 14 ч 44 мин в конце июля [29]. Если за контроль взять март (фазу распускания почек), то существенно больший уровень регенерации микропобегов наблюдается в мае (фаза интенсивного роста побегов). Также отмечено, что сроки введения в культуру *in vitro* дифференцированы для генотипов подвоев. В частности, для СК 2 и СК 4 оптимальными являются фазы распускания почек (март), а для СК 2, СК 3, СК 7, ММ 106 - интенсивного роста побегов (май – июнь).

Снижение уровня регенерации эксплантов подвоев яблони в апреле объясняется тем, что на этот период приходится VIII-IX этап органогенеза. В этот период гинецей и андроцей цветка находятся на завершающей стадии формирования. Фенофаза розый бутон соответствует VIII этапу органогенеза.

Согласно исследованиям Исаевой И.С., Бунцевича Л.Л., на этом этапе интенсивность формирования всех органов цветка достигает максимума. Следовательно, формирование вегетативных органов побегов снижается, так как гормональный баланс сдвинут в сторону реализации генеративного потенциала [18, 58]. Маточные растения подвоев яблони, с которых были изолированы экспланты, генетически предрасположены к реализации программ нормального органогенеза с соблюдением гормонального сдвига.

Таким образом, благоприятным сроком введения меристемы подвоев яблони в культуру *in vitro* являются фазы распускания почек (март) – для СК 2 и СК 4 и интенсивного роста побегов (май – июнь) – для СК 2, СК 3, СК 7, ММ 106. Введение эксплантов в данные сроки позволяет повысить уровень регенерации на 37-50% по сравнению с неблагоприятными месяцами (февраль, июль). Полу-

ченные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [13].

Важным аспектом микроклонального размножения также являются особенности исходного растительного материала при введении в культуру *in vitro* и дальнейшем микроразмножении, такие как генотипическая реакция растений при их культивировании *in vitro*, происхождение, размер эксплантов, ориентация их на питательной среде. Рассмотрим подробнее данные особенности.

Генотипическая реакция растений при их культивировании in vitro. В культуре *in vitro*, по мнению многих исследователей, у большинства плодовых и ягодных культур на всех этапах микроразмножения ярко проявляются сортовые и видовые особенности, и коэффициент размножения в большей степени зависит от генотипа, чем от модели размножения *in vitro* [33, 34, 75, 81, 108, 109, 122, 178].

Генотипическая реакция подвоев СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106 на условия культивирования *in vitro* приведена по ходу изложения результатов диссертации в главах 3.1 -3.5 и сводится к тому, что, в целом, максимальной регенерационной способностью обладают экспланты подвоя СК 2, далее в порядке убывания следуют СК 4, ММ 106, СК 7, СК 3.

Происхождение экспланта. Как известно из литературных источников, лучшим регенерационным потенциалом обладают верхушечные почки, по сравнению с боковыми [116, 123, 150]. Эта закономерность объясняется специфическим содержанием эндогенных регуляторов роста (ауксиноподобных веществ) в верхушечных почках [38].

В связи с этим, в наших экспериментах для введения в культуру *in vitro* отбирались верхушечные почки с черенков подвоев СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106.

Размер эксплантов. Размер вводимых в культуру *in vitro* эксплантов, по мнению учёных, имеет большое значение. Чем меньше размер изолируемого апекса, тем больше вероятность оздоровления [32]. Однако жизнеспособность меристематических тканей зачастую очень низкая. По мнению Калинина Ф.Л. и

др. приживаемость апикальных верхушек размером 0,1-0,2 мм без листовых примордиев составляет 1-10 % [60].

Поэтому, если оздоровление от вирусов не является основной задачей, целесообразно использовать экспланты размером 0,5-2,0 мм, состоящие из конуса нарастания и двух-трех листовых примордиев и подстилающего слоя ткани [63, 74, 81, 123]. Экспланты указанного размера легко регенерируют и незначительно инфицированы.

Исходя из приведённых литературных данных, в наших исследованиях в культуру *in vitro* вводились экспланты размером 1-2 мм.

Ориентация на среде. Как известно из литературы, почки плодовых растений лучше приживаются при введении их в культуру *in vitro* при соприкосновении их абаксиальной частью со средой [175]. Опираясь на данные литературные сведения, мы располагали экспланты из почек подвоев яблони так, чтобы они соприкасались абаксиальной частью со средой.

В процессе оптимизации и поиска путей повышения эффективности технологии клонального микроразмножения подвоев яблони *in vitro* соблюдались определенные физические факторы культивирования эксплантов.

К физическим факторам относятся температура, условия освещения, влажность воздуха и др.

По мнению Матушкиной О.В., на первых двух этапах клонального микроразмножения освещенность колеблется от 1000 до 3000 Лк, фотопериод 14 – 16 часов [81].

Ряд исследователей отмечают, что температура культивирования обычно варьирует в интервале 22 – 26 °С днем и 18 – 22 °С ночью. Оптимальная относительная влажность воздуха – 65–70 % [40, 66].

В целом, для повышения коэффициента размножения необходимо каждому виду с учетом его естественного ареала произрастания подбирать индивидуальные условия культивирования [40, 66].

В наших экспериментах культивирование микропобегов осуществляли в условиях стандартного фотопериода 16/8 (день - 16 часов, ночь - 8 часов), осве-

ценности 2500-3000 люкс, температуре $+23\pm 3$ ° С и влажности 50-60 %, что, в целом, соответствует параметрам культивирования *in vitro* подвоев яблони.

3.6 Адаптация микрорастений к нестерильным условиям среды

На этапе адаптации к нестерильным условиям гибнет 50-90 % мериклонов [15, 31, 33, 37, 47]. С целью уменьшения доли погибших оздоровленных растений нами были заложены три серии опытов по улучшению условий адаптации.

Объектом исследований послужили подвой серии СК, ММ 106.

Задачей первой серии опытов являлась оценка эффективности различных почвенных субстратов для приживаемости микрорастений подвоев СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106.

В 1-ом варианте растения высажены в торфяные контейнеры, заполненные торфяной смесью. Во 2-ом варианте использовался модифицированный чернозем - стабилизированный в течение суток при температуре 100 ° С выщелоченный чернозем с добавлением половинного раствора солей по прописи Мурасиге-Скуга. В контрольном варианте использовался субстрат, приготовленный из 1/3 песка; 1/3 чернозёма; 1/3 торфа. Во всех вариантах высажено по 200 растений (таблица 28).

Таблица 28 - Приживаемость адаптантов на различных субстратах

№ п\п	Варианты	Высажено растений,		Адаптировано растений,	
		шт.	%	шт.	%
1	Торфяная смесь	200	100	51	25,5
2	Модифицированный чернозём	200	100	180	90
3 (контроль)	Песок: чернозём: торф = 1:1:1	200	100	96	48

В результате опыта установили, что лучше всего развились и хорошо прижились растения, высаженные на модифицированном черноземе: 180 шт. адаптированных из 200 высаженных (90%). В 1-ом варианте прижилось 51 шт. адаптан-

тов из 200 шт. высаженных (25,5%), в контроле 96 шт. (48%) за тот же период времени (таблица 28).

На основе проделанной работы можно заключить, что для адаптации мериклонов вегетативно-размножаемых подвоев яблони лучше применять в качестве субстрата модифицированный чернозём. Его высокие адаптивные качества можно объяснить как внешней обработкой: добавлением комплекса макро- и микроэлементов, повышающих питательные свойства субстрата, и длительной тепловой обработкой, saniрующей субстрат от болезнетворных микроорганизмов, так и собственными выдающимися физико-химическими свойствами чернозёма щелоченного. По данным Валькова В.Ф. с соавторами, содержание гумуса в верхних 10 см чернозёмов, выщелоченных составляет 6-10%, падение его вниз по профилю постепенное. В верхней части гумусового горизонта реакция среды близка к нейтральной или нейтральная, и лишь к нижней границе гумусового горизонта происходит ее слабое подкисление. Описываемые черноземы характеризуются высоким естественным плодородием, широко используются в сельском хозяйстве для производства зерна, и прежде всего озимой и яровой пшеницы и других культур [23]. Полученные экспериментальные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [12].

Задачей второй серии опытов был подбор оптимального объёма контейнеров для пересадочной культуры мериклонов. Объекты исследований - микрорастения подвоев СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106. Адаптанты были высажены в сосуды разного объёма (1 вариант – 1500 л, 2 вариант 800 мл, 3 вариант - 400 мл, 4 вариант - 200 мл), заполненные модифицированным чернозёмом. На каждый вариант высаживалось по 50 мериклонов (таблица 29).

Таблица 29 - Приживаемость адаптантов в контейнерах различного объёма

№ варианта	Размер культивационного сосуда, мл	Прижилось адаптантов	
		шт.	%
1	1500	39	78
2	800	40	80
3	400	33	66
4	200	0	

Процентная приживаемость по вариантам в данном опыте составила: 1 вариант – 78 %, 2 вариант – 80 %, 3 вариант – 66 %, 4 вариант – 0 % (полная гибель). По данным опыта видно, что максимальная приживаемость микрорастений (80 %) на этапе адаптации отмечена в сосудах 800 мл. При уменьшении объёма сосуда, снижается приживаемость адаптантов (при объёме 400 мл – приживаемость 65 %), а сосуды объёмом 200 мл показали отрицательный результат с полной гибелью микрорастений (таблица 29, рисунок 14). Это связано с быстрым иссушением субстрата в контейнерах малого объёма. В сосудах объёмом 1500 мл приживаемость микрорастений на том же уровне, что и при объёме 800 мл, однако развитие адаптантов происходит медленно. Это, предположительно, связано с тем, что корневая система медленно нарастает, и пока не заполнит весь объём, не происходит развития надземной части растений.

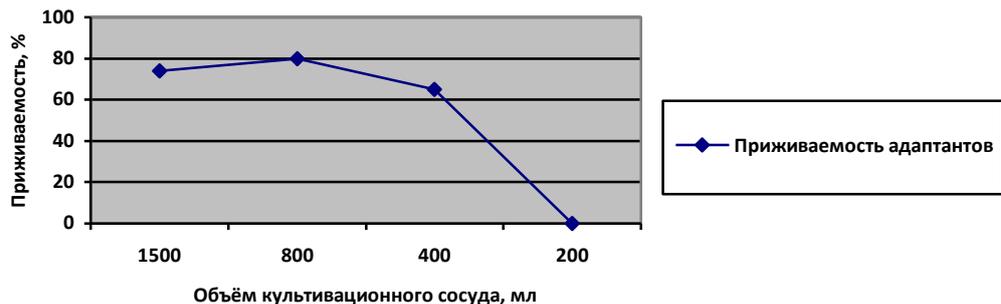


Рисунок 14 - Приживаемость адаптантов в контейнерах различного объёма

Таким образом, оптимальным объёмом культивационного сосуда для адаптации подвоев яблони к нестерильным условиям является сосуд 800 мл, можно также использовать сосуды 400 мл, не следует проводить адаптацию растений в сосудах 200 мл, так при этом происходит быстрое иссушение субстрата и все адаптанты гибнут. Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [12].

Задачей третьей серии опытов по адаптации явилось определение оптимальной степени развития микрорастений вегетативно-размножаемых подвоев

яблони для пересадки их в почвенный субстрат в нестерильные условия (начало адаптации). Опыт призван обеспечить высокий выход адаптируемых растений.

В схеме опыта два варианта. Первый вариант составили растения, достигшие размера 5-10 см, с хорошо развитой корневой системой (4-5 корешка длиной 2-5 см.). Второй вариант – это растения средней и небольшой величины (3-4 см), со слабо развитой корневой системой. В каждом варианте растения были высажены в количестве 80 шт. В качестве посадочной тары применялись пластиковые контейнеры, в качестве субстрата использовался модифицированный чернозём. Растения содержались при комнатной температуре в течение 2-х недель с момента высадки в субстрат, накрытые пленкой для поддержания оптимальной влажности. Затем микрорастения были перенесены в фитотрон, с температурой воздуха 24-28 °С и искусственным досвечиванием. К этому времени растения были полностью переведены в режим с открытым доступом воздуха. До того проводилось проветривание, начиная с 15 минут и до 3-4 часов в сутки. Результаты опыта приведены в таблице 30.

Таблица 30 - Приживаемость адаптантов с различной степенью развития стебля и корневой системы

№ п\п	Варианты	Прижилось адаптантов	
		шт.	%
1	Растения, достигшие размера 5-10 см, с хорошо развитой корневой системой (4-5 корешка длиной 2-5 см.)	72	90
2	Растения средней и небольшой величины (3-4 см), со слабо развитой корневой системой	44	55

В результате наблюдения за состоянием объектов установили, что лучше всего развились и хорошо прижились растения первого варианта (размер 5-10 см, 4-5 корешка длиной 2-5 см). Растения второго варианта, размером 3-4 см, подверглись большому подвяданию, тургор некоторых листьев не восстановился. В период адаптации в первом варианте погибло 8 растений из 80,

а во втором - 36 растений из 80 шт. (таблица 30). При этом необходимо отметить, что растения первого варианта имели хороший внешний вид, значительно опережали в росте и развитии второй вариант. Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л. [12].

Также было изучено влияние на приживаемость в нестерильных условиях мериклонов подвоя яблони ММ 106 освещения люминесцентными лампами белого света ЛД-40-2 и лампами с повышенным содержанием красного света в световом потоке – Osram Fluora, ЛФ 40-4 и светильниками ОЛБ 05-180. В каждом варианте опыта наблюдения велись за 100 шт. мериклонов. Выявили, что максимальный процент приживаемости (80%) микрорастений подвоя ММ 106 на этапе адаптации к нестерильным условиям наблюдался при освещении лампами Osram Fluora и лампами ЛФ-40-4. Полученные результаты исследований отражены в статье Бьядовского И.А. с соавторами [22].

На рисунке 15 представлены адаптированные растения подвоя СК 2



Рисунок 15 – Адаптированные растения СК 2: слева – 1 вариант – для начала адаптации выбраны растения, достигшие размера 5-10 см, с хорошо развитой корневой системой (4-5 корешка длиной 2-5 см), справа 2 вариант - для начала адаптации выбраны растения средней и небольшой величины (3-4 см), со слабо развитой корневой системой.

Пришли к заключению, что адаптацию микрорастений подвоев яблони следует начинать с момента, когда растения достигнут размера 5-10 см, а их корневая система будет состоять из нескольких хорошо развитых корешков, длиной 2-5 см в 800 мл сосудах на субстрате стабилизированный в течение суток при температуре 100 ° С выщелоченный чернозём с добавлением половинного раствора солей по прописи Мурасиге-Скуга. Для подвоя ММ 106 рекомендуется во время адаптации освещение лампами Osram Fluora и лампами ЛФ-40-4, процент приживаемости микрорастений при этом достигает 80%.

Комплекс рекомендуемых мероприятий позволит повысить эффективность одного из самых проблемных этапов клонального микроразмножения - адаптации мериклонов вегетативно-размножаемых подвоев яблони до 80-90%, что в значительной мере увеличит эффективность всей технологии микроразмножения.

В результате проведённых работ была получено с помощью клонального микроразмножения по 300 шт. адаптированных мериклонов подвоев СК 2 и ММ 106, по 100 шт. СК 3 и СК 7 и 200 шт. СК 4. Адаптированные мериклоны подвоев яблони высажены в карантинном питомнике ОПХ им. К.А. Тимирязева (Приложение А).

3.7 Экономическая эффективность разработанной методики клонального микроразмножения и оздоровления *in vitro* подвоев яблони

В результате проделанной работы были усовершенствованы поочередно все элементы технологии клонального микроразмножения подвоев яблони, что привело к снижению себестоимости технологии в целом.

Так, в стандартной технологии на 1 л питательной среды на этапе регенерации и мультипликации микропобегов уходит 1 мг БАП (3,4 руб.), 0,5 мг ГК (3,9 руб.), 0,1 мг ИМК (0,2 руб.), итого 7,5 руб. на ростовые вещества [140, 164, 168]. В разработанной технологии возможно применение вместо стандартной композиции стимуляторов роста (БАП, ГК, ИМК) 4 мг препарата фуrolан (0,4 руб.). Использовать фуrolан рекомендуем поочередно со стандартными ростовыми веще-

ствами (через пассаж). При проведении 5 пассажей затраты на стимуляторы роста в стандартной технологии составляют $7,5 \cdot 5 = 37,5$ руб., в разработанной (2 пассажа – стандартная композиция ростовых компонентов, 3 пассажа – фуrolан) $2 \cdot 7,5 + 3 \cdot 0,4 = 16,2$ (руб.). Таким образом, происходит двукратное удешевление технологии за счёт применения новых стимуляторов роста с низкой стоимостью и экономичной схемы расхода стандартных ростовых веществ ($37,5 \text{ руб.} / 16,2 \text{ руб.} = 2,3$).

За счёт использования крахмала в качестве структурообразователя вместо агар-агара происходит повышение качества микропобегов и удешевление технологии. В стандартной технологии структурообразователем питательных сред в течение всех пассажей является агар-агар. На 1 л среды расходуется 8 г агар-агара стоимостью 77 р [4]. В разработанной технологии возможно применение через пассаж вместо агар-агара крахмала. На 1 л среды используется 40 г крахмала стоимостью 8 руб. Таким образом, при проведении 5 пассажей на этапе регенерации и мультипликации микропобегов в стандартной технологии на структурообразующие вещества расходуется $77 \cdot 5 = 385$ (руб.), в разработанной технологии (2 пассажа – стандартный структурообразователь агар-агар, 3 пассажа – крахмал) $77 \cdot 2 + 8 \text{ руб.} \cdot 3 = 178$ (руб.). Происходит двукратное удешевление технологии за счёт применения более экономичной схемы расхода структурообразующих веществ ($385 \text{ руб.} / 178 \text{ руб.} = 2,2$).

Также проведён ряд модификаций технологии, повышающих эффективность различных этапов клонального микроразмножения. Например, при добавлении в среду антибиотика гризеофульвин происходит повышение выхода жизнеспособных микропобегов из эксплантов на этапе введения в культуру *in vitro* относительно контроля (среда без антибиотиков) СК 2 на 20%; СК 3 на 20%; СК 4 на 40%, СК 7 на 10 % (использование цефепима); ММ 106 на 40 %. В среднем, происходит увеличение выхода жизнеспособных микропобегов из эксплантов на 26 %.

Проведённые модификации технологии микроразмножения подвоев яблони систематизированы в таблице 31.

Таблица 31 - Повышение экономической эффективности разработанной технологии относительно стандартной

Показатели	Стандартная технология	Разработанная технология
Затраты на стимуляторы роста	37,5 руб.	16,2 руб.
	<p>Двукратное удешевление технологии за счёт применения более экономичной схемы расхода ростовых веществ (37,5 руб./16,2 руб.=2,3).</p> <p>Повышение выхода стандартных микропобегов, способных к укоренению, относительно стандарта (1мг/л БАП, 0,5 мг/л ГК, 0,1 мг/л ИМК) на 10 %</p>	
Затраты на структурообразующие компоненты	385 руб.	178 руб.
	<p>Двукратное удешевление технологии за счёт применения более экономичной схемы расхода структурообразующих веществ (385 руб./178 руб.=2,2).</p>	
Антибиотики	Увеличение выхода жизнеспособных микропобегов из эксплантов на 25 %.	
Стерилизаторы	Повышение выхода жизнеспособных микропобегов из эксплантов относительно стандарта (сулема) при использовании в качестве стерилизатора бытового препарата «Белизна» – на 4 %, фосфопаг – на 40 %.	
Повышение эффективности адаптации	Повышение выхода адаптированных микрорастений: при проведении адаптации в 800 мл сосудах относительно 400 мл на 14%; при адаптации микрорастений, достигших размера 5-10 см, с хорошо развитой корневой системой (4-5 корешка длиной 2-5 см) относительно микрорастений средней и небольшой величины (3-4 см), со слабо развитой корневой системой на 33 %.	

На этапе введения в культуру *in vitro* повышение выхода жизнеспособных микропобегов из эксплантов достигается при использовании стерилизаторов «Белизна» на 4 %, фосфопаг – на 40 % относительно стандарта (сулема).

Применение препарата фуролан на этапе регенерации микропобегов приводит к повышению выхода стандартных микропобегов, способных к укоренению относительно стандарта (1 мг/л БАП, 0,5 мг/л ГК, 0,1 мг/л ИМК) на 10 %.

Повышение выхода адаптированных микрорастений происходит при проведении адаптации в 800 мл сосудах относительно 400 мл на 14%, при адаптации микрорастений, достигших размера 5-10 см, с хорошо развитой корневой системой (4-5 корешка длиной 2-5 см.) относительно микрорастений средней и небольшой величины (3-4 см), со слабо развитой корневой системой на 33 %.

Расчёт экономической эффективности производства посадочного материала подвоев яблони с использованием разработанной технологии клонального микро размножения приводим в таблице 32. Производственные затраты рассчитывали по «Методическим рекомендациям по определению экономической эффективности научных достижений в садоводстве» (М., 2005). Все расчёты по определению экономической эффективности выполнены в отделе экономики ФГБНУ СКЗ-НИИСиВ.

Таблица 32 – Экономическая эффективность производства микрорастений подвоев яблони

Показатели	Традиционная технология	Проектируемая технология	Отклонение, +/-
Материальные затраты на производство, руб./шт, всего, в том числе:	422,5	196,2	-226,3
– на приобретение стимуляторов роста	37,5	16,2	-21,3
– на приобретение структурообразующих компонентов	385,0	178,0	-207,0
– на приобретение антибиотиков	-	2,0	
Себестоимость производства, руб./шт	497,1	261,6	-235,5
Цена реализации, руб./шт	600,0	600,0	0,0
Прибыль от реализации, руб./шт	102,9	338,4	235,5
Рентабельность производства, %	20,7	129,4	108,6

За счёт ряда модификаций, повышающих эффективность отдельных этапов клонального микроразмножения подвоев яблони и снижающих затраты на структурообразующие препараты и стимуляторы роста усовершенствованная технология в целом позволит снизить себестоимость производства оригинального посадочного материала на 235,5 руб./шт. и повысить рентабельность на 108,6 %.

ВЫВОДЫ

1. При испытании стимуляторов роста (производные и композиции органических кислот и препараты, синтезированные на основе фурфурола) по выходу стандартных микропобегов, способных к укоренению, выделились препараты фуrolан (выход 67,8 % эксплантов ко второму пассажу) и сукцинат калия (63,9 %). Оптимальной концентрацией для обоих препаратов оказалась 4 мг/л. На каждом микрорастении, выращенном с применением фуrolана, к третьему пассажу, в среднем, развивается на 2,3 листа больше, чем в стандартном варианте (1 мг/л БАП и 0,5 мг/л ГК, 0,1 мг/л ИМК), коэффициент размножения на 0,6 единиц выше, а общее состояние на 0,6 баллов лучше, чем стандарт. На среде с данным стимулятором роста на 28 % больше растений с интенсивной зелёной окраской листьев, на 24,6% больше микропобегов со стеблем. Максимальный выход стандартных микропобегов на среде с фуrolаном отмечен у подвоев СК 2 (88,4 %), СК 4 (70,5 %), ММ 106 (66,8 %).

2. При анализе способности к укоренению эксплантов выявили, что максимальная ризогенная активность отмечена у подвоев ММ 106. На всех типах подвоев (СК 2, СК 3, СК 7, ММ 106) прослеживается тенденция: при концентрации ИМК 2,0 мг/л максимально эффективно происходит укоренение у всех типов подвоев.

3. Изучение и подбор структурообразующих веществ для размножения *in vitro* подвоев яблони позволили установить, что на среде, содержащей макро- и микроэлементы по прописи Мурасиге-Скуга с заменой агар-агара на картофельный крахмал микрорастения развивают большее количество листьев (6-10 шт.) и имеют лучшее общее состояние (5 баллов), чем в контроле на агаризованной питательной среде (6-7 шт. листьев и 4 балла общее состояние).

4. Установлено, что колонии эпифитных дрожжей и грибов *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus album*, *Cryptococcus laurentii* (дрожжи), *Penicillium cycloporum* засоряют сосуды с питательными средами и контаминируют мериклоны.

5. Наиболее стабильный saniрующий эффект для подвоев серии СК и ММ 106 (доля регенерировавших эксплантов относительно изначально введённых в стерильную культуру 65-85 %) обладает антибиотик гризеофульвин 500 мг/л.

6. Оптимальным порядком введения антибиотиков в питательные среды является добавление непосредственно перед автоклавированием.

7. В ходе исследований были подобраны эффективные и безопасные препараты для санации эксплантов подвоев яблони от инфекции, такие как бытовой препарат «Белизна» (гипохлорит натрия) в разведении 1:2, малоопасное вещество четвёртого класса опасности (доля жизнеспособных эксплантов 75,5% от изначально высаженных), а также фосфопаг, препарат четвёртого класса опасности (доля жизнеспособных эксплантов 65% от изначально высаженных).

8. Благоприятным сроком введения меристемы подвоев яблони в культуру *in vitro* являются фазы распускания почек (март) и интенсивного роста побегов (май – июнь).

9. Адаптацию микрорастений подвоев яблони следует начинать с момента, когда растения достигнут размера 5-10 см, а их корневая система будет состоять из нескольких хорошо развитых корешков, длиной 2-5 см в 800 мл сосудах на субстрате стабилизированный в течение суток при температуре 100 °С выщелоченный чернозём с добавлением половинного раствора солей по прописи Мурасиге-Скуга.

10. За счёт ряда модификаций, повышающих эффективность отдельных этапов клонального микроразмножения подвоев яблони и снижающих затраты на структурообразующие препараты и стимуляторы роста усовершенствованная технология в целом позволит снизить себестоимость производства оригинального посадочного материала на 235,5 руб./шт. и повысить рентабельность на 108,6 %.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ

При клональном микроразмножении подвоев яблони СК 2, СК 3, СК 4, СК 7,
ММ 106:

- 1) использовать в качестве стимулятора роста на этапах регенерации и мультипликации микропобегов фуролан в концентрации 4 мг/л;
- 2) культивировать микрорастения на первых двух этапах микроразмножения на среде, содержащей макро- и микроэлементы по прописи Мурасиге-Скуга с заменой агар-агара на картофельный крахмал;
- 3) для санации среды и эксплантов от инфекции использовать антибиотик гризеофульвин в концентрации 500 мг/л, добавлять его в среду непосредственно перед автоклавированием;
- 4) вводить меристемы подвоев яблони в культуру *in vitro* в фазы распускания почек (март) и интенсивного роста побегов (май – июнь).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абраменко, Н.М. Укоренение в нестерильных условиях побегов плодовых, размноженных *in vitro* / Н.М. Абраменко, Р.В. Стаканова, А.М. Чернец // Культура клеток растений и биотехнология: Тез. докл. науч. конф. - Кишинев: Штиица, 1983. – С. 112.
2. Авторское свидетельство 1706481 Российская Федерация Питательная среда для укоренения побегов ежевики / Упадышев М.Т., Высоцкий В.А.; заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства.- опубл. 1992, БИ № 3.
3. Авторское свидетельство 2335119 Российская Федерация МПК А01G17, А01С14. Способ адаптации *in vivo* плодовых и ягодных культур в двухслойном субстрате / Майорова Ю.А., Подорожный В.Н.; заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение Северо-Кавказский научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства. – опубл. 10.10.2008. – - 4 с.
4. Агар бактериологический / Catrosa [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://www.catrosa.ru/catalog/mikrobiologiya/210/>
5. Агафонов, Н.В. Применение регуляторов роста для укоренения, размножения и повышения продуктивности плодовых и ягодных культур / Н.В. Агафонов, З.Н. Алинтаев, К.В. Дмитриева, Л.А. Рабей, В.А. Высоцкий, Ф.Я. Поликарпова, Е.М. Устименко-Бакумовская, А.А. Борисова // Применение регуляторов роста растений в с.-х. производстве: сб. науч. трудов ЦИНАО. - М., 1985. – С. 83-94.
6. Алексеенко, Л.В. Особенности размножения нейтральнотдневных и ремонтантных сортов земляники *in vitro*: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.07/ Алексеенко Лилия Владимировна. – М., 1998. – 20 с.
7. Атлас лучших сортов плодовых и ягодных культур Краснодарского края: том 3 / Г.В. Ерёмин, Е.И. Крицкий, В.В. Яковенко, В.И. Лапшин и др.; отв.ред. В.В.

- Яковенко. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии, 2011. – 203 с.
8. Аугментин / Справочник здоровья [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: it-pharm.ru/augmentinTM.html.
 9. Бартиш, И.В. Микроклональное размножение груши (*Pyrus communis* L.) *in vitro* / И.В. Бартиш, С.М. Меркулов, В.И. Корховой, В.П. Копань // Физиология и биохимия культурных растений. - 1994.- №1. - С. 84-90.
 10. Батукаев М.С. Совершенствование технологии адаптации растений винограда *in vitro* в условиях *in vivo* / М.С. Батукаев// Вестн. ЧГУ. – 2010. – № 1. – С. 201-205.
 11. Беседина, Е.Н. Изучение эффективности новых стимуляторов роста различной природы при клональном микроразмножении подвоев яблони серии СК / Е.Н. Беседина, Л.Л. Бунцевич, М.А. Костюк // Плодоводство и ягодоводство России. - 2014. - Т. XXXIX. - С. 29-32.
 12. Беседина, Е.Н. Стимуляторы роста нового поколения и альтернативные структурообразователи питательных сред. Эффективность адаптации микрорастений подвоев яблони *ex vitro* [Электронный ресурс] / Е.Н. Беседина, Л.Л. Бунцевич, // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2015. - №35. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/15/05/17.pdf>
 13. Беседина, Е.Н. Усовершенствования технологии клонального микроразмножения подвоев яблони на этапе введения в культуру *in vitro* [Электронный ресурс] / Беседина Е.Н., Бунцевич Л.Л. // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ). – Краснодар: КубГАУ, 2015. – №07(111). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2015/07/pdf/113.pdf>
 14. Бленда, В.Ф. Фитогормональная оптимизация сред при регенерации черешни *in vitro* / В.Ф. Бленда, Ф.Л. Калинин, Е.Д. Кириленко // Культура клеток и биотехнология: Тез.науч.конф. – Кишинёв: Штиица, 1983. - С. 116.
 15. Бунцевич, Л.Л. Влияние удобрений нового поколения на адаптацию оздоровленных мериклонов земляники *ex vitro* / Л.Л. Бунцевич, Е.Н. Палецкая // Матери-

алы IV Всероссийской науч.-практ. конф. молод. учёных «Научное обеспечение агропромышленного комплекса». - Краснодар: КубГАУ, 2010. - С. 215 - 217.

16. Бунцевич, Л.Л. Вирусные и вирусоподобные болезни плодовых культур и оздоровление растений способом клонального микроразмножения *in vitro* / Л.Л.Бунцевич, М.В.Захарова, М.А.Костюк, Ю.П. Данилюк – Краснодар: научные труды. Проблемы интенсивного садоводства, 2010. – С. 191-193.

17. Бунцевич, Л.Л. Исследование эффективности антибиотиков и стерилизаторов нового поколения для подавления бактериальной и грибной контаминации среды и эксплантов [Электронный ресурс] / Л.Л. Бунцевич, М.А. Костюк, Р.С. Захарченко, Е.Н. Палецкая // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2012. - №16. – Режим доступа:<http://journal.kubansad.ru>

18. Бунцевич, Л.Л. Морфофизиологические особенности формирования урожайности яблони домашней (*Malus domestica* Borkh.) / Л.Л. Бунцевич. - Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии, 2012. -107 с.

19. Бунцевич, Л.Л. Оптимизация питательных сред при клональном микроразмножении подвоев яблони серии СК / Л.Л. Бунцевич, А.Т.Киян, Е.Н. Беседина, М.А. Костюк // Плодоводство и ягодоводство России. - 2013. - XXXVII том. - С.46-51.

20. Бунцевич, Л.Л. Совершенствование системы производства высококачественного безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур / в кн.: Разработки, формирующие современный облик садоводства: монография / Л.Л. Бунцевич, М.А. Костюк, Е.Н. Палецкая. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ. – 2011. - С. 254-275

21. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.

22. Бьядовский, И.А. Влияние спектрального состава света на развитие клоновых подвоев семечковых культур при микроразмножении / И.А. Бьядовский, М.Т. Упадышев, Е.Н. Беседина // Плодоводство и ягодоводство России. – 2013. - XXXVIII том. – С.47-54

23. Вальков, В.Ф., Штомпель Ю.А., Трубилин И.Т. и др. Почвы Краснодарского края, их использование и охрана: учебное пособие / В.Ф Вальков, Ю.А. Штомпель, И.Т. Трубилин и др. - Ростов-на-Дону: Изд-во СКНЦ ВШ, 1995. - 192 с.
24. Вердеревская, Т.Д. Получение и ускоренное размножение безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур // Т.Д. Вердеревская, Н.М. Абраменко // Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии. –1984. – № 6. – С. 26-28.
25. Верзилин, А.В. Оздоровление и клональное микроразмножение слаборослых подвоев яблони: монография / А.В. Верзилин, В. А. Минаев, А.М. Тарасов. – Мичуринск: МГПИ, 2007. – 146 с.
26. Влияние спектрального состава света на биометрические показатели растений земляники в культуре *in vitro* / Л.В. Белякова, В.А.Высоцкий, Л.В. Алексеенко // Актуальные проблемы размножения садовых культур и пути их решения: материалы Международной научно-методической дистанционной конференции – Мичуринск, 2010. – С. 39-42.
27. Вовк, В.В. Оптимизация селекционного процесса и ускоренное размножение межвидовых ремонтантных форм малины методом *in vitro*: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05/ Вовк Владимир Владимирович. – Брянск, 2000. – 20 с.
28. Волосевич, Н.Н. Оздоровление и размножение сортов малины на основе фитосанитарного мониторинга вирусов и культуры тканей *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Волосевич Наталья Николаевна. – Минск, 2011. – 18 с.
29. Восход и заход солнца, продолжительность светового дня в Краснодаре / Dateandtime.info [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://dateandtime.info/ru/citysunrisesunset.php?id=542420>
30. Выращивание растений земляники с использованием клонального микроразмножения / С.Л. Расторгуев // Экономический аспект. Мичуринские чтения «Развитие научного наследия И.В. Мичурина по генетике и селекции плодовых культур»: международная научно-практическая конференция, посвященная 155-летию со дня рождения И.В. Мичурина, – Мичуринск, 2010 – С. 268-270.

31. Высоцкий В. А. Использование методов культуры изолированных тканей и органов для оздоровления и ускоренного размножения плодовых и ягодных растений / В.А. Высоцкий // Селекция плодовых и ягодных культур: сб. науч. тр. ВАСХНИЛ Сиб. отд-ние НИИСС. – Новосибирск, 1989. – С. 132-138.
32. Высоцкий, В. А. Повышение эффективности культуры изолированных зародышей плодовых растений / В.А. Высоцкий // Материалы конф. «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». – М., 2000. – С. 148-149. 155
33. Высоцкий, В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.07 / Высоцкий Валерий Александрович. – М., 1998. – 44 с.
34. Высоцкий, В.А. Действие некоторых регуляторов роста на изолированные меристематические верхушки черной смородины / В.А. Высоцкий// Плодоводство и ягодоводство Нечерноземной зоны: сб. науч. тр. НИЗИСНП. – М., 1976. – С. 101-107.
35. Высоцкий, В.А. Клональное микроразмножение некоторых форм груши / В.А. Высоцкий // Биология культивируемых клеток и биотехнология: тез. докл. междунар. конф. – Новосибирск, – 1988. – С. 318.
36. Высоцкий, В.А. Клональное микроразмножение плодовых растений и декоративных кустарников / В.А. Высоцкий // Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и цветоводстве: сб. науч. тр. ВНИИС им. И.В. Мичурина. – Мичуринск, 1989. – С. 3-8.
37. Высоцкий, В.А. Микрклональное размножение яблони / В.А. Высоцкий, О.А. Леонтьев-Орлов // Садоводство. – 1983. – № 7. – С. 20-21.
38. Высоцкий, В.А. Морфогенез и клональное микроразмножение растений / В.А. Высоцкий // Культура клеток растений и биотехнология: сб. науч. тр. - М.: Наука, – 1986. – С. 91-102.
39. ГОСТ 54051-2010 Плодовые и ягодные культуры. Стерильные культуры и адаптированные микрорастения. Технические условия. – М.: Стандартинформ, 2011. – 11 с.

40. Гранда, Х. Р.К. Идентификация «В» вируса хризантем и создание коллекции *in vitro* оздоровленного посадочного материала: дис. ... канд. с.-х. наук: 03.00.23 / Гранда Харамильо Роберто Карлос. – М., 2009. – 105 с.
41. Гранда, Х. Р.К. Микрклональное размножение хризантем / Х.Р.К. Гранда // Изв. ТСХА. – 2009. – № 1. – С. 145- 148.
42. Гризеофульвин / Справочник здоровья [электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://it-apharm.ru/grizeofulvin.html>.
43. Гудвин, Т. Введение в биохимию растений / Т. Гудвин, Э. Мерсер. -Пер. с англ. – М.: Мир, 1986. – Т. 2. – 312 с.
44. Делан / Пестициды [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://www.pesticity.ru/pesticide/delan.html>.
45. Деримедведь, Л.В. Бады на основе янтарной кислоты. Фармакологический анализ [Электронный ресурс] / Л.В. Деримедведь, В.А. Тимченко // Журнал «Провизор». – 2002. – Вып. 13. – Режим доступа: http://www.provisor.com.ua/archive/2002/N13/art_39.html.
46. Дерфлинг, К. Гормоны растений. Системный подход / К. Дерфлинг. - Пер. с англ. - М.: Мир, 1985. – 304 с.
47. Джигадло, Е.Н. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / под ред. Е.Н. Джигадло. – Орёл: ГНУ ВНИИСПК, 2005. – 50 с.
48. Джигадло, М. И. Использование биотехнологических и биофизических методов в селекции и сорторазведении плодовых и ягодных культур: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Джигадло Михаил Иосифович. – Орёл, 2003. – 210 с.
49. Джигадло, М.И. Некоторые вопросы микрклонального размножения плодовых и ягодных культур // Пути интенсификации садоводства и селекция плодовых и ягодных культур. – Тула: Приок. кн. изд-во, 1989. – С. 129-134.
50. Диагностика вирусов семечковых и косточковых культур методами ИФА и ПЦР: метод. указания / М.Т. Упадышев, Н.Н. Мельникова, А.Д. Петрова, О.Ю. Суркова, К.В. Метлицкая, П.А. Походенко, И.И. Саунина. - М.: ВСТИСП, 2008. – 35 с.

51. Дорошенко Н.П. Особенности клонального микроразмножения сорта Крестовский. / Н.П.Дорошенко, А.С. Куприкова // Виноделие и виноградарство – 2011. – № 5. – С.32-34.
52. Дорошенко, Н.П. Биотехнология оздоровления и сохранения донских аборигенных сортов винограда / Н.П. Дорошенко, А.С. Куприкова // Генетические ресурсы и селекционное обеспечение современного виноградарства: материалы Международной научно-практической конференции. - Новочеркасск, 2011. – С.156-160.
53. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. - М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
54. Заявка 94043416/13 Российская Федерация МПК. Способ выращивания растений *in vitro* / Бабоша А.В., Шнейдер А.Ю., Фирсукова С.И.; заявитель Всероссийский НИИ картофельного хозяйства. - № 94043416/13; заявл. 08.12.1994; опубл. 27.01.1998, Бюл. А01Н4/00 – 3 с.
55. Иванова, К. Влияние БАП на развитие пазушных меристем подвоя яблони МАК 9 / К. Иванова // Биология культивируемых клеток и биотехнология: тез. докл. междуна. конф. – Новосибирск, 1988. – № 4.2. – С. 374-375.
56. Ильина, И.А. Теоретическое и экспериментальное обоснование технологии модифицированных пектинов: дис. ... д-ра техн. наук: 05.18.01/ Ильина Ирина Анатольевна. – Краснодар, 2001. – 287 с.
57. Ильина, Н.С. Основные факторы культивирования *in vitro* листовых эксплантов различных форм малины красной / Н.С. Ильина // Вестн. МичГАУ. – 2011– № 2. – 42 с.
58. Исаева, И.С. Органогенез плодовых растений / И.С. Исаева. - М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 1977. – 33 с.
59. Испытание регуляторов роста в питомниководстве плодовых и ягодных культур / Е.А. Чернышев, Т.В.Бурдейная, В.Г. Лахтин, А. А. Борисова // Промышленное производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и цветочно-декоративных культур: мат. междуна. науч.-практ.конф. – М.: ВСТИСП, 2001. – С. 142-143.

60. Калинин, Ф.Л. Технология микроклонального размножения растений / Ф.Л. Калинин, Г.П. Кушнир, В.В. Сарнацкая // Киев: Наукова Думка, –1992. – 213 с.
61. Катаева Н.В., Аветисов В.А. Клональное размножение в культуре ткани. // Культура клеток растений. М.: Наука, – 1981. – С.137-149.
62. Катаева, Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко// Наука: М. – 1983. – 96 с.
63. Катаева, Н.В. Клональное микроразмножение трудноразмножаемых сортов яблони / Н.В. Катаева // С.-х. биология. - 1986. – № 4. – С. 18-22.
64. Кефели, В. Л. Рост растений / В. Л. Кефели. - М.: Колос, 1984. - 175с.
65. Клафоран / Медицина от А до Я [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://www.piluli.kharkov.ua/drugs/drug/klaforan.html>.
66. Корнацкий, С.А. Особенности клонального микроразмножения сливы в системе производства оздоровленного посадочного материала: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.07 / Корнацкий Сергей Аркадьевич. – М., 1991. – 24 с.
67. Ксенаквин / Федеральный медицинский портал Medsovet.info [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: www.medsovet.info/herb/8003.html.
68. Кузьмина Н. Микроклональное размножение и оздоровление растений [Электронный ресурс] / Н. Кузьмина // Биотехнология. –2010. – Режим доступа: http://www.biotechnolog.ru/pcell/pcell6_1.html 11
69. Куклина, А.Г. Микроклональное размножение сортов жимолости синей / А.Г. Куклина, Е.А.Семерикова // Актуальные проблемы размножения садовых культур и пути их решения: материалы Международной научно-методической дистанционной конференции. – Мичуринск, 2010. – С. 140-143.
70. Кулаева, О.Н. Достижения и перспективы в исследованиях фитогормонов / О.Н. Кулаева, М.Х. Чайлахян // Агрехимия. Материалы XI Междунар. конф. по ростовым веществам. – 1984. – №1. –С. 106-128.
71. Кухарчик, Н.В. Научные и практические основы оздоровления от вирусов и размножения плодовых и ягодных культур in vitro: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.05 / Кухарчик Наталья Валерьевна. – Жодино, 2006. – 40 с.

72. Ланская, Л. Е. Роль экспланта сливы при введении в культуру *in vitro* / Л. Е. Ланская // Мичуринск: материалы 8 Международной научно-методической конференции «Интродукция нетрадиционных и редких растений». – 2008. – С. 211-213.
73. Лапинская, М.П. Клональное микроразмножение промышленных сортов гладиоуса: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.07/ Лапинская Мария Петровна. – М., 1998. – 19 с.
74. Леонтьев-Орлов, О.А. Особенности культивирования изолированных апексов яблони *in vitro* / О.А. Леонтьев-Орлов, В.Г. Трушечкин, В.А. Высоцкий // Плодоводство в Нечерноземной полосе: сб. науч. тр. - М., 1988. - С. 21-30.
75. Леонтьев-Орлов, О.А. Разработка клонального микроразмножения яблони: автореф. дис....канд. с.-х. наук.: 06.01.07 / Олег Анатольевич Леонтьев-Орлов – М., – 1986. – 24 с.
76. Ломовская, Л.В. Методы оздоровления и размножения перспективных форм груши *in vitro* / Л.В. Ломовская // Селекция и сортовая агротехника плодовых культур: сб. науч. тр. – Орёл, 2004. – С. 107-113.
77. Мазин В.В. Биологические пробы для обнаружения цитокининовой активности экстрактов растительных тканей / В.В. Мазин, Л.С. Шашкова // В кн.: Фитогормоны и рост растений. – М.: Наука, 1978. – С. 124-133.
78. Майорова, Ю.А. Оптимизация этапов клонального микроразмножения гибридов вишни на основе применения новых биологически активных веществ: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.01.07 / Майорова Юлия Алексеевна. – Краснодар, 2009. – 25 с.
79. Макропен / Справочник здоровья [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://it-apharm.ru/makropen.html>.
80. Матушкина, О. В. Клональное микроразмножение яблони и груши в системе производства высококачественного посадочного материала / О. В. Матушкина, И. Н. Пронина // Агро XXI. – 2009. – № 4-6. – С. 28-29.

81. Матушкина, О.В. Оптимизация процессов регенерации при размножении клоновых подвоев и сортов яблони и груши *in vitro*: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.07 / Матушкина Ольга Васильевна. – Мичуринск, 2008. – 155 с.
82. Методические рекомендации по применению искусственной культуры тканей и органов в генетико-селекционных работах с плодовыми. - Мичуринск, 1987. - 110 с.
83. Муратова, С.А. Особенности введения в культуру *in vitro* плодовых и ягодных растений / С.А.Муратова, М.Б. Янковская, Д.Г. Шорников, Н.В. Соловых, В.М. Тюленев // Плодоводство: Научные труды, Самохваловичи, 2005. – Т. 17, ч. 2. – С.182-184.
84. Муромцев, Г.С. Гиббереллины / Г.С. Муромцев, В.Н. Ангистикова. – М.: Наука, 1984. - 208 с.
85. Набиева, А.Ю. Биотехнологические приемы клонального микроразмножения перспективных сортов *Syringa vulgaris* L. для Западной Сибири / А.Ю. Набиева // Вестник ИрГСХА. – Иркутск, 2011. - Вып. 44, ч. V. - С. 69-76.
86. Нечелдева, С. Установяване на подходящи компоненти на хранителна среда през фаз пълкова пролиферация при размножаване *in vitro* на круша / Славка Нечелдева // Раснениевъд Науки, 1990. – Вып. 27, № 8. – С. 30-31.
87. Нистатин / Справочник здоровья [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://it-apharm.ru/nistatin.html>.
88. Особенности микрклонального размножения представителей рода *Iris* L. / Л.И. Тихомирова // Материалы второго Московского международного симпозиума по роду Ирис (*Iris-2011*). – М., 2011. – С. 121-127.
89. Острейко, С.А. О полифункциональности регуляторов роста и развития растений / С.А. Острейко, Э.М. Дроздовский // Сельскохозяйственная биология. - 1981. – Т. 16. – №5. – С. 702-712.
90. Палецкая, Е.Н. Оценка эффективности новых ростовых веществ при культивировании семячковых культур *in vitro* / Е.Н. Палецкая, Л.Л. Бунцевич // Материалы V Всероссийской науч.-практ. конф. молод. учёных «Научное обеспечение агропромышленного комплекса». – Краснодар: КубГАУ, 2011 – С.51-53 с.

91. Патент 2111653 Российская Федерация, МПК А01Н4/00. Питательная среда для укоренения растений *in vitro* / Упадышев М.Т., Гуськов А.В.; заявитель и патентообладатель Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства; № 96124340/13; заявл. 26.12.1996; опубл. 27.05.1998. – 3 с.
92. Патент 2141524 Российская Федерация МПК С12N5/04, А01Н4/00. Питательная среда для микроклонального размножения груши / Фартзинова И.М.; заявитель и патентообладатель Горск. гос. аграр. ун-т. – № 96116867/13; заявл. 09.08.1996; опубл. 20.11.1999, Бюл. № 32. – 5 с.
93. Патент 96116869 Российская Федерация МПК₆ А01Н4/00. Питательная среда для микроклонального размножения подвоев яблони / Фартзинова И.М.; заявитель и патентообладатель Горск. гос. аграр. ун-т. – № 96116869/13; заявл. 09.08.96; опубл. 27.05.98. – 4 с.
94. Патент 2039428 Российская Федерация МПК А01Н4/00. Питательная среда для выращивания растений *in vitro* / Упадышев М.Т.; заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства. – № 5045771/13; заявл. 02.06.1992; опубл. 20.07.1995. – 3 с.
95. Патент 2076866 Российская Федерация МПК С07D407/04, С07D407/04, С07D307:34, С07D317:08. Способ получения 2-(фурил-2) -1,3-диоксалана (фуролана) / Косулина Т.П., Кульневич В.Г., Смоляков В.П., Ненько Н.И.; заявитель и патентообладатель Кубанский государственный технологический университет. – № 94024313/04; заявл. 29.06.1994, опубл. 10.04.1997. – 3 с.
96. Патент 2222933 Российская Федерация МПК А01G7/04. Способ размножения садовых растений, выращиваемых *in vitro* / Упадышев М.Т., Бешнов Г.В., Донецких В.И., Цымбал А.А.; заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства. – заявл. 26.04.2002; опубл. 10.02.2004. – 3 с.
97. Патент 2253222 Российская Федерация МПК А01G7/04. Устройство для магнитно-импульсной обработки растений / Донецких В.И., Бешнов Г.В., Цымбал

А.А., Упадышев М.Т.; заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства. – № 2004137509/13; заявл. 29.12.2003; опубл. 10.06.2005. – Бюл. № 16. - 13 с.

98. Патент 2279209 Российская Федерация МПК А01G7/04. Способ размножения садовых культур *in vitro* / / Упадышев М.Т., Бешнов Г.В., Донецких В.И.; заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства. – № 2004137509/13; заявл. 22.12.2004; опубл. 10.07.2006. – Бюл. № 17. - 4 с.

99. Патент 2523305. Российская Федерация. Способ микрклонального размножения подвоев яблони / Л.Л. Бунцевич, Е.Н. Палецкая, М.А. Костюк, М.В. Макаркина, Н.И. Ненько; заявители и патентообладатели Государственное научное учреждение Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства Россельхозакадемии, RU, Общество с ограниченной ответственностью Малое инновационное предприятие «Здоровый сад». - № 2013107907 / 10; заявл. 21.02.2013; опубл. 09.04.2014, Бюл. № 4. – 4 с.

100. Патент 2557387. Российская Федерация МПК А01Н4/00. Способ клонального микроразмножения и оздоровления подвоев яблони *in vitro* с использованием антибиотика гризеофульвин / Л.Л. Бунцевич, Е.Н. Беседина, М.А. Костюк, М.В. Макаркина; заявители и патентообладатели Государственное научное учреждение Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства Россельхозакадемии, Общество с ограниченной ответственностью Малое инновационное предприятие «Здоровый сад», Общество с ограниченной ответственностью Малое инновационное предприятие «Деметра» ». - № 2014124424; заявл. 16.06.2014; опубл. 05.05.2015, Бюл. № 4. – 3 с.

101. Патент 470516 СССР МПК С07D 5/06. Способ получения кротонолактона / Бадовская Л.А., Музыченко Г.Ф., Абрамянц С.В. Кульневич В.Г., Латашко В.М.; заявитель и патентообладатель Краснодарский политехн. ин-т. – № 1960756; заявл. 17.09.1973, опубл. 15.05.1975, Бюл. № 18 – 2 с.

102. Плаксина Т.В. Приемы адаптации растений-регенерантов к условиям *ex vitro* / Т.В. Плаксина // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2011. – № 2. – С. 43-48.
103. Полевой, В.В. Фитогормоны / В.В. Полевой. - Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. – 248 с.
104. Попов, Ю.Г. Культура *in vitro* меристематических верхушек стебля как метод оздоровления и размножения растений / Ю.Г. Попов // Биологические науки. – 1976. – № 6. – С. 13-24.
105. Проблемы и пути развития питомниководства плодовых культур в Краснодарском крае / Л.Л. Бунцевич, А.Т. Киян, Е.Л. Тыщенко, Н.Н. Сергеева, М.А. Костюк // Научный журнал КубГАУ. – 2013. - №93(09) – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/archive.asp?n=93>
106. Пронина, И.Н. Оптимизация процесса ризогенеза подвоев и сортов яблони и груши *in vitro*: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.07 / Пронина Ирина Николаевна. – Мичуринск. – 2008. – 158 с.
107. Пугачёв, Р.М. Особенности размножения растений рода *Prunus* L. в культуре *in vitro*: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Роман Михайлович Пугачёв. – Горки, 2003. – 18 с.
108. Радилова, Л.Д. Видовые и сортовые особенности ризогенеза плодовых и ягодных в культуре тканей / Л.Д. Радилова, В.С. Бленда // Проблемы интенсификации современного садоводства: тез. докл. ВНИИС им. И.В. Мичурина. - Мичуринск, – 1990. – С.159-160.
109. Райков, И.А. Совершенствование клонального микроразмножения межвидовых форм смородины чёрной и малины ремонтантного типа: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Райков Игорь Александрович. – Брянск, 2012 – 19 с.
110. Ребров А.М. Применение эмистима при адаптации к нестерильным условиям. / А.М. Ребров // Генетические ресурсы и селекционное обеспечение современного виноградарства: материалы Международной научно-практической конференции. – Новочеркасск, 2011. – С. 176-180. 4
111. Рекомендации по выращиванию безвирусного посадочного материала плодово-ягодных культур и винограда. - М.: Колос. – 1980. – 37 с.

112. Рункова, Л.В. Действие цитокининов на декоративные растения / Л.В. Рункова // Стимуляторы и ингибиторы ростовых процессов. - М.: Наука, 1988. – С. 110-123.
113. Сидоренко Т.Н. Адаптация регенерантов малины красной *ex vitro*./ Т.Н. Сидоренко// Актуальные проблемы размножения садовых культур и пути их решения: материалы Международной научно-методической дистанционной конференции. - Мичуринск, 2010. – С. 251-257.
114. Скор / Мир растений (энциклопедия ухода за растениями) [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://www.floralworld.ru/fungicid/skor.html>.
115. Соловых Н.В. Клональное размножение ягодных культур *in vitro* / Н.В. Соловых, С.А. Муратова, М.Б. Янковская // Актуальные проблемы размножения садовых культур и пути их решения: материалы Международной научно-методической дистанционной конференции. – Мичуринск, 2010. – С. 280-295.
116. Соловых, Н.В. Индукция морфогенеза из соматических тканей растений рода *Rubus* / Соловых Н.В., Муратова С.А. – Вестн. МичГАУ, 2010. – №2. – С. 104-110.
117. Соловых, Н.В. Размножение *in vitro* нетрадиционных ягодных культур / Н.В.Соловых, С.А.Муратова, М.Б.Янковская // Интродукция нетрадиционных и редких растений: материалы Международной научно-методической конференции. - Мичуринск-наукоград, 2010. – Т.1 – С. 157-161.
118. Стаканова, Р.В. Ускорение размножения подвоев яблони в асептических условиях / Р.В. Стаканова, Н.М. Абраменко // Садоводство и виноделие Молдавии. – 1984. – № 6. – С. 29-31.
119. Сукцинаты натрия, калия и кальция / Товароведение и экспертиза товаров [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.znaytovar.ru/new3140.html>.
171
120. Тетрациклин / Википедия [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Тетрациклин.html>.
121. Технологический процесс получения безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур: методические указания / под общ. ред. В.И. Каши-

на. – М.: Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, 2001. – 107с.

122. Туровская, Н.И. Микроразмножение яблони и груши / Н.И. Туровская // Садоводство и виноградарство. – 1994. – № 1. – С. 10-12.

123. Туровская, Н.И. Особенности регенерации апикальной меристемы клоновых подвоев яблони / Н.И. Туровская // Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и цветоводстве: Сб. науч. тр. ВНИИС им. И.В. Мичурина. – Мичуринск, 1989. – С. 13-17.

124. Указания по опытно-производственному применению кротонолактона, 35,0% в.р. на кукурузе. - М.: Агропромиздат, 1983. – 4 с.

125. Указания по опытно-производственному применению янтарной кислоты на сахарной свекле. - М.: ВАСХНИЛ, 1988. – 4 с.

126. «Универсальный» и «Кавказ» - стимуляторы роста нового поколения [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://delaem.com.ua/univers-stimul-rosta.html>.

127. Упадышев, М.Т. Вирусные болезни и современные методы оздоровления плодовых и ягодных культур: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.07 / Упадышев Михаил Тарьевич. – М., 2011. – 46 с.

128. Фосфопаг / Дезреестр [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа: <http://www.dezreestr.ru/pages/dezpgs/Phsphd.html>.

129. Фосфопаг / Экоsmart [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа: http://www.biopag.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=67&Itemid=176.html.

130. Хромова, Л.М. Влияние регуляторов роста на морфогенез в культуре апикальной меристемы / Л.М. Хромова, Л.Н., Трофимец, В.А. Князев // Защита картофеля от вирусных болезней в семеноводстве: науч. тр. – 1977. – Вып. XXX. – С. 19-25.

131. Цефепим / Справочник здоровья [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: it-apharm.ru/tsefepim.html.

132. Цефотаксим / Википедия [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Цефотаксим.html>.

133. Чайлахян, М.Х. Регуляторы роста в жизни растений и в практике сельского хозяйства / М.Х. Чайлахян / Вестник АН СССР. –1982. – № 1 – С. 11-26.
134. Челябин, Д.Н. Регенерационный потенциал элитных форм малины в культуре *in vitro*: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Челябин Дмитрий Николаевич. – Брянск, 2012 – 22 с.
135. Шевелуха, В.С. Сельскохозяйственная биотехнология: Учебник / С. Шевелуха, Е.А.Калашникова, С.В. Дегтярев и др.; под ред. В.С. Шевелухи. - М.: Высш. шк., 1998. – 416 с.
136. Шорников, Д.Г. Совершенствование технологии размножения редких садовых растений в культуре *in vitro* и оценка их потенциала устойчивости к абиотическим стрессорам: диссертация канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Шорников Денис Геннадьевич. – Мичуринск. – 2008. – 192 с.
137. Экономическая эффективность выращивания земляники с использованием биотехнологических приемов / Н.А. Беликова, Л.В. Беякова, В.А. Высоцкий, Л.В. Алексеенко // Садовод. и виноградар. – 2011 – № 5. – С. 45-48.
138. Эупарен / Виноград [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://vinograd.info/spravka/himikaty-i-ydobreniya/euparen.html>.
139. Яндекс / Словари [Электронный ресурс]. – БСЭ, 1969-1978. – Режим доступа: <http://slovari.yandex.ru/.html>.
140. 6-Benzylaminopurine / Sigma-Aldrich [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b3408?lang=en®ion=RU>
209
141. A liquid culture system for shoot proliferation and analysis of pharmaceutically active constituents of *Catharanthus roseus* (L.) / G. Don. Pati Pratap Kumar, Kaur Jaspreet, Singh Pritica // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. - 2011. – V. 105, №3. – P. 299-307.
142. An engineering view to micropropagation and generation of true to type and pathogen-free plants. / Eli Khayat. Rahan Meristem Ltd. // Plant Biotechnology and Agriculture: Prospects for the 21st Century. – Israel – 2012 – P. 229-238.

143. Ancora, G. Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid in vitro micropropagation / G. Ancora, M.L. Belli-Donini, L.Cuozzo // *Sci. Hortic.* – 1981. – № 14. – P. 207-213.
144. Arena Miriam, E. Factores and afectan la multiplication in vitro de los brotes de portainjertos de Prunus / E. Arena Miriam, H. Caso Osvaldo // *Fyton.* – 1992. –V. 53, № 1. –P. 29-39.
145. Belmares, F.A. In vitro shoot proliferation of MM 106 apple and Marianna 26-24 plum / F.A. Belmares, M.A. Bustamante // *Hort. Sci.* – 1987. – V. 22, №5. –P. 11-12.
146. Borkowska, B. Activity of thidiazuron in in vitro shoot cultures of Prunus sp. and Morus alba / B. Borkowska, W. Litwinczuk // *Biol. Plantarum.* – 1993. – V.35. – №1. – P. 63-67.
147. Boxus, P. Large-scale propagation of strawberry plants from tissue culture / P.Boxus, M. Quorin, J. M. Laine // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* – 1977. – V. 108. – P.130-138.
148. Callus induction and embryo regeneration in Coffea arabica L. anthers by silver nitrate and ethylene / A.S. Silva, J.M. Queiroz Luz, T.M. Rodrigues, C.A. Bittar, L. de O. Lino, // *Revista Ciência Agronômica* - 2011. – V. 43, № 4. – P. 921-929.
149. Casas, A. Multiplication «in vitro» en remolacha azucarera (Beta vulgaris L.) Tipo de explante y sistema de estericion / A. Casas, J.M. Lasa // *An. Etac. exp. Aula Dei.* – 1986. –V. 18, № 1-2. – P. 51-56.
150. Cheng, T.Y. Micropropagation of fruit tree rootstocks – Proc of the conference on Nursery Production of fruit plants through tussie culture / T.Y. Cheng // *Applicat and Feasibility.* - 1980. – V. 11. – P. 53
151. Chong, C. Carbon nutrition of Ottawa-3 apple rootstock during stages of in vitro propagation / C. Chong, E. Pya // *J. Hortic. Sc.* – 1985. – V. 60, № 3. – P. 285-290.
152. Duarte de Oliveira, P. P. Controle de oxidacao no cultivo in vitro de embrioes de estrelfcia (Strelitzia reginae) / P.P. Duarte de Oliveira, P. Renato, P. Moacir. // *Rev. bras. horticult. orn.* - 2007. - V. 13, № 2. - P. 107-112.

153. Dunstan, D.I. Propagation in vitro of the apple rootstock M4: effect of phytohormones on shoot quality / D.I. Dunstan, K.E. Turner, W.R. Lazaroff // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. – 1985. – V. 4. – P. 55-60.
154. Effect of the photoperiod duration on the growth of *Chrysanthemum* plantlets in vitro / Anželika Kurilčik, Stasė Dapkūnienė, Genadij Kurilčik, Silva Žilinskaitė, Artūras Žukauskas, Pavelas Duchovskis // *Sodininkystė ir Daržininkystė*. – 2009. – V. 28, № 2. – P. 147-152.
155. Einset, J.W. Cytokinin consumption by micropropagated shoots / J.W. Einset // *Comb. Proc: Intern Plant Propagators Soc.* – 1987. – V. 36. – P. 635-640.
156. Embree, C.G. Field performance and micropropagation of a hardy apple rootstock candidate KSC-3 / C.G. Embree, G.S. Hicks // *Canadian Journal of Plant Science*. – 1985. – V. 65, № 2. – P. 459-464.
157. Emershad R.L. Effects of media on embryo enlargement, germination and plant development in early-ripening genotypes of *Prunus* grown in vitro / R.L. Emershad, D.W. Ramming // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* - 1994. - Vol.37. - № 1. - P.55-59.
158. Fiorino, P. Propagation of fruit trees by tissue culture in Italy / P. Fiorino, F. Loreti // *Hort. Science*. – 1987. – V. 22. – P. 353-358.
159. Fiorino, P. Propagation of apple cultivars / P. Fiorino // *Acta Hort.* – 1983. – V. 131. – P. 95-100.
160. Fira, A. In vitro rooting and ex-vitro acclimation in apple (*Malus domestica*) / A. Fira, D. Clapa, C. Plopa. // *Cluj Napoca: Bul. Univ. Agr. Sci. and Vet. Med.* – 2010. V. 67. – № 1. – P. 480.
161. Fira, A. New aspects regarding the micropropagation of blackberry cultivar "Thornless evergreen" / A. Fira, D. Clapa, C. Plopa // *Cluj Napoca: Bul. Univ. Agr. Sci. and Vet. Med.* – 2010. – V.67, № 1. – P. 106-114.
162. Franc P. The effect of auxins and their cofactors in vitro // *Zahradnictvi*. – 1998. – R. 25. – P. 41-46.
163. Gamborg, O.L. The effect of amino acids ammonium of the growth of plant cells in suspens culture / O.L. Gamborg // *Plant Physiol.* – 1975. – V.45. – P.372-375.

164. Gibberellic acid / Sigma-Aldrich [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g7645?lang=en®ion=RU>
210
165. Gow Wee-Peng. Enhancement of direct somatic embryogenesis and plantlet growth from leaf explants of *Phalaenopsis* by adjusting culture period and explant length / Wee-Peng Gow, Jen-Tsung Chen, Wei-Chin Chang Gow Wee-Peng, // *Acta Physiologiae Plantarum*. - 2010. – V. 32, № 4. – P. 621-627.
166. Hammerschlag F.A., Bauchan G., Scorza R. Regeneration of peach plants from immature embryos / F.A. Hammerschlag, G. Bauchan, R. Scorza // *Theoret. and Applied Genetics*. – 1985. – V. 70. – №3, 1. – P. 248-251.
167. High efficiency in vitro plant regeneration from epicotyl explants of Ponkan Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) / Zeng Lihui, Xu Haifeng, Zeng Yunqi, Luan Aiye, Wang Huiquang // *In Vitro Cell and Dev. Biol. Plant*. – 2009. – V. 45, № 5. – P. 559-564.
168. Indole-3-butyric acid / Sigma-Aldrich [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=Product+Name&term=Indole-3-butyric+acid&N=0&focus=product&lang=en®ion=global>
169. Influence of a cytokinin and antibiotics on regeneration of various *Aronia melanocarpa*'s plantlets in vitro. D. Gelvonauskiene, J. Vinskiene, T. Siksnianas, V. Bendokas, I. Stepulaitiene, G. Staniene, V. Stanys // *Sodinikyste ir Darzinikyste*. – 2009. – V.28, №2. - P. 47-54.
170. Influencia de fontes de potassio na multiplicacao in vitro de crisantemo / C. Santos Fldlvia, P. Junqueira Keize, V. Fabzola, P. Moacir, A. de Figueiredo Milene, R. Vantuil Antonio. // *Univ. fed. Vigosa. Rev. ceres*. - 2008. – V. 55, № 6. - P. 532-536.
171. Involvement of polyamines in the adventitious rooting of micropropagated shoots of the apple rootstock MM 106 / S. Naija, N. Elloumi, S. Ammar, C. Kevers, J. Dommes // *In Vitro Cell and Dev. Biol. Plant*. – 2009. –V. 45, № 1. – P. 83-91.
172. James, D.J. Shoot and root initiation in vitro in the apple rootstock M 9 and the promotive effects of phloroglucinol / D.J. James, I.J. Thurbon // *J. Hort. Sci*. – 1981. – V. 56, № 1. – P. 15-20.

173. Jones, O.P. Propagation in vitro of five apple scion cultivars / O.P.Jones, C.A. Pontikis, M.E. Hopgood // Hort. Sci. – 1979. –V. 54, № 2. – P. 155-158.
174. Júnior, Donato Seidel. Ex vitro acclimatization of *Cattleya forbesii* and *Laelia purpurata* seedlings in a selection of substrates / Donato Seidel Júnior; Giorgini Augusto Venturieri // Acta sci.Agron. – 2011. – V. 33, №1. – P. 97-103.
175. Kanchanapoom K. Influence of plantlets' type and orientation in vitro of banana *Musa balbisana* "Kluai Hin" (BBB group) / K. Kanchanapoom, N. Promsorn. // Notulae sci.biol. - 2011. – V.3, № 3. – P. 89-92.
176. Kaul, R. Morphogenetic studies on *Haworthia*: effectis of inositol on growth and differentiation. / R. Kaul, P.S. Sabharwai // Amer. J. Bot. – 1975. – V. 62, № 6. – P. 655-659.
177. Laimer, M. In vitro Kultur zur Virusfreimachung alter Apfelsorten / M. Laimer, A. da Camara Machado, V. Hanzer, H. Weiss, D. Mattanovich, G. Himmler, H. Katinger // Mitt. Klosterneuburg. – 1988. – V. 38, №6. – P. 247-249.
178. Lane, W.D. Shoot tissue culture of apple: comparative response on five cultivars to cytokinin and auxin / W.D. Lane, J. M. McDougald // Can. J. Plant Sci. – 1982. – V. 62(3). – P. 689-694.
179. Luo, Ya. Guoshu xuebao / Ya Luo, Haoru Tang, Xiumei Li // J. Fruit Sci. – 2005. – V. 22, № 1. – P. 66-68.
180. Machnik, B. In vitro propagation of P22 *Malus* Clonal rootstock / B. Machnik, T. Orlikowska // Fruit Sci. Repts. – 1981. – V. 8, № 4. – P. 173-177.
181. Machnik, B. Porównanie jakości podklader czereśni i jabłoni z kultur tkankowych w zależności od sposobu ich uprawy / B. Machnik, Z.S. Grzyb // Prace Inst. Sadown. Kwiac. Skierniewice. –1994. – V. 31. – P. 119-122.
182. Magyar-Tabori, K. Effect of cytokinin content of the regeneration media on in vitro rooting ability of adventitious apple shoots. / K. Magyar-Tabori, J. Dobranszki, I. Hudak // Scientia Horticulturae. – 2011. – № 129. – P. 910-913.
183. Messina, R. Influence of paclobutrasol on in vitro rooting of kiwifruit explants / R. Messina, G. Costa // Adv. Hort. Science. – 1990. - № 2. – P.90-92.

184. Micropropagação de violeta africana / Stancato Giulio Cesare, Simões Néri, Fernanda Cristina, Reis Tavares Armando // Revista brasileira de horticulura ornamental. – 2009. – V. 15, № 2. – P. 165-170.
185. Micropropagacion *Costus speciosus* (Koen.) Sm. using nodal segment culture / Punyarani Kshctrimayum, Sharma G.Jitendra // Not.sci.biol. – 2010. – № 1 – P. 58-62.
186. Micropropagation and ex vitro rooting of pistachio (*Pistacia vera* L.) / Benamar Benmahioul, Noëlle Dorion, Meriem Kaid-Harche, Florence Daguin // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 2012. – V. 108, №2. – P. 353-358.
187. Micropropagation of *Passiflora setacea* DC / C. S. Flavia, D. R. Jose, P. Moacir, C. de R. Juliana, C. S. Fabiola, V. Fabiola // Rev. ceres. Univ.fed.Vicosa. – 2010. – V.57, №1. – P. 112-117.
188. Micropropagation of *Valeriana officinalis* by tissue culture / Zayova Ely, Vassilevska-Ivanova Roumiana, Petrova Maria, Nedev Trendafil. - Report of Bulg. Sci. Acad. - 2010. – V. 63, № 12. - P. 1749-1756.
189. Muleo, R. Light quality regulates shoot cluster growth and development of MM106 apple genotype in in vitro culture / [Электронный ресурс] / R. Muleo, S. Morini // Scientia Horticulturae. – 2006. – № 108. - Режим доступа: www.elsevier.com/locate/scihorti.html
190. Muleo, R. Physiological dissection of blue and red light regulation of apical dominance and branching in M9 apple rootstock growing in vitro / [Электронный ресурс] / R. Muleo, S. Morini // Journal of Plant Physiology. – 2008. – № 165. - Режим доступа: www.elsevier.de/jplph.html
191. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol Plant. – 1962. – V. 15, № 95. – P. 473-497.
192. Naor, Vered. The effect of the orientation of stem segments of grapevine (*Vitis vinifera*) cv. Chardonnay on callus development in vitro / Vered Naor, Meira Ziv, Tirtza Zahavi // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 2011. – V. 106 (2). – P. 353-358.

193. Nas M. N. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts / M. N. Nas, P. E. Read. – *Scientia-Horticulturiacea*, 2004. – V.101 – P. 189-200.
194. Nieuwkerk, J.P. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation in vitro / J.P.Nieuwkerk, R.H. Zimmerman, I.Fordham // *Hort.Sci.* – 1986. – V.21, № 3. – P. 516-518.
195. Nitsch, J.P. Haploid plants from pollen grains / J.P. Nitsch, C. Nitsch // *Sciencel.* – 1969. – V. 163, № 3842. – P. 587-589.
196. Pua, E.C. In vitro propagation of Ottawa -3 apple rootstock / E.C. Pua, Calvin Chohg, G.L. Rousselle // *Can. J. Plant. Sci.* – 1983. – V. 63, № 1. – P. 183- 188. 51
197. Raquel P. da S. Sucrose concentration during in vitro rooting and ex vitro acclimatization of microplants from root escapes of grapes R110 (*Vitis rupestris* x *Vitis berlandieri*) / P. da S. Raquel, V. Monter Angel. // *Interciencia.* – 2009. – V.34, № 12, P. 897-902.
198. Ravindra B. Malabadi. Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot tip sections / Ravindra B. Malabadi, Gangadhar S. Mulgund, Nataraja Kallappa // *Journal of Plant Physiology.* – 2005. –V. 162, № 4. – P. 473-478.
199. Response of in vitro strawberry to antibiotics / Y.H. Qin, Jaime A. Teixeira da Silva, J.H. Bi, S.L. Zhang, G.B. Bu // *Plant Growth Regulation.* – 2011. – V.65 – № 1. – P.183-193.
200. Rooting and ex vitro acclimatization in hydroculture by floatation of some blackberry genotypes // Clapa D., Fira Al., Dumitras Ad., Ciorchina N. // *Rev.Bot.* – 2011. – V.3, № 3, – P. 133-139.
201. Shen, X. S. Propagation in vitro of pear, *Pyrus communis* L., cultivars «William's Bon Chretien», «Packham's Triumph» and «Beurre Bosc» / X. S. Shen, M. G. Mullins // *Sci. Hortic.* –1984. - V. 23. –P. 51–57
202. Singha, S. Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during in vitro shoot proliferation of crab apple and pear / S. Singha, G.H. Oberley, E.C. Townsend // *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* –1987. –V. 11, № 3. –P. 209-220. 94

203. Singha, S. In vitro propagation of Crab apple cultivars / S. Singha // Hort. Sci. – 1982. – V. 17, № 2. – P. 191-192.
204. Sriskandarajah, S. Micropropagation of apple scion cultivars / S. Sriskandarajah, M.G. Mullins // Comb. Proc: Intun Plant Propagators Soc. – 1982. –V. 31. – P. 209-213.
205. Szczygieł Krystyna Mikrorozmnażanie wisienki stepowej (*Cerasus fruticosa* Pallas) / Krystyna Szczygieł, Tomasz Wojda // Lesne Prace Badawcze. – 2010. – V. 71, № 4, – P. 351-355.
206. Vences-Contreras, C. Regeneración in vitro de once cultivares de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* tzvelev) a partir de meristemos apicales / C. Vences-Contreras, L. M. Vázquez-García,; O. A. Hernández-Rodríguez // Agron. mesoamer. – 2009. – V. 20, № 2 – P. 409-415.
207. Viligas, A.N. Aplicacion del cultivo de tejidos en la obtencion de plantas libres de patogenos/ A.N. Viligas, F.P. Barrientos, F.P. Jose, M. Mijia// Symp. Nacional de Parasitologia. – 1983. – P. 295-300.
208. Walkey, D. Production of apple plantiets from axillarybud meristems / D.Walkey // Canad. J. Plant Sci. – 1972. V. 72, № 6 – P. 1085-1087.
209. Wang, L.P. Distribution of apple stem grooving virus and apple chlorotic leaf spot virus in infected in vitro pear shoots / L.P. Wang, N. Hong , G.P. Wang, W.X. Xu, R. Michelutti, A.M. Wang // Crop protection. – 2010. – 29 (12). – P. 1447-1451
210. Watanabe, K. The growth promoting effect of phytic aid on callus tissue of rice seed / K. Watanabe, K. Tanaka, K. Asada, Z. Kasai // Plant and Cell Physiol. – 1971. – V. 12, № 1. – P. 161-163.
211. Werner, E. In vitro propagation of Malling 7 apple rootstock / E.Werner, A. Boc // Hort.Sci. – 1980. – V.15, № 4. – p. 509-510.
212. White, Ph., R. The cultivation of animal and plant cells / Ph. R. White. - New York, 1954. – 239 p.
213. Zimmerman, R.H. Explant orientation affuts axillary shoot proliferation of apple cutivars in vitro / R. H. Zimmerman, I. Fordham // Hot. Sci. – 1989. – № 2. – P. 251-252.

214. Zimmerman, R.H. Fruit plants micropropagation at Beltsville Fruit Laboratory and in North America / R.H. Zimmerman // Rev. Ortoflorofruit. I.t. – 1980. – V. 64, № 3. – P. 241-256.

215. Zou Ying-Ning Micropropagation of Chinese plum (*Prunus salicina* Lindl.) using mature stem segments / Ying-Ning Zou. - Cluj-Napoca: Not. bot. horti agrobot., 2010. – V. 38, № 3. – P. 214-218.

ПРИЛОЖЕНИЯ



Акт внедрения

результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ Северо-Кавказским зональным НИИ садоводства и виноградарства

Заказчик: ООО «ОПХ им. К.А. Тимирязева», директор Егоров Виктор Николаевич
 (наименование организации, ф., и., о., руководителя организации)

Настоящим актом подтверждается, что результаты работы «Оздоровленные подвои категории «Оригинальные» СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106», полученные методом клонального микро-размножения

(наименование темы)

выполненной: в ФГБНУ СКЗНИИСиВ, лаборатория вирусологии
 (лаборатория)

стоимостью: 47 сорок семь (тыс. руб.)

(цифрами и прописью)

выполняемой в срок с 1.01.2010 г. по 31.12.2014

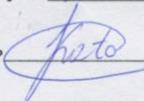
внедрены в питомниковоходческой бригаде

(наименование подразделений предприятия, где проходило внедрение)

1. Вид внедренных результатов: оздоровленные подвои категории «Оригинальные» СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106, полученные методом клонального микроразмножения (технологии, машины, эксплуатация изделий, функционирование систем)
2. Характеристика масштаба внедрения: 500 шт., системное
 (объем внедрения, единичное, серийное)
3. Форма внедрения, методика: оздоровленный посадочный материал категории «Оригинальный»
4. Новизна результатов НИР: качественно новый вид посадочного материала подвоев яблони (принципиально новые, качественно новые, модификация старых разработок)
5. Опытно-производственная проверка: 1.01.2010 - 31.12.2014 г., ООО «ОПХ им. К.А. Тимирязева»
 (указать дату испытаний, наименование предприятия, где проходило испытание)
6. Внедрены в производство: производство посадочного материала яблони
 (процесс)
7. Годовой экономический эффект:
 - ожидаемый: 52000 пятьдесят две тысячи рублей /га
 (от внедрения в проект)
 - фактический: 42000 сорок две тысячи рублей /га
 - в т. ч. долевое участие науки и производства: 50% (21000 двадцать одна тысяча рублей/га) наука / 50% (21000 двадцать одна тысяча рублей/га) производство
 (в процентах, цифрами и прописью)
8. Удельная экономическая эффективность внедренных результатов: рентабельность продукции 49,1%.
9. Объем внедрения: 500 шт.
10. Социальный и научно-технический эффект: улучшение условий труда (охрана окружающей среды, улучшение и оздоровление условий труда и т.д.)

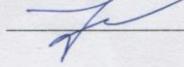
От НИИ

Зав. лабораторией  к.б.н. Бунцевич Л.Л.

Исполнитель  Беседина Е.Н.

От предприятия

Ответств. за внедрение, гл. агроном

 Федоренко А.М.