

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРИКЛАДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ**

На правах рукописи
У.Д.К.:634.10:581.143.6 (478,9)

ГЕНДОВ НАТАЛЬЯ

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ РАЙОНИРОВАННЫХ И
ПЕРСПЕКТИВНЫХ В РЕСПУБЛИКЕ МОЛДОВА
КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ СЕМЕЧКОВЫХ КУЛЬТУР**

411.06 - ПЛОДОВОДСТВО

**Автореферат диссертации на соискание учёной степени
доктора сельскохозяйственных наук**

КИШИНЭУ, 2025

Работа выполнена в лаборатории Вирусологии и Фитосанитарного контроля Научно-Практического Института Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий (НПИСВПТ), в настоящее время Национальный Институт Прикладных Исследований в области Сельского Хозяйства и Ветеринарной Медицины (НИПИСХВМ).

Научный руководитель:

РАПЧА Михаил, доктор хабилитат сельскохозяйственных наук, профессор исследователь, НПИСВПТ.

Научный консультант:

ДОНИКА Илья, доктор хабилитат сельскохозяйственных наук, профессор исследователь, НПИСВПТ.

Официальные оппоненты:

ПЫНТЯ Мария, доктор хабилитат биологических наук, доцент исследователь, НИПИСХВМ.

МАНЗЮК Валерий, доктор сельскохозяйственных наук, доцент, ТУМ.

Специализированный Учёный Совет утверждён Национальным Агентством по Обеспечению Качества в Образовании и Исследовании решением N. 1 от 15 ноября 2024 в следующем составе:

БАЛАН Валериан, доктор хабилитат сельскохозяйственных наук, профессор, ТУМ, **председатель.**

ПЕШТЯНУ Анание, доктор сельскохозяйственных наук, доцент, ТУМ, **секретарь.**

ДАДУ Константин, доктор хабилитат сельскохозяйственных наук, профессор исследователь, НПИСВПТ, **член.**

САВА Парасковья, доктор хабилитат сельскохозяйственных наук, доцент исследователь, НИПИСХВМ, **член.**

ПОПА Сержиу, доктор сельскохозяйственных наук, доцент, ТУМ, **член.**

Защита состоится 19 июня 2025 г. в 10⁰⁰ на заседании Специализированного Учёного Совета N. D 411.06-24-119 в Техническом Университете Молдовы: MD 2049, г. Кишинёв, ул. Мирчешть 48, блок 14А, аудитория 201, Департамент Плодоовощеводства и Лесоводства, тел.:(+373 22) 432 304, факс: (+373 22) 312265. С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Технического Университета Молдовы, а также на сайте <https://www.anaces.md/>

Автореферат разослан 13мая 2025 г.

Научный руководитель: РАПЧА Михаил,
доктор хабилитат сельскохозяйственных наук,
профессор исследователь.

Научный консультант: ДОНИКА Илья,
доктор хабилитат сельскохозяйственных наук,
профессор исследователь.

Учёный секретарь Специализированного Учёного Совета:
ПЕШТЯНУ Анание, доктор сельскохозяйственных наук,
доцент.

Автор: ГЕНДОВ Наталья



СОДЕРЖАНИЕ:

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ	4
1. АНАЛИЗ СИТУАЦИИ В ОБЛАСТИ РАЗВИТИЯ МЕТОДОВ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ	6
2. ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ И МЕТОДЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	7
2.1. Объекты и условия проведения исследований	7
2.2. Методы научных исследований	7
3. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ПОДВОЕВ СЕМЕЧКОВЫХ КУЛЬТУР	9
3.1. Введение эксплантов в культуру <i>in vitro</i>	9
3.2. Микроклональное размножение подвоев семечковых культур	12
3.3. Укоренение подвоев семечковых культур в условиях <i>in vitro</i>	17
3.4. Акклиматизация растений в условиях <i>ex vitro</i>	20
4. ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МАТОЧНИКА КЛОНОВОГО ПОДВОЯ ЯБЛОНИ ММ106	24
ВЫВОДЫ	25
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	26
ИЗБРАННАЯ БИБЛИОГРАФИЯ	27
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ НА ТЕМУ ДИССЕРТАЦИИ	28
АННОТАЦИЯ (на румынском, русском, английском языках)	30

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Актуальность и значимость темы исследований. Интенсификация отрасли плодоводства требует создания мощной базы безвирусных оригинальных маточников клоновых подвоев и перевод питомниководства на выращивание сертифицированного посадочного материала [3; 8; 10; 25]. Сады, заложенные таким материалом, могут максимально реализовать генетический потенциал - обладают долговечностью и повышенной продуктивностью, в пределах 20 - 30 %, по сравнению с обычными насаждениями [8]. В Молдове производится мало посадочного материала высокой категории качества. Для большинства плодовых пород местное производство не превышает уровня рядового материала. Этим упускается возможность для развития национальной экономики, увеличиваются фитосанитарные риски с импортом посадочного материала [2; 11; 14; 24].

Развитие питомниководства Молдовы и оперативное расширение производства высококачественного посадочного материала является первостепенной необходимостью [13]. Мощным инструментом для этого является использование микроклонального размножения растений, что служит основой нашей научной работы.

Во многих регионах мира важными промышленными культурами являются яблоня и груша. В Молдове плантации этих пород ежегодно сокращаются. Фактором, ограничивающим распространение этих пород в нашей стране, является недостаточное местное производство качественного подвойного материала, а также отсутствие широкого ассортимента вегетативных подвоев груши. Изложенное указывает на существование ключевой проблемы, требующей разрешения, и определяет необходимость внедрения в производство новых биотипов, перспективных для эколого - географической зоны нашей страны.

В процессе работ по изучению хозяйственно - биологических свойств новых подвойных форм, проводимых в отделе питомниководства Научно - Исследовательского Института Плодоводства, были выделены перспективные биотипы яблони и груши, которые, наряду с районированным подвоем яблони ММ106, послужили основой для разработки технологии микроклонального размножения - подвой яблони 54 - 118, подвой для груши - Sydo и Pygiam. Выбор в пользу этих биотипов обоснован рядом ценных признаков - хорошей совместимостью с сортами, устойчивостью к карбонатам почвы, толерантностью к бактериальному ожогу [12; 28].

Технологии ускоренного микроразмножения находят широкое применение в производстве посадочного материала. Высокий коэффициент размножения растений в условиях *in vitro* и возможность проведения работ круглый год позволяют в короткие сроки с оптимальными затратами размножить посадочный материал до необходимого количества и покрыть возникший производственный дефицит, что сегодня крайне необходимо [8; 15]. Метод позволяет быстро вывести на рынок новые биотипы и сорта растений,

соответствующие международным фитосанитарным и торговым стандартам [7; 9]. Перечисленное определило направление проведённых исследований.

Цель работы состоит в разработке технологии микроклонального размножения районированных и перспективных подвоев семечковых культур для внедрения и использования её в качестве инструмента для ускоренного размножения высококачественного посадочного материала яблони и груши.

Задачи исследований:

1. разработать приёмы получения асептической культуры и условия регенерации стерильных эксплантов;
2. оптимизировать состав питательной среды для инициации эксплантов в культуру *in vitro* и микроклонального размножения подвоев;
3. подобрать химический состав питательной среды, тип ауксина, его оптимальную концентрацию и способ воздействия на микропобег, обеспечивающие высокий уровень ризогенеза на этапе укоренения изучаемых подвоев;
4. изучить альтернативные методы стимуляции процессов пролиферации и ризогенеза микрорастений;
5. разработать эффективные приёмы адаптации пробирочных растений к нестерильным условиям теплицы.

Гипотеза исследований базируется на предположении, что разработка технологии микроклонального размножения изучаемых подвоев семечковых культур (ММ106, 54 - 118, Sydo, Pyriam) откроет новые перспективы для возделывания культуры яблони и груши. Применение технологии ускорит изучение биологических особенностей и хозяйственной ценности новых сортоподвойных комбинаций; позволит популяризировать и внедрить перспективные биотипы в производственный процесс и расширить перечень клоновых подвоев яблони и груши, рекомендуемых к использованию в Молдове. Внедрение технологии расширит возможности для развития питомниководства республики - позволит в короткие сроки массово размножить изучаемые подвои для посадки маточников категории База и тем самым увеличить производство безвирусного посадочного материала на национальном уровне.

Синтез методологии исследований: методология научных исследований включила комплекс методов и техник, используемых для решения поставленных задач. На основании анализа многолетних исследований, проводимых в лаборатории Вирусологии и Фитосанитарного контроля Научно - Практического Института Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий (НПИСВПТ), а также имеющихся литературных данных, был сформулирован экспериментальный подход к выбору стерилизующих агентов и времени стерилизации; минерального и гормонального состава питательных сред, в соответствии с целями каждого этапа технологии. В реализации исследований задействованы общепринятые классические приёмы работы с культурой изолированных тканей и методические рекомендации по размножению плодовых культур методом микроклонального размножения. Для оценки полученных результатов использовались методы анализа, сравнения, табличного

и графического иллюстрирования собранных материалов, которые были проанализированы с помощью математической обработки данных.

Научная новизна и оригинальность работы: впервые в Республике Молдова разработана и представлена для защиты технология микрклонального размножения перспективных подвоев для груши Sydo и Pygiam (ОН - 11), подвоя яблони 54 - 118, а также районированного подвоя яблони ММ106.

Прикладное значение исследований: внедрение разработанной технологии в процесс производства посадочного материала будет способствовать ускоренному размножению здоровых, генетически идентичных клонов изучаемых биотипов, обладающих повышенным биологическим потенциалом; ускорит переход питомниководства Молдовы к производству сертифицированного посадочного материала; откроет новые перспективы для возделывания таких важных культур как яблоня и груша.

Апробация результатов исследований: результаты проведённых исследований были доложены и обсуждались на заседаниях Учёного Совета Научно - Исследовательского Института Плодоводства в 2005 - 2007 г., а также на расширенном заседании лаборатории Вирусологии и Фитосанитарного контроля плодовых культур Научно - Практического Института Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий в 2024 г. Полученные в результате исследований данные были представлены на 6 международных и национальных конференциях.

Публикации на тему исследований: по теме диссертации опубликовано 13 научных работ: 4 статьи в научных журналах, 6 статей на международных и национальных конференциях, 3 статьи в научных сборниках, изданных в Республике Молдова.

Структура диссертации: диссертационная работа изложена на 155 страницах печатного текста и включает введение, 4 главы, синтез полученных результатов, выводы и практические рекомендации, 52 таблицы, 11 рисунков, 265 библиографических источников, 6 приложений.

Ключевые слова: питомниководство, безвирусный материал, клоновые подвои, яблоня, груша, *in vitro*, питательные среды, микрклональное размножение, укоренение, акклиматизация.

1. АНАЛИЗ СИТУАЦИИ В ОБЛАСТИ РАЗВИТИЯ МЕТОДОВ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ

В данной главе описываются основные аспекты метода микрклонального размножения - анализ, состояние изученности и применение метода культуры тканей в мировой практике размножения растений. Отражены этапы истории развития метода от возникновения до настоящего времени.

Изложен опыт исследователей при культивировании различных видов растений в условиях культуры *in vitro*; эффективность применяемых ими методов и проблемы, возникшие в процессе работы и повлиявшие на полученные результаты. Особое внимание уделено степени изученности микрклонального размножения клоновых подвоев семечковых культур - проанализирован

сортимент изученных биотипов; отображён обзор изложенных в литературе данных по каждому технологическому этапу. Сделаны выводы и выстроена стратегия наших дальнейших исследований.

2. ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ И МЕТОДЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты и условия проведения исследований

Биологический материал, используемый в процессе исследований, представлен районированным и перспективными в Республике Молдова подвоями семечковых культур: для яблони 54 - 118 и MM106, для груши Sydo и Pyriam (ОН - 11).

Исследования были выполнены в лаборатории Вирусологии и Фитосанитарного контроля Научно - Исследовательского Института Плодоводства в 2004 - 2007 г., а затем дополнены в 2019 - 2022 г. в Научно -Практическом Институте Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий (в настоящее время НИПИСХВМ).

Материнские кусты изучаемых подвоев были протестированы на наличие основных вирусов, поражающих данные виды, в соответствии с международной системой сертификации посадочного материала.

В качестве исходного материала использовались верхушки побегов размером 4 - 8 мм, отобранные с вегетирующих растений в стадии активного роста (май), а также верхушки искусственно пробуждённых черенков (февраль). Растения культивировались при температуре воздуха +22 +24 °С, освещении 3 - 4 тысячи люкс и фотопериоде 16 часов. Пересадку микрорастений осуществляли каждые 4 - 5 недель.

В основу экспериментов были положены классические приёмы работы с культурой изолированных тканей и органов растений (по Чернец А. [31], Высоцкому В., Туровской Н. [30], Матушкиной О. [21], Прониной И. [23].)

2.2. Методы научных исследований

В качестве поверхностного стерилизатора использовались гипохлорит кальция 3 и 6 %, хлорид ртути 0,05 и 0,1 %, перекись водорода 10, 15 и 30 %, Табидез 56 (дихлоризоцианурат натрия) 0,5 % при экспозиции от 2 до 25 минут.

На этапе введения в культуру *in vitro* для культивирования эксплантатов была использована питательная среда Murashige - Skoog (MS), модифицированная среда Murashige - Skoog с пониженной концентрацией макроэлементов и среда Lloyd и McCown (WPM). На этом этапе состав питательных сред был дополнен мезоинозитолом - 100 мг/л, аскорбиновой кислотой - 10 мг/л, пиридоксином - 0,5 мг/л, никотиновой кислотой - 0,5 мг/л, тиамин хлоридом - 0,5 мг/л, агар - агаром - 6 г/л, сахарозой - 30 г/л.

На основе питательной среды, модифицированной по MS, было изучено 7 комбинаций стимуляторов роста в разных концентрациях. Установлено влияние изучаемых факторов - стимуляторов роста (фактор А), генотипа подвоя (фактор В) и взаимодействия этих факторов (АВ) на развитие эксплантатов. Чтобы установить корреляцию между развитием эксплантов и концентрацией

регуляторов роста, в питательную среду были добавлены 6 - бензиламинопурина (БАП) 0,5 - 1 мг/л и 3 - индолилмасляная кислота (ИМК) 0,1; 0,5; 1 мг/л.

Для снижения ингибирующего эффекта фенольного окисления, присущего подвоям яблони, была исследована роль антиоксидантов и детоксицирующих препаратов в предотвращении процессов полифенольного окисления при введении эксплантов в культуру *in vitro*: ПЭГ 5 % м.м. 6000; м.м. 20000; ПЭГ 15 % м.м. 6000; ПВП 5 % м.м. 30000; ДИЕКА 0,05 %; аскорбиновая кислота - 0,01%.

На этапе клонального микроразмножения были изучены питательные среды по прописи MS с полной и пониженной в два раза концентрацией NH_4NO_3 , среда WPM и Гамборга (B5). С целью достижения максимального коэффициента размножения подбирали оптимальное соотношение регуляторов роста - в питательную среду были добавлены БАП 0,5; 1; 2; 3 мг/л, ИМК 0,5; 1 мг/л.

Чтобы установить взаимосвязь коэффициента размножения подвоев семячковых культур от расположения в пространстве, было испытано размещение микропобегов на поверхности питательной среды в вертикальном и горизонтальном положении.

Для изучения действия гиббереллиновой кислоты (ГК_3) на развитие растений в условиях *in vitro*, её вводили в питательную среду в концентрациях 0,5; 1; 2; 4; 8 мг/л.

Укоренение микропобегов проводили на питательной среде Мурасиге-Скуга с уменьшенной в 2 раза концентрацией минеральных солей и добавлением ИМК в концентрации 0,5; 1; 3; 4; 5 мг/л, а также на средах без ауксина. В некоторых вариантах было проведено предварительное насыщение растений на питательной среде с ауксином на протяжении 7 дней с последующей пересадкой на безгормональную среду. В качестве дополнительного способа стимуляции корнеобразования нами была изучена возможность укоренения растений в жидкой питательной среде с использованием опоры из фильтровальной бумаги. В качестве ауксина использовали ИМК в концентрациях 0,5; 1; 3 мг/л.

Как индукторы ризогенеза были изучены препараты 3 -индолилуксусной кислоты (ИУК) и α - нафтилуксусной кислоты (НУК).

Чтобы установить влияние макроэлементов на процесс ризогенеза, в схему экспериментов были включены $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ от концентрации солей по рецептуре Мурасиге - Скуга. Также было испытано изменение содержания отдельных групп минеральных элементов в питательной среде по отношению к процессам корнеобразования - понижение концентрации NH_4NO_3 и KNO_3 - двукратное и четырёхкратное, а Mg, Ca и P - двукратное. Изучили влияние микроэлементов на укоренение подвоев.

Проанализирована роль активированного угля в качестве сорбента веществ, ингибирующих процесс ризогенеза. В питательную среду, содержащую индолилмасляную кислоту 3 мг/л, был введён активированный уголь в количестве 125, 250, 500 и 1000 мг/л.

На этапе адаптации стерильных растений к условиям *ex vitro* были изучены 6 типов питательных субстратов, состоящих из разных природных компонентов, основным критерием которых были устойчивая фиксация растений и их

стабильный рост. Однослойные субстраты - торф: перлит (1:1), торф: песок (2:1), а также двухслойные субстраты, где в качестве верхнего слоя использовался перлит разной фракции - диаметром до 1 мм, от 1 до 3 мм, от 3 до 5 мм; в качестве нижнего слоя послужила смесь торф: перлит (1:1).

Оценили значимость внесения минеральных удобрений для поддержания устойчивого роста и развития растений, получения качественного подвойного материала. В течение вегетационного периода проводили внекорневые обработки препаратом Polyfeed - 0,5 % и 1 % с интервалом в 15 дней, а также корневое внесение раствора минеральных солей по Мурасиге - Скугу, NH_4NO_3 - 1 % или Polyfeed - 0,5 % и 1 % с интервалами 10, 15 и 20 дней.

Были произведены учёты, позволяющие установить взаимосвязь между приживаемостью растений на этапе акклиматизации и способом индукции ризогенеза в условиях *in vitro*.

В ходе эксперимента регистрировались и анализировались следующие показатели: развитие и увеличение размеров эксплантов, формирование листьев и почек; коэффициент размножения; средняя и максимальная высота микропобегов; средняя длина и количество корней на одно растение; интенсивность роста при акклиматизации.

Математическую обработку основных результатов проводили с использованием методов однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа с помощью программы для статистической обработки Microsoft Office Excel 2019.

3. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ПОДВОЕВ СЕМЕЧКОВЫХ КУЛЬТУ

3.1. Введение эксплантов в культуру *in vitro*

На начальном этапе клонального микроразмножения приоритетной задачей являлось получение стерильного растительного материала. Успех дезинфицирующей обработки во многом зависел от происхождения, типа эксплантов и их физиологического состояния.

Нами проанализирована эффективность инициации в культуру *in vitro* подвоев яблони и груши в разные периоды года - в феврале (верхушки растений, выведенные из стадии покоя) и в мае (активно вегетирующие верхушки). В результате наших наблюдений установлено, что молодые верхушки с искусственно пробуждённых растений обладали пониженным уровнем контаминации микроорганизмов - количество инициированных эксплантов, свободных от бактериальной и грибковой инфекции было высоким, а их введение в культуру *in vitro* в меньшей степени зависело от стерилизующего агента, что позволяло с успехом использовать малотоксичные препараты. При стерилизации таких эксплантов 6 % гипохлоритом кальция в течение 10 минут нам удалось получить от 58 до 80 % асептической культуры.

В период вегетации, с ростом активности микроорганизмов, инфицированность растительного материала также возрастала. В ряде случаев для достижения высоких показателей при стерилизации была применена сулема

(HgCl_2). Обработка в 0,1 % растворе в течение 5 минут позволила увеличить выход стерильных эксплантов яблони до 63 - 79 % [18]. Не смотря на положительный результат, мы отказались от дальнейшего использования препаратов ртути с учётом рисков их применения. Для этого были испытаны и оптимизированы схемы обеззараживания эксплантов менее токсичными стерилизаторами (рис. 3.1). Применение некоторых из них может послужить достойной альтернативой препаратам на основе ртути.

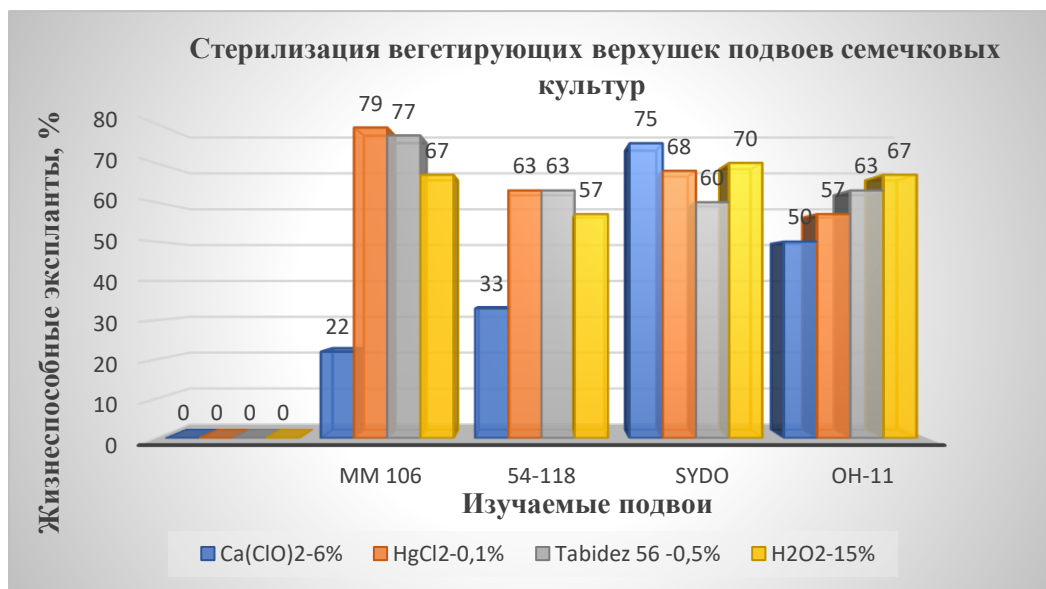


Рисунок 3.1. Стерилизация вегетирующих верхушек подвоев семечковых культур

Подвои для груши были успешно стерилизованы с использованием 15 % раствора пергидроля - развитие получили 70 % эксплантов подвоя Sydo и 67 % эксплантов Pyram. Для подвоя Sydo также эффективной была обработка в 6 % раствора гипохлорита кальция. Применение 0,5 % раствора Tabidez 56 при стерилизации эксплантов яблони позволило получить от 63 % до 77 % асептической культуры [8].

На основании математического анализа данных определено, что из всех изученных факторов схема стерилизации оказывала основное влияние на степень некротизации инициалей и количество развивающихся эксплантов. Это подтверждает необходимость проведения тестирования стерилизующих препаратов для достижения качественных результатов.

Были установлены генотипические различия между изучаемыми подвоями. Подвои яблони MM106 и 54 - 118 выделялись своей резистентностью к повреждающему воздействию стерилизаторов; обладали способностью к восстановлению и дальнейшему развитию. Среднее значение повреждённых эксплантов у подвоев для груши достигало 5,5 - 22,5 %, в то время как у подвоев яблони отсутствовало или не превышало 13,5 %.

Яблоня, по сравнению с другими культурами, сильно подвергалась процессам полифенольного окисления, которые приводили к задержке развития эксплантов, а в некоторых случаях к их массовой гибели. Окислительный эффект

усиливался при повреждении тканей во время изолирования. Нами было установлено положительное влияние антиоксидантов и препаратов для нейтрализации ингибирующих факторов на состояние эксплантов [18]. Защитные свойства усиливались с увеличением продолжительности контакта с растительными тканями. Количество регенерирующих эксплантов почти удвоилось в варианте, где кратковременная обработка перед изоляцией в 5 % раствором ПЭГ (м.м. 6000) была заменена на проведение всех операций по извлечению апикальной части в растворе 5 % ПЭГ. В вариантах, где использовались растворы ПЭГ 5 % м.м. 6000 или м.м. 20000; ПЭГ 15 % м.м. 6000; ПВП 5 % м.м. 30000; ДИЕКА 0,05 % признаки полифенольного окисления были слабо выражены, не представляли риска для развития эксплантов, или вовсе не наблюдались.

В процессе инициации в культуру *in vitro* проводили исследования в отношении развития эксплантов на основе разных питательных сред (табл. 3.1).

Таблица 3.1. Влияние минеральных компонентов питательной среды на развитие эксплантов подвоев семечковых культур

Подвои	Пита- тельные среды	Состояние эксплантов по фазам развития (%)				Всего развива- ющихся эксплантов, (%)
		эксплант без развития	линейный рост, развитие 2-3 листиков	розетка с листьями и зачатками почек	конго- мерат почек и побегов	
		1 фаза	2 фаза	3 фаза	4 фаза	
ММ 106	MS	6,7	20,0	53,3	20,0	73,3
	MS *	6,7	26,7	40,0	26,0	66,0
	WPM	6,7	33,3	53,3	6,7	60,0
54 - 118	MS	13,3	40,0	33,4	13,3	46,7
	MS *	6,7	13,3	53,0	27,0	80,0
	WPM	20,0	26,7	40,0	13,3	53,3
Pyriam	MS	10,0	50,0	40,0	0,0	40,0
	MS *	30,0	50,0	20,0	0,0	20,0
	WPM	70,0	20,0	10,0	0,0	10,0
Sydo	MS	10,0	40,0	30,0	20,0	50,0
	MS *	0,0	30,0	60,0	10,0	70,0
	WPM	20,0	50,0	30,0	0,0	30,0
* - среда по MS модифицированная						

Установлено, что регенерационная способность изучаемых подвоев напрямую зависела от минерального состава питательной среды. Состояние стерильных верхушек оценивалось в зависимости от фазы развития [21, 30]. Экспланты, достигшие 3 - 4 фазы развития, представляли наибольшую ценность - этот критерий использовался при отборе оптимальной питательной среды.

Выявлено, что развитие подвоев 54 - 118 и Sydo наиболее эффективно протекало на питательной среде с модифицированной рецептурой MS в которой концентрация макросолей была понижена в два раза [19]. 70 - 80 % изолированных стерильных эксплантов достигли хорошего уровня развития. Без развития осталось чуть больше 6 % верхушек, а это на 13 - 20 % меньше, чем в

большинстве других вариантов. Экспланты подвоев яблони MM106 и груши Pyriam лучше развивались на питательной среде с повышенной концентрацией минеральных солей - на MS в оригинале. Экспланты Pyriam отличались от других биотипов замедленным развитием. К концу первого пассажа ни один из них не достиг максимального уровня развития, несмотря на то что экспланты были жизнеспособны, без повреждений. Только 40 % иницированного материала подвоя Pyriam сформировало листовую розетку с зачатками почек.

Наиболее эффективным приёмом индукции разных форм морфогенеза является подбор оптимального соотношения гормональных веществ в составе питательной среды. В результате проведенных исследований обнаружено, что для развития первичных эксплантов изученных подвоев предпочтительно использовать повышенную концентрацию цитокинина в питательной среде (табл.3.2).

Таблица 3.2. Развитие эксплантов изучаемых подвоев в зависимости от концентрации ауксина и цитокинина в питательной среде

N:	Концентрация БАП: ИМК (мг/л) (фактор А)	Развивающиеся экспланты (%): (фактор В)				Среднее по фактору А НСР 0,05 = 7,9
		MM 106	54-118	Sydo	Pyriam	
1	0,5 : 0	53,0	46,6	20	0	29,9
2	0,5 : 0,1	53,0	53,3	20	0	31,5
3	0,5 : 0,5	39,6	40,0	50	0	32,4
4	1,0 : 0	66,0	80,0	70	20	59,0
5	1,0 : 0,1	66,6	66,3	60	20	53,2
6	1,0 : 0,5 (К)	66,7	53,3	60	30	52,5
7	1,0 : 1,0	47,0	46,7	50	10	38,4
Среднее, фактор В НСР 0,05 = 5,58		53,98	53,61	45	11,25	-
НСР 0,05 частных различий = 15,8						

К - контроль

Культивирование первичных эксплантов на среде с БАП 1 мг/л создавало условия для их активной регенерации - от 66 до 80 % развивающихся эксплантов были получены у подвоев MM106, 54 - 118, Sydo [19]. Для подвоя Pyriam самый высокий результат был достигнут при комбинации БАП 1 мг/л с ИМК 0,5 мг/л. Введение ауксина в питательную среду на этом этапе не являлось обязательным условием, за исключением подвоя груши Pyriam.

Влияние изучаемых факторов на регенерацию первичных эксплантов составило для фактора А (концентрация стимуляторов роста) - 88 %, для фактора В (подвой) - 3 %, для взаимодействия обоих факторов (АВ) - 3,37 %.

При использовании флороглюцинола в качестве дополнительного компонента в питательной среде, регенерация апексов протекала слабо, прирост и развитие листового аппарата были подавлены.

3.2. Микрклональное размножение подвоев семечковых культур

Целью этапа микрклонального размножения являлось получение максимального количества дополнительных побегов от каждого исходного

экспланта. Минеральный состав питательной среды оказывал существенное влияние на формирование новых микропобегов и их параметры. При подборе состава, стимулирующего процесс пролиферации у изучаемых подвоев, нами были протестированы питательные среды, наиболее часто используемые для плодовых культур [4, 5, 6, 26, 29].

Таблица 3.3. Влияние минерального состава питательных сред на коэффициент размножения подвоев яблони

Питательная среда (фактор В)	Качественные показатели по подвоям яблони (фактор А)							
	Дополнительные побеги, шт.		Коэффициент размножения		Средняя высота побега, см		Максимальная высота побегов, см	
	ММ106	54-118	ММ106	54-118	ММ106	54-118	ММ106	54-118
MS (К)	60	46	3,0	2,3	1,1	1,4	2,5	4,0
MS, $\frac{1}{2}$ NH ₄ NO ₃	56	62	2,8	2,9	0,8	1,0	2,0	3,8
MS без гормонов	12	22	0,6	1,1	0,9	0,7	1,2	1,0
В 5	44	56	2,2	2,8	1,1	1,5	2,2	5,0
WPM	56	74	2,8	3,7	0,6	0,7	1,8	3,2
Среднее по показателю	45,6	52	2,28	2,56	0,9	1,06	1,94	3,4
НСР 0,05	4,35		0,87		0,27		0,98	

К - контроль

Таблица 3.4. Влияние минерального состава питательных сред на коэффициент размножения подвоев для груши

Питательная среда (фактор В)	Качественные показатели по подвоям груши (фактор А)							
	Дополнительные побеги, шт.		Коэффициент размножения		Средняя высота побега, см		Максимальная высота побегов, см	
	Sydo	Pyriam	Sydo	Pyriam	Sydo	Pyriam	Sydo	Pyriam
MS (К)	73	34	3,7	2,8	3,4	1,0	5,5	2,0
MS, $\frac{1}{2}$ NH ₄ NO ₃	88	30	4,4	2,5	2,7	0,9	5,5	1,8
WPM	54	22	2,7	1,8	1,5	0,7	2,5	1,5
Среднее по показателю	71,6	28,6	3,6	2,3	2,5	0,86	4,5	1,76
НСР 0,05	7,2		1,5		0,75		1,03	

К - контроль

Для подвоев ММ106 и Pyriam оптимальный результат обеспечила композиция макро - и микроэлементов среды MS (табл. 3.3, 3.4). Микропобеги яблони формировали в среднем 3 дополнительных побега, а груши - 2,8 побега.

Максимальная скорость размножения подвоя Sydo была достигнута на питательной среде MS при пониженном содержании NH_4NO_3 ; в среднем сформировалось 4,4 новых побега. У подвоя 54 - 118 пролиферация активно протекала на питательной среде WPM - у каждого исходного экспланта в среднем формировалось 3,7 дополнительных побега; а также на среде MS с $\frac{1}{2}$ NH_4NO_3 - 2,9 новых побега. Средняя высота побегов для обоих биотипов яблони и груши Pyriam колебалась в пределах от 0,6 до 1,5 см. Подвой Sydo заметно выделялся удлинёнными побегами, средняя высота которых варьировала от 1,5 до 3,4 см (табл. 3.3, 3.4).

Специфической особенностью плодовых культур является разная чувствительность к действию регуляторов роста. Отклонение содержания этих компонентов в питательной среде за пределы оптимального уровня отрицательно влияет на потенциал размножения и уровень развития микропобегов. Нами проведены исследования по подбору эффективного соотношения цитокинина и ауксина с учётом индивидуальных потребностей изучаемых подвоев (табл. 3.5).

Таблица 3.5. Влияние концентрации ауксина и цитокинина в питательной среде на пролиферацию подвоев семечковых культур

Концентрация БАП : ИМК в питательной среде (мг/л), (фактор А)	Подвой, (фактор В)				Среднее по фактору А ($F_p < F_k$)
	Коэффици- циент размножения MM106	Коэффици- циент размножения 54 - 118	Коэффици- циент размножения Pyriam	Коэффици- циент размножения Sydo	
0,5: 0	1,7	5,0	1,3	3,0	2,75
1,0: 0	1,6	2,4	3,3	3,5	2,70
3,0: 0	2,0	1,2	2,5	3,8	2,37
1,0: 0,5 (К)	2,6	2,3	2,4	3,4	2,67
1,0: 0,5''	1,7	3,7	2,8	3,6	2,95
2,0: 0,5	4,5	1,3	2,6	2,8	2,80
3,0: 0,5	1,5	1,2	3,0	2,5	2,05
Среднее, (фактор В) НСР 0,05 = 0,28	2,25	2,55	2,46	3,9	-
НСР 0,05 частных различий = 0,93					

''- ИМК заменили на НУК

К - контроль

Согласно полученным данным, размножение подвоя яблони 54 - 118 успешно протекало на питательной среде с добавлением БАП 0,5 мг/л (табл. 3.5). Каждый исходный побег в среднем формировал 5 дополнительных побегов длиной около 7 мм. Однако было замечено, что при трёх и более последовательных культивированиях на таком питательном составе, наблюдалось плавное снижение активности пролиферации, которое можно было предотвратить единовременным повышением концентрации цитокинина или введением ауксина (ИМК или НУК) в питательную среду. Для тиражирования подвоя MM106 оптимальной оказалась концентрация БАП 2 мг/л, ИМК 0,5 мг/л - коэффициент размножения составил 1 : 4,5 [8]. У подвоя Pyriam коэффициент

размножения достиг 3,3 дополнительных побега при внесении в среду БАП 1 мг/л; у Sydo - 3,8 при внесении в среду БАП 3 мг/л (рис. 3.2).

Анализ полученных данных показал, что наибольшую силу влияния на процесс размножения изучаемых подвоев оказывало взаимодействие двух факторов - их биотип и концентрация стимуляторов роста в среде. Доля влияния при этом составляла 50,62 %.



Рисунок 3.2. Микрклональное размножение подвоя Sydo (слева) и 54 - 118 (справа) в условиях *in vitro*

Был изучен альтернативный способ повышения активности пролиферации у микрорастений с помощью изменения расположения побегов на поверхности питательной среды (табл. 3.6).

Таблица 3.6. Коэффициент размножения побегов в зависимости от расположения на питательной среде*

Подвои	Варианты опыта	Количество побегов в опыте, шт.	Количество добавочных побегов на 1 исходный, шт.	Средняя длина побега, см.	Побеги высотой более 1 см., %
ММ106	1 (К)	21	2,6	0,5	20
	2	21	7,2	1,2	49
	3	21	5,5	1,0	45
54 - 118	1 (К)	21	2,3	0,8	43
	2	21	8,8	0,8	37
	3	21	6,0	0,7	29
Pyriam	1 (К)	21	2,4	0,8	10
	2	21	3,3	1,2	30
	3	21	1,5	0,9	20
Sydo	1 (К)	21	3,4	2,9	85
	2	21	4,7	3,5	93
	3	21	1,2	2,6	73

*- среда MS дополненная БАП 1 мг/л, ИМК 0,5 мг/л

К - контроль

Варианты опыта: **1** - вертикальная посадка побегов, **2** - горизонтальная посадка побегов длиной 1,5 - 2 см с удаленной верхушкой, **3** - горизонтальная посадка микрочеренков с несколькими глазками длиной до 1 см.

У подвоя ММ106 побеги длиной до 2 см с удаленной верхушкой, сформировали в горизонтальном положении, 7,2 дополнительных побега, а у подвоя 54 - 118 по 8,8 побегов, тогда как в вертикальном положении этот показатель в среднем составлял 2,6 и 2,3 побега соответственно. В случае, когда в горизонтальном положении культивировали фрагменты побегов длиной около 1 см, было получено 5,5 дополнительных микрорастений у подвоя ММ106 и 6 микрорастений у подвоя 54 - 118.

Расположение побегов на питательной среде слабее влияло на процесс пролиферации у подвоев для груши. При горизонтальном размещении подвоя Pyriam и Sydo сформировали в среднем 3,3 и 4,7 новых побегов. У фрагментов побегов длиной до 1 см коэффициент размножения был меньше, чем в контрольном варианте.

Успех этапа ризогенеза и дальнейшей акклиматизации к нестерильным условиям зависел от качества укореняемых микропобегов, которые должны быть хорошо развитыми, длиной не менее 15 мм. Для достижения этих условий был изучен эффект введения гиббереллиновой кислоты ($ГК_3$) в питательную среду на последнем пассаже перед укоренением растений (рис.3.3).

В результате установлено, что максимальное количество удлиненных микропобегов было получено на питательных средах, дополненных $ГК_3$ в концентрации от 0,5 мг/л до 1 мг/л в сочетании с БАП 1 мг/л (рис. 3.3). Более высокое содержание цитокинина и гиббереллина на этом этапе не было рационально - уменьшало количество растений высотой от 15 мм.

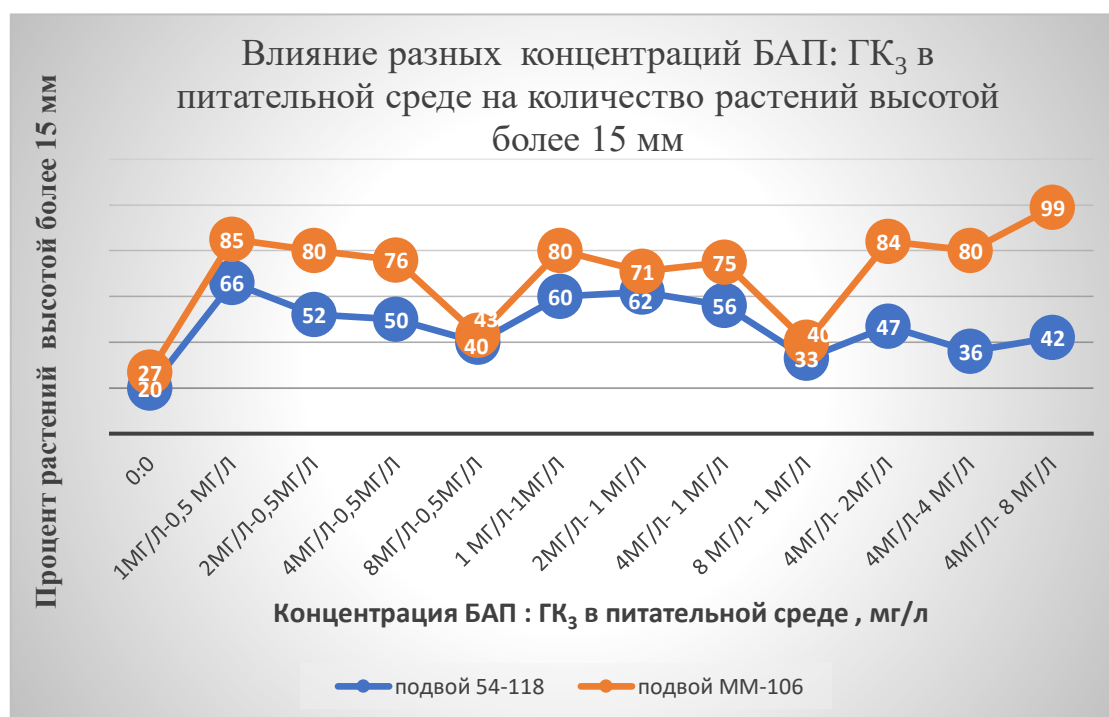


Рисунок 3.3. Влияние разных концентраций БАП и $ГК_3$ в питательной среде на количество растений высотой более 15 мм

Целесообразность внесения ГК₃ в питательную среду перед этапом укоренения подтвердилась дополнительными экспериментами по удлинению микропобегов (табл. 3.7).

Таблица 3.7. Концентрация стимуляторов роста и высота микропобегов на стадии удлинения

Подвой	Изучаемые показатели	Концентрация БАП : ИМК : ГК ₃ в среде, мг/л			
		1: 0,5: 0,2 (к)	0,5 : 0,5 : 0,2	0,5 : 0,5 : 1	0,3 : 0,3 : 0,1
ММ106	Высота побегов до посадки, см.	0,7	0,7	0,7	0,7
	Коэффициент размножения	2,6	2,0	2,2	1,5
	Высота после элонгации, см.	1,0	1,2	1,6	1,0
54 - 118	Высота побегов до посадки, см.	0,7	0,7	0,7	0,7
	Коэффициент размножения	2,5	2,9	2,4	2,2
	Высота после элонгации, см.	1,0	1,5	1,8	1,5
Pyriam	Высота побегов до посадки, см.	0,7	0,7	0,7	0,7
	Коэффициент размножения	2,0	1,8	1,6	1,3
	Высота после элонгации, см.	1,2	1,5	2,0	1,7

Питательные среды дополнялись БАП в концентрации 1 - 0,3 мг/л, ИМК 0,5 - 0,3 мг/л, ГК₃ 0,2 - 1 мг/л. Достичь максимального удлинения побегов удалось только при одновременном снижении содержания цитокинина и повышении гиббереллина в среде.

ГК₃ 0,2 мг/л в сочетании с БАП 0,5 мг/л стимулировала рост побегов до 1,2 - 1,5 см. Максимальный эффект был получен при повышении концентрации ГК₃ в 5 раз - у всех испытанных подвоев средняя высота побегов приблизилась к необходимой. Кроме того, на каждый исходный побег у подвоя ММ106 образовалось 2,2 дополнительных побега средней высотой 1,6 см; у подвоя 54 - 118 по 2,4 дополнительных побега высотой до 1,8 см; у Pyriam - 1,6 дополнительных побега высотой до 2 см. Культивирование микропобегов на таких питательных средах позволило улучшить их качество - стимулировало рост растений в высоту, утолщение стебля, способствовало развитию листьев, а также помогло избежать излишнего накопления цитокининов в тканях растений перед этапом ризогенеза.

Таким образом, установив оптимальные пропорции ГК₃ и БАП, нам удалось контролировать процессы роста растений и получить от 66 до 85 % растений, качество которых соответствовало требованиям следующего этапа технологии.

3.3. Укоренение подвоев семечковых культур в условиях *in vitro*

Принимая во внимание генотипические отличия изучаемых подвоев, было изучено стимулирующее действие трех основных типов ауксина (ИМК, ИУК, НУК) на этапе укоренения микропобегов. Под влиянием ИМК у большинства биотипов активность процесса ризогенеза была выше в 1,5 - 2 раза. Для подвоя Sydo использование ИМК и НУК было равносильным.

В результате математической обработки данных установлено, что успех укоренения микропобегов на 46 % зависел от типа ауксина и на 19 % от индивидуальных характеристик укореняющихся биотипов. Доля влияния взаимодействия этих факторов на процесс ризогенеза составила 27 %.

На примере подвоев яблони была изучена способность к ризогенезу на питательных средах с разными концентрациями макро- и микроэлементов. В ходе эксперимента наблюдали усиление потенциала к корнеобразованию при двукратном снижении концентрации макросолей в питательной среде. Укореняемость подвоя яблони ММ106 увеличилась примерно на 10 - 20 %, а подвоя 54 - 118 на 15 - 30 % по сравнению с другими испытанными вариантами. Снижение концентрации микроэлементов в питательной среде не оказывало решающего влияния на ризогенез побегов.

Наличие сахарозы в среде для укоренения было обязательным - результаты согласовались с литературными источниками [23]. В условиях полного исключения углеводов из питательной среды, ризогенез был минимальным.

У подвоев яблони процесс укоренения наступал быстрее и протекал более активно, чем у подвоев для груши. Были испытаны разные способы индукции образования корней. В большинстве случаев ризогенез протекал эффективно при прямом внесении ауксинов в питательную среду.

Установлено, что укоренение побегов подвоя яблони 54 - 118 активно протекало на питательной среде с ИМК 0,5 мг/л (табл. 3.8). В этом варианте получено 80 % качественных растений с развитой корневой системой. У подвоев ММ106 и Ругам максимальный уровень ризогенеза был достигнут на среде с ИМК 3 мг/л - укоренились соответственно 75 - 60 % побегов.

Для подвоя Sydo оптимальным решением было насыщение микропобегов на среде с ИМК 3 мг/л в течение 7 дней с последующей их пересадкой на питательную среду без гормонов. Осуществление промежуточной пересадки растений позволило поднять уровень ризогенеза на 25 % по сравнению с прямым укоренением на среде с ИМК 3 мг/л и на 15 % по сравнению с средой, содержащей ИМК 1 мг/л. Введение в питательную среду ИМК 4 - 5 мг/л не способствовало усиленному формированию корней.

Сравнив ход процесса ризогенеза в испытанных вариантах, был отмечен ускоренный темп формирования корневой системы на питательных средах с ИМК 3 мг/л. Это позволяло сократить длительность этапа укоренения и раньше приступить к акклиматизации растений.

Добавление в питательную среду активированного угля в качестве сорбента продуктов метаболизма растений, а также с целью затенения прикорневой зоны не оказало стимулирующего воздействия на ризогенез.

В качестве альтернативы была изучена возможность укоренения размноженных микропобегов на питательных средах без агар - агара. В этих экспериментальных вариантах наблюдалось повышение активности ризогенеза.

На питательных средах без агара и без стимуляторов роста укоренилось в 2,5 раза больше микропобегов по сравнению с аналогичными средами с агаром.

Культивирование растений на жидкой питательной среде позволило значительно сократить период укоренения, а также успешно использовать пониженные концентрации ауксина для достижения хорошего результата. Укоренение микропобегов на жидкой питательной среде с добавлением ИМК 0,5 мг/л продемонстрировало выгодное преимущество перед другими испытанными вариантами сред.

Таблица 3.8. Укоренение подвоев *in vitro* в зависимости от концентрации минеральных солей и способа насыщения ауксином

Питательные среды (фактор А)		Укоренившиеся подвои, % (фактор В)				Среднее по фактору А НСР 0,05 = 5,42
Минеральный состав	Ауксины, мг/л	ММ 106	54 - 118	Pyriam	Sydo	
MS 1/2 (К)	ИМК - 0.5 мг/л	70	80	45	30	56,25
MS 1/2	ИМК -1 мг/л	55	60	50	50	53,75
MS 1/2	НУК -1 мг/л	40	50	35	25	37,50
MS 1/2	ИМК -3 мг/л	75	75	60	40	62,50
MS 1/2	НУК -3 мг/л	55	50	40	30	43,75
Среднее по фактору В НСР 0,05 = 4,85		59	63	46	35	-
НСР 0,05 частных различий = 10,8						
Питательные среды (фактор А)		Укоренившиеся подвои, % (фактор В)				Среднее по фактору А НСР 0,05 = 6,06
Минеральный состав	Ауксины, мг/л	ММ 106	54-118	Pyriam	Sydo	
MS 1/2 (К)*	ИМК -3 г/л	61	65	55	65	61,50
MS 1/4 *	ИМК -3 г/л	55	65	40	55	53,70
MS 1/8 *	ИМК -3 г/л	45	45	35	25	37,50
MS 1/2 *	ИМК- 4 г/л	50	60	45	30	46,25
MS 1/2 *	ИМК -5 г/л	45	50	30	10	33,75
Среднее по фактору В НСР 0,05= 5,42		51,2	57,0	41,0	37,0	-
НСР 0,05 частных различий = 12,1						

*- пересадка побегов на безгормональную питательную среду через 7 дней

К - контроль

Показатели качества укорененных в условиях *in vitro* растений, зависели от состава питательной среды на этапе ризогенеза. На питательных средах с пониженным содержанием ауксина укоренённые побеги были выше и отличались развитой корневой системой.

Средняя высота подвоев яблони достигала 3,5 - 4,5 см. У MM106 формировалось 4 - 5 корней на побег, а у 54 - 118 в среднем по 6 - 8 корней. У подвоя Rugiam и Sydo средняя высота укоренившихся побегов приближалась к 3,8 - 4 см. На каждом растении образовалось до 4 - 5 корней (табл. 3.9, 3.10).

Качество укоренённых растений соответствовало условиям, необходимым для успешной адаптации к нестерильным условиям.

Таблица 3.9. Показатели качества микрорастений подвоя Rugiam после укоренения *in vitro*

Показатели качества	Концентрация ИМК в питательной среде, мг/л				Среднее значение
	0,5	1	3	3*	
Укоренившиеся побеги, %	45,0	50,0	60,0	55,0	52,5
Средняя высота укоренившихся побегов, см	3,8	3,6	3,0	2,8	3,3
Отклонение от среднего значения по высоте	+ 0,5	+ 0,3	- 0,3	- 0,5	-
Среднее количество корней на побег, шт.	3,5	3,5	4,0	3,0	3,5
Отклонение от среднего количества корней	-	-	+ 0,5	- 0,5	-
Средняя длина корней, см.	2,5	2,8	3,0	2,6	2,7
Отклонение от среднего значения длины корней	- 0,2	+ 0,1	+ 0,3	- 0,1	-

* - с пересадкой побегов на питательную среду без гормонов через 7 дней

Таблица 3.10. Показатели качества микрорастений подвоев Sydo после укоренения *in vitro*

Показатели качества	Концентрация ИМК в питательной среде, мг/л				Среднее значение
	0,5	1	3	3*	
Укоренившиеся побеги, %	30,0	50,0	40,0	65,0	46,2
Средняя высота укоренившихся побегов, см	4,0	5,0	3,6	4,0	4,1
Отклонение от среднего значения по высоте	- 0,1	+ 0,9	- 0,5	- 0,1	-
Среднее количество корней на побег, шт.	4,0	5,0	3,5	3,0	3,8
Отклонение от среднего значения по корням	+ 0,2	+ 1,2	- 0,3	- 0,8	-
Средняя длина корней, см.	4,0	4,4	4,2	3,9	4,1
Отклонения от среднего значения по длине корней	- 0,1	- 0,3	+ 0,1	- 0,2	-

* - с пересадкой побегов на питательную среду без гормонов через 7 дней

3.4. Акклиматизация растений в условиях *ex vitro*

На этапе адаптации стерильные пробирочные растения подвергаются высоким рискам из - за низкой способности контролировать процессы транспирации; из - за перестройки корневой системы на автотрофный режим

питания, а также ввиду резко возросшей угрозы со стороны патогенной микрофлоры. Ошибки в уходе и нарушение технологии на этом этапе могут привести к необратимым последствиям и значительным потерям размноженного материала.

Для повышения приживаемости микрорастений было изучено 6 вариантов питательных субстратов. Хорошие результаты получены при использовании двухслойных смесей - основной нижний слой состоял из смеси торфа : перлита (1:1), а верхний слой высотой 3 - 4 см - из перлита мелкой фракции (табл. 3.11). Перлит - экологически чистый, нейтральный материал, не подвержен разложению под действием микроорганизмов - в качестве верхнего слоя обеспечивал необходимые условия для адаптации легко уязвимых растений. После физиологической перестройки, в процессе роста, корни акклиматизированных растений достигали основного субстрата и могли использовать его органические вещества. В таком субстрате приживаемость растений была максимальной и достигала 85 %. Через 6 недель после посадки средняя высота растений составляла около 10 см [17].

На субстрате, где в качестве верхнего слоя использовали перлит фракции 3 - 5 см, выживаемость была хуже. Крупный перлит не обеспечивал достаточного уплотнения; фиксация растений в зоне корневой системы была слабая.

Таблица 3.11. Развитие растений подвоя яблони ММ106 на различных субстратах при адаптации в условиях теплицы

Компоненты субстрата		Всего растений, шт.	Состояние растений через 1,5 месяца после посадки			
верхний слой - 3 - 4 см	нижний основной слой		Приживаемость		Высота растений	
			%	отклонения от средней в %	см	отклонения от средней в см
Перлит до 1 мм	торф : перлит (1:1)	80	85,0	+ 21,9	9,8	+ 4,1
Перлит 1-3 мм	торф : перлит (1:1)	80	73,0	+ 9,9	7,3	+ 1,6
Перлит 3-5 мм	торф : перлит (1:1)	80	54,0	- 9,1	4,6	- 1,1
-	торф : перлит (1:1)	80	74,0	+ 10,9	6,6	+ 0,9
-	торф : песок (2:1)	80	59,0	- 4,1	3,7	- 2,0
Песок	торф : перлит (1:1)	80	34,0	- 29,1	2,4	- 3,3
Среднее по показателю		80	63,1	-	5,7	-
НСР 0,05		-	17,3	-	1,24	-

На однослойном субстрате торф : перлит (1:1) количество прижившихся растений составило 74 %, однако темпы развития растений в этом варианте были

замедленны. На субстрате из смеси торфа и песка зафиксированы самые низкие результаты; средняя высота микрорастений не превышала 2,4 см.

В первые недели акклиматизации растения находились под пленочными укрытием для поддержания высокой влажности. Это сглаживало последствия резкой перемены условий культивирования, а также позволяло предотвратить снижение влажности и нежелательное обветривание нежных растений. После появления новых листьев влажность воздуха плавно понижали до полной адаптации растений к естественным условиям.

Необходимым фактором для хорошего развития растений является дополнительное минеральное питание. В период вегетации было изучено несколько способов внесения элементов питания - корневая и листовая обработка с применением комплексного водорастворимого минерального удобрения Polyfeed в разных концентрациях, а также внесение нитрата аммония и раствора солей Мурасиге-Скуга (рис. 3.4).

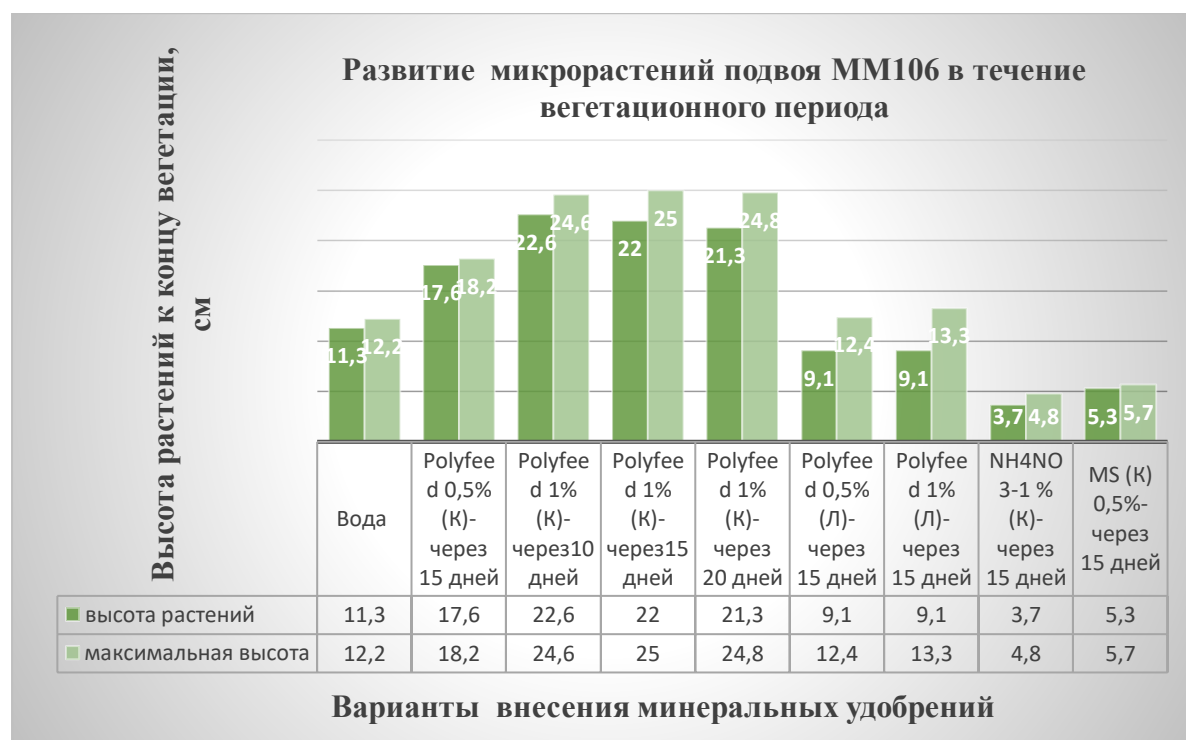


Рисунок 3.4. Развитие микрорастений ММ106 в зависимости от способа внесения минеральных удобрений

Примечания: (К)-корневая обработка, (Л)- листовая обработка, MS - раствор солей по MS

Установлено, что корневое внесение удобрений Polyfeed 1 % с интервалом 15 - 20 дней было оптимальным и обеспечивало стабильную динамику роста и развития подвоя ММ106 [17]. Средняя высота растений достигала 21 - 22 см, а максимальная - 24 см. Внесение удобрений с интервалом 10 дней также благоприятствовало активному росту, но выживаемость растений в этом варианте была хуже и составила около 54 %. Увеличение промежутка времени между внесением минеральных удобрений повышало выживаемость растений до 70 %. Листовые обработки раствором Polyfeed, а также корневые нитратом

аммония или раствором Мурасиге - Скуга не обеспечивали условий, необходимыми для устойчивого развития растений (рис. 3.4).

Успех этапа адаптации напрямую зависел от способа укоренения микропобегов в культуре *in vitro* и уровня их развития. В вариантах, где процесс укоренения *in vitro* сопровождался положительной реакцией на стимуляцию ауксином, растения хорошо развивались, у них формировалась качественная корневая система (рис. 3.5). В дальнейшем это обеспечивало им высокие адаптационные возможности и повышало количество прижившихся растений. В процессе разработки технологии клонального размножения были выделены оптимальные схемы для укоренения исследуемых подвоев. Их применение позволило повысить приживаемость растений подвоя яблони ММ106 до уровня 72 %; 54 - 118 до 81 %; подвоев для груши Sydo и Pyriam - в диапазоне 69 - 58 % (табл. 3.12).

Таблица 3.12. Приживаемость микрорастений на этапе акклиматизации

Подвой	ИМК в питательной среде, мг/л	Укоренилось побегов, %	Приживаемость при акклиматизации, %
ММ 106	0,5	73	61
	1,0	42	41
	3,0	67	72
	3,0*	62	45
54 - 118	0,5	80	81
	1,0	60	75
	3,0	75	53
	3,0*	65	77
Pyriam	0,5	45	44
	1,0	50	50
	3,0	60	58
	3,0*	55	45
Sydo	0,5	30	50
	1,0	50	60
	3,0	40	62
	3,0*	65	69

*- пересадка на безгормональную питательную среду через 7 дней



Рисунок 3.5. Адаптированный в теплице подвой яблони ММ106

Во время адаптации мы столкнулись с тем, что небольшое количество растений отставало в росте и требовало доращивания на второй год. Причина этого кроется в отсутствии периода покоя у растений, размноженных *in vitro*. Доращивание проводили в условиях теплицы, обеспечивая необходимый уход и защиту растений. В результате, к концу вегетации средняя высота растений, пригодных к посадке в маточник, достигала 52 - 53 см.

4.ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МАТОЧНИКА КЛОНОВОГО ПОДВОЯ ЯБЛОНИ ММ106

Включение технологии микроклонального размножения подвоев яблони и груши в процесс производства безвирусного посадочного материала способно значительно повысить рентабельность плодовых питомников и следовательно, всей отрасли плодоводства.

Была рассчитана экономическая эффективность эксплуатации маточника подвоя яблони ММ106, посаженного материалом, размноженным нами в культуре *in vitro* (табл. 4.1).

Таблица 4.1. Экономическая эффективность маточника подвоя яблони ММ106

Возраст маточника	Показатели	Маточник традиционно размножаемого подвоя	Маточник, заложённый растениями после культуры <i>in vitro</i>
1 ГОД	Высажено подвоя, шт	1000	1000
	Исходная стоимость подвоев, лей/тыс. шт.	2000	12 000
	Затраты на уход, лей/тыс. шт.	600	600
	Себестоимость, лей/тыс. шт.	2600	12 600
2 ГОД	Выход отводков, шт./тыс. кустов	2000	3000
	Затраты на уход, лей	1500	2850
	Общие затраты за 1-й и 2-й год эксплуатации, лей.	4100	15450
	Цена реализации, лей/тыс. шт.	2000	7 000
	Выручка, лей	4000	21 000
	Прибыль, лей	0	5550
	Уровень рентабельности, %	0	36
3 ГОД	Выход отводков, шт./тыс. кустов	3000	5000
	Затраты на уход, лей	2250	4350
	Цена реализации, лей/тыс. шт.	2000	7 000
	Выручка, лей	6000	35 000
	Прибыль, лей	3750	30650
	Уровень рентабельности, %	166	704
4 ГОД	Выход отводков, шт./тыс. кустов	4000	6000
	Затраты на уход, лей	3000	5100
	Цена реализации, лей/тыс. шт.	2000	7000
	Выручка, лей	8000	42000
	Прибыль, лей	5000	36900
	Уровень рентабельности, %	166	723

При расчёте экономической эффективности в основу были взяты учёты и наблюдения на традиционно размножаемом маточнике и маточнике категории База, а также данные на основании существующих технологических карт по эксплуатации плодовых маточников. Расчёт производился на 1 тыс. растений. В затраты на уход за маточником вошли стоимость основных агротехнических операций, оплата труда и сопутствующие расходы.

В маточнике, заложенном растениями категории База, со второго года эксплуатации расходы увеличились, включив стоимость ежегодного вирусологического тестирования и расходы на отъём отводков (табл. 4.1).

Несмотря на это уже на второй год после посадки наблюдалось преимущество в эксплуатации безвирусного маточника, уровень рентабельности которого был выше на 36 % (табл. 4.1). На третий - четвёртый год эксплуатации рентабельность продолжала повышаться и более чем в три раза превысила показатели рядового маточника.

Исследования показали, что высокие производственные затраты быстро окупались за счёт повышенной продуктивности маточных насаждений, а также за счёт высокого качества отводков, которое отражалось в стоимости материала данной категории.

На основании полученных нами результатов можем сделать вывод что создание маточной плантаций с использованием безвирусных растений, размноженных в культуре *in vitro*, позволит повысить рентабельность маточных насаждений в 2 - 3 раза. Такие маточники дают возможность без риска потерь производить конкурентноспособную качественную продукцию, соответствующую нормам международной системы сертификации посадочного материала. Высокий биологический потенциал такого материала положительно отразится на качестве плодовых саженцев и продуктивности будущих насаждений.

ВЫВОДЫ

В результате проведённых исследований впервые в Республике Молдова разработана технология микроклонального размножения перспективных подвоев для груши Sydo и Pyriam и подвоев яблони 54 - 118 и MM106, позволяющая в ограниченные сроки получить посадочный материал с повышенным биологическим потенциалом.

1. На этапе введения в культуру *in vitro* установлены эффективные приёмы стабилизации асептической культуры - применение препаратов гипохлорит кальция 6 %, пергидроль 15 %, Табидез 56 – 0,5 % позволяют получить до 70 - 80 % стерильного материала. Нивелировано ингибирующее действие полифенолов с помощью обработки эксплантов раствором ПВП 5 % и ПЭГ 5 % м.м. 30000 и 20000. Подобран оптимальный состав питательной среды для развития первичных эксплантов: для подвоя MM106 и Pyriam целесообразно использовать среду с минеральной основой по MS с добавлением БАП 1 мг/л, ИМК 0,5 мг/л, а для подвоев 54 -118 и Sydo модифицированную среду по MS с пониженной в два раза концентрацией макросолей и добавлением БАП 1 мг/л.

2. Для поддержания активной пролиферации у микрорастений подвоя ММ106 и Pyriam рекомендуется культивирование на среде MS в полной концентрации; для подвоя Sydo на MS с пониженным в два раза содержанием азота; а для подвоя 54 - 118 на среде WPM или MS с $\frac{1}{2}$ NH_4NO_3 . Оптимальное соотношение стимуляторов роста (БАП : ИМК) на этапе пролиферации - 2 : 0,5 мг/л для ММ106; 0,5 : 0 мг/л для 54 - 118; 1 : 0 мг/л для Pyriam. Для подвоя Sydo соотношение БАП : НУК - 1 : 0,5 мг/л. Эти условия позволяют получить от 3,3 до 5 дополнительных побега на один исходный. Добавление в питательную среду ГК₃ 0,5 - 1 мг/л повышает количество микрорастений, пригодных к дальнейшему укоренению.

3. Условием для успешного укоренения микропобегов является снижение концентрации минеральных солей на основе среды MS и использовании стимуляторов ауксинового ряда. Для ММ106 и Pyriam оптимальна концентрация ИМК 3 мг/л, для подвоя 54 - 118 ИМК 0,5 мг/л. Sydo лучше укореняется при краткосрочном насыщении на среде с ИМК 3 мг/л и посадке на состав MS без гормонов. Продемонстрирована возможность эффективного ризогенеза у растений на питательных средах без агар - агара.

4. При акклиматизации к нестерильным условиям микрорастения хорошо развиваются на субстрате торф : перлит 1:1, а также на двухслойном питательном субстрате, где верхний слой состоит из перлита мелкой фракции. Оптимизация методов адаптации позволила прижиться до 72 - 81 % растений у подвоев яблони и 58 - 69 % у подвоев для груши. Корневое внесение минерального удобрения Polyfeed 1 % с интервалом 15 - 20 дней способствует хорошему состоянию растений в период вегетации.

5. Выполнены расчёты экономической эффективности эксплуатации маточника подвоя яблони ММ106, посаженного материалом, размноженным в культуре *in vitro*. Продемонстрирована высокая окупаемость маточника категории База, уровень рентабельности которого в 3 - 4 раза превосходил рентабельность рядовых маточных насаждений, что обеспечивалось повышенным выходом отводков и высокой ценой реализации.

6. Применение разработанной технологии микроразмножения позволяет из 10 стерильных эксплантов получить 3000 адаптированных растений подвоя яблони или 2000 адаптированных растений подвоев груши в течении 18 месяцев. Это в 10 раз превышает возможности размножения в естественных условиях.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется внедрение разработанной технологии микроклонального размножения районированных и перспективных подвоев семечковых культур и использование её в качестве инструмента для ускоренного размножения качественного посадочного материала яблони и груши.

2. Закладка маточников безвирусными растениями, размноженными в культуре *in vitro*, позволит производить в Республике Молдова качественный конкурентноспособный посадочный материал, отвечающий международным

нормам сертификации, и ускорит переход питомниководства страны на безвирусную основу.

3. Размножение и поддержание изученных биотипов в культуре *in vitro* предоставит возможность создать резервный банк исходных растений исключая риски их реинфицирования, что гарантирует сохранение чистосортного биоразнообразия семечковых подвоев свободных от вирусов. Кроме того, это позволит начать тиражирование материала в любое время года, минуя этап введения в культуру *in vitro*.

4. На основании полученных результатов для каждого изученного биотипа составлена методика микроклонального размножения, которая может быть использована для руководства при выращивании подвоев груши и яблони.

ИЗБРАННАЯ БИБЛИОГРАФИЯ

1. BABUC, V. Pomicultura. Chişinău: Tipografia Centrală, 2012, 664 p. ISBN 978-9975-53- 067-5.
2. BALAN, V., ŞARBAN, V. Starea pomiculturii în Republica Moldova în ultimele două decenii. In: Horticultură, Viticultură şi vinificaţie, Silvicultură şi grădini publice, Protecţia plantelor: Simp.Şt. Intern. Chişinău, 2018. Vol. 47. pp. 13 - 18. ISBN 978-9975-64-296-5.
3. CALAŞEAN, I. et al. Pepinierit Pomicol doar în baza Materialului devirozat. În: Pomicultura, Viticultura şi Vinificaţia, Chişinau, 2012. nr 2. pp. 9 - 10. ISSN 1857-3142.
4. DIMITROVA, N., NACHEVA, L. An optimized micropropagation protocol by ex vitro rooting of pear rootstock OHF333 (*Pyrus communis* L.) Acta Agrobotanica. 2021. V.74. art.744. DOI 10.5586/aa.744.
5. DOMBRANSKI, J. Micropropagation of apple - A review. Biotechnology advances. Biotechnol Adv. 2010 Jul-Aug; 28(4):462-88. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.02.008.
6. DUMANOGLU, H. and GULSEN, Y. In vitro rooting of quince A. Acta Hort. 367, pp.360-363. DOI: 10.17660/ActaHortic.1994.367.54.
7. EPPO certification scheme for fruit trees, including almond. In: Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 06/2008, vol. 27(4), pp. 571 – 579.
8. **GENDOV, N.**, CHERNETS, A., KOVALENKO, G., Conservation of biodiversity of pome rootstocks in the Republic of Moldova, “Genetics, Physiology and Plant Breeding”, International Scientific Conference. October 7 – 8. 2024. pp. 355 – 358. USM, IGPPP, Scientific Association of Geneticists and Breeders of the Republic of Moldova. ISBN 978- 9975-62-766-5. (PDF).
9. Hotărîrea Guvernului nr. 415 din 21.06.2013. Pentru aprobarea Normei privind producerea, controlul, certificarea şi comercializarea materialului de înmulţire şi de plantare fructifer. În: Monitorul Oficial al Republicii Moldova. 28.06.2013. nr. 136-139.
10. PRODANIUC, L., CALAŞEAN, I., **GHEODOV, N.**, et al. Majorarea sortimentului de clone devirozate a speciilor pomicele. 2020. pp. 266-279. Realizări ştiinţifice în Horticultură, oenologie şi tehnologii alimentare. Chişinău, ISBN 978-9975-56-808-1.
11. RAPCEA, M., DONICA, A., Starea actuală şi evoluţia dezvoltării pomiculturii în perioada de tranziţie de economia de piaţă. Horticultură, viticultură, silvicultură şi protecţia plantelor. Vol. 16. Simpozionul "Agricultura modernă - realizări şi perspective". Chisinau. 2008 pp.151-156, ISBN: 978-9975-64-127-2.
12. SIMARD, M J., MICHELESI, C., MASSERON, A. Pear rootstock breeding in France. ISHS Acta Horticulturae 658: I International Symposium on Rootstocks for Deciduous Fruit Tree Species. ISHS 2004, pp. 535-540.
13. SÎRBU, N. Organizarea bazei tehnico-materiale a pepinierilor pomicele. In: Realizări şi perspective în horticultură, viticultură, vinificaţie şi silvicultură”. Chişinău. 2007, Vol. 15 (1). pp. 138 - 141. ISBN 978-9975-946-31-5.

14. ZEMCIC, E., RAPCEA, M., **COLIBABA, N.** et al. Producerea materialului sâditor pomicol cu un potențial biologic sporit. Cercetări în horticulturna/Institut de Cercetări pentru Pomiculturna: Vol.3. Chisinău. 2004, pp.181-185. ISBN 9975-62-111-2.
15. БУТЕНКО, Р. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнология на их основе. Учеб. пособ. МГУ им. М.В. Ломоносова М: ФБК ПРЕСС. 1999. 159 с. ISBN 5-89240-059-X
16. **КОЛИБАБА, Н.** Культивирование перспективного подвоя для груши и айвы на этапе введения в культуру in vitro. Cercetări în horticulturna/ Institut de Cercetări pentru Pomiculturna: Vol.5. Chisinău. 2006. pp.243 - 246, ISBN 978-9975-62-138-0.
17. **КОЛИБАБА, Н.,** ЧЕРНЕЦ, А. Микроразмножение безвирусного подвоя яблони MM 106. Cercetări în horticulturna/Institut de Cercetări pentru Pomiculturna: Vol.3. pp. 191 - 197, Chisinău. 2004, ISBN 9975-62-111-2.
18. **КОЛИБАБА, Н.** Особенности введения в культуру invitro клоновых подвоев яблони. Agricultura Moldovei. № 3. 2009, с. 15-17, ISSN 0582 5229.
19. **КОЛИБАБА, Н.** Размножение клонового подвоя Sydo на искусственных питательных средах. Agricultura Moldovei. № 4 – 5. 2009, с. 16 – 18. ISSN 0582 5229.
20. КОРБИНЕЦ, П. Микрклональное размножение перспективных клоновых подвоев груши. Плодоводство. Т.29. 2017, с.54 - 58. ISSN 0134-9759. (Print)
21. МАТУШКИНА, О. и др. Технология клонального микроразмножения яблони и груши на основе использования новых питательных сред. Сборник научных трудов ГНБС. Т. 144. 2017. ч. 2. с.77 - 81. ISSN 0201-7997.
22. МАТУШКИНА, О. Оптимизация процессов регенерации при размножении клоновых подвоев и сортов яблони и груши in vitro. автореф. диссерт. на соиск. уч. ст. кандидат. с/х наук. Мичуринск. 2008, с. 23.
23. ПРОНИНА, И. Клональное микроразмножение в системе производства оздоровленного посадочного материала клоновых подвоев груши. Достижения науки и техники АПК. 2014 (5). с. 27 - 29. ISSN: 0235-2451.
24. ПРОДАНЮК, Л. Вирус ямчатости древесины яблони в системе сертификации посадочного материала плодовых культур. Кишинев. 2021, стр. 144. ISBN 978-9975-56-886-9.
25. РАПЧА, М., ДАДУ, К., ДОНИКЭ, И., КАЛАЩЯН, Ю. и др. Система сертификации посадочного материала плодовых культур в Молдове и пути перевода питомниководства Республики на безвирусную основу. Пром. произв-во оздоровл. посад. матер. плодовых, ягодных и цветочно-декор-х культур. Москва. 2001, с. 36 -40.
26. САМУСЬ, В. и др. Методика микроразмножения подвоев яблони in vitro. Методическое обеспечение устойчивого развития современного плодоводства: материалы междунар. науч. конф., Самохваловичи. 2006. Т. 18, ч. 2. с. 147 - 157.
27. СЕМЕНАС, С., ЗМУШКО, А., КУХАРЧИК Н. Технология производства оздоровленных клоновых подвоев яблони. Плодоводство. Т. 26. 2014, с. 64 -78. ISSN 0134-9759. (Print)
28. ТАНКЕВИЧ, В., СОТНИК, А. Изучение клоновых подвоев для груши в отводочном маточнике в Крыму. Агрономия. 23 (186). 2020, с. 5 - 13. ISSN: 2413-1946.
29. ТАШМАТОВА, Л. Укоренение и адаптация груши в условиях in vitro. Современное садоводство, электронный журнал. 1. 2013, ISSN: 2312-6701. (online)
30. ТУРОВСКАЯ, Н. Особенности регенерации апикальной меристемы клоновых подвоев яблони. Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и цветоводстве: сб. науч. тр. Мичуринск. 1989. с. 13 - 17.
31. ЧЕРНЕЦ, А. Получение и микрклональное размножение безвирусных сортов и подвоев косточковых пород в условиях Молдовы. автореф. дис. на соиск. уч. ст. д-ра биол.наук. Кишинев. 1993. с. 16.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ НА ТЕМУ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах национального значения, категория С:

1. **КОЛИБАБА, Н.** Особенности введения в культуру in vitro клоновых подвоев яблони. Agricultura Moldovei № 3. 2009, с. 15 - 17. ISSN 0582 5229.
<https://ru.scribd.com/document/391174265/BNM-3-2009>
2. **КОЛИБАБА, Н.** Размножение клонового подвоя Sydo на искусственных питательных средах. Agricultura Moldovei. № 4 - 5. 2009. с. 16 - 18. ISSN 0582 5229.
<https://ru.scribd.com/document/391174268/BNM-5-2009>
3. **ЧЕРНЕЦ, А., ГЕНДОВ, Н.** и др. Динамика производства и реализации черенков семечковых пород с безвирусного маточно- черенкового сада категории «База». Pomicultura, viticultura si vinificatia. 2016. № 2 (62). pp. 6 - 9. ISSN 1857-3142.
https://ibn.idsi.md/sites/default/files/j_nr_file/Pomicultura-ViticulturaVinificatia-nr-2_2016.pdf
4. **КОВАЛЕНКО, Г., ГЕНДОВ Н.** Сохранение генофонда клоновых подвоев косточковых пород методами биотехнологии. Pomicultura, viticultura, vinificatia. 2016. № 3 (63). с 10 - 11 ISSN 1857-3142. https://ibn.idsi.md/sites/default/files/j_nr_file/Pomicultura-ViticulturaVinificatia-nr-3_2016.pdf

Статьи в сборниках международных научных конференций (Республика Молдова):

5. **КОЛИБАБА, Н.** Предварительные результаты клонального микроразмножения подвоев семечковых культур на этапе пролиферации. În: Lucrări științifice. UASM. Chișinău. 2005. Vol 14. (Horticultura, viticultura, silvicultura, protecția plantelor). pp. 58 - 61. ISBN 9975-64-061-3.
6. **КОЛИБАБА, Н., ЧЕРНЕЦ, А.** Зависимость между содержанием ауксина в питательной среде и процентом приживаемости микрорастений подвоя ММ 106 в нестерильных условиях. În: Lucrări științifice. UASM. Chișinău. 2007. vol.15 (1). (Horticultură, viticultură, vinificație și silvicultură). pp. 132 – 134. ISBN 978-9975-946-31-5.
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/106879
7. **КОЛИБАБА, Н.** Оптимизация этапов клонального размножения подвоя персика GF 677: În :Lucrări științifice UASM. Chișinău. 2010. Vol 24 (1). (Horticultura, viticultura și vinificație, silvicultura și grădini publice, protecția plantelor). стр.43-46. ISBN 978-9975-64-191-3.
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/91446
8. **GENDOV, N., CHERNETS, A.** etc. Preliminary results of micropropagation of vegetative rootstock for plum and apricot Wavit, În: Lucrări științifice UTM “Modern October 5-6. 2023. pp. 48. ISBN 978-9975-64-360-3. (PDF). https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/192876
9. **GENDOV, N., CHERNETS, A., KOVALENKO, G.,** Conservation of biodiversity of pome rootstocks in the Republic of Moldova, “Genetics, Physiology and Plant Breeding”, International Scientific Conference. October 7 – 8. 2024. pp. 355 – 358. USM, IGPPP, Scientific Association of Geneticists and Breeders of the Republic of Moldova. ISBN 978- 9975-62-766-5. (PDF)
https://ibn.idsi.md/sites/default/files/imag_file/355-358_12.pdf

Статьи в других сборниках научных трудов, изданных в Республике Молдова:

10. **КОЛИБАБА, Н., ЧЕРНЕЦ, А.** Микроразмножение безвирусного подвоя яблони ММ 106. Cercetări în Pomicultura. Institut de Cercetări pentru Pomicultura: Vol.3. Chisinau. 2004. pp. 191 - 196. ISBN 9975-62-111-2.
11. **ЧЕРНЕЦ, А., КОЛИБАБА, Н.** Дорацивание вегетативных подвоев яблони, полученных из культуры ткани. Cercetări în Pomicultura. Institut de Cercetări pentru Pomicultura: Vol.4, p. 227-232, Chisinau, 2005. ISBN 9975-62-146-5.
12. **PRODANIUC, L., GHENDOV, N.** et.al. Majorarea sortimentului de clone devirozate a speciilor pomicele. În: Lucrări științifice UASM. Chișinău. 2020. pp. 266 – 279. Realizări științifice în horticultură, oenologie și tehnologii alimentare. ISBN 978-9975-56-808-1.

Статьи в сборниках научных трудов, изданных за рубежом:

13. **GENDOV N., KALASHAN, I.** и др. Розмноження вегетативної підщепи Кримськ 6 в Республіці Молдова. Матеріали XII міжнародної наукової конференції «Селекційно - генетична наука і освіта». Україна. Умань. 2023. с 47-52.

АННОТАЦИЯ

Гендов Наталья, “Разработка технологического процесса микроразмножения районированных и перспективных в Республике Молдова клоновых подвоев семечковых культур”, диссертация на соискание учёной степени доктора сельскохозяйственных наук, Кишинэу, 2025.

Диссертация изложена на 155 страницах печатного текста и включает введение, 4 главы, выводы и рекомендации, 265 библиографических источника, 11 рисунков, 52 таблицы, 6 приложений. Результаты опубликованы в 13 научных работах.

Ключевые слова: питомниководство, безвирусный материал, подвои, яблоня, груша, *in vitro*, питательные среды, микроразмножение, укоренение, акклиматизация.

Область исследований: 411.06 - Плодоводство.

Цель работы: разработать технологию микроклонального размножения районированных и перспективных подвоев семечковых культур для внедрения и использования её в качестве инструмента для ускоренного размножения высококачественного посадочного материала яблони и груши.

Задачи исследований: разработать приёмы получения асептической культуры и условия регенерации стерильных эксплантов; оптимизировать состав питательной среды для инициации эксплантов в культуру *in vitro* и микроклонального размножения подвоев; подобрать химический состав питательной среды, тип ауксина, его оптимальную концентрацию и способ воздействия на микропогреб, обеспечивающие высокий уровень ризогенеза на этапе укоренения изучаемых подвоев; изучить альтернативные методы стимуляции процессов пролиферации и ризогенеза микрорастений; разработать эффективные приёмы адаптации пробирочных растений к нестерильным условиям.

Новизна исследований: впервые в Республике Молдова разработана технология микроклонального размножения перспективных подвоев для груши Sydo и Pyriam (ОН - 11), для яблони 54 - 118, а также районированного подвоя яблони MM106.

Решенная научная проблема: были преодолены основные проблемы на каждом этапе размножения *in vitro* - получение стерильной культуры с использованием экологически безопасных препаратов, размножение однородного, генетически стабильного материала; повышение эффективности процессов пролиферации и ризогенеза с помощью альтернативных методов, усовершенствование методов адаптации растений *ex vitro*.

Теоретическое значение работы: разработанная нами технология может быть использована для руководства при микроклональном размножении подвоев MM106, 54 - 118, Sydo и Pyriam в условиях *in vitro*. Полученные результаты дополняют теоретические данные, накопленные в области микроразмножения плодовых подвоев.

Прикладное значение: внедрение разработанной технологии в процесс производства посадочного материала будет способствовать ускоренному размножению здоровых, генетически идентичных клонов изучаемых биотипов, обладающих повышенным биологическим потенциалом; ускорит переход питомниководства Молдовы к производству сертифицированного посадочного материала; откроет новые перспективы для возделывания таких важных культур как груша и яблоня.

Внедрение научных результатов: с помощью разработанной технологии микроклонального размножения подвоев семечковых культур был размножен районированный в Молдове подвой яблони MM106, который был высажен в безвирусный маточник категории База Научно - Практического Института Садоводства Виноградарства и Пищевых Технологий, а также передан в питомниководческие хозяйства GT “Melnic Ioana Feodor” и GT “Sebotari Feodor Mihail” (с. Средние Жоры, Оргеевского района). Подвои 54 - 118, Sydo, Pyriam размноженные нами *in vitro*, были переданы в питомник экспериментальной станции Кодру бывшего Научно - Исследовательского Института Плодоводства для расширенного изучения новых сортоподвойных комбинаций.

ADNOTARE

Gendov Natalia, „Elaborarea procesului tehnologic de micromultiplicare a clonelor de portaltoai de specii sămânțoase omologate și de perspectivă în Republica Moldova”

teza pentru titlul de doctor în științe agricole, Chișinău, 2025.

Teza este expusă pe 155 pagini de text de baza, include introducerea, 4 capitole, concluzii generale și recomandări practice, 52 tabele, 11 figuri, 6 anexe, 265 surse bibliografice. Rezultatele au fost publicate în 13 lucrări științifice.

Cuvinte cheie: ramură pepenieristică, material devirozat, portaltoi clonal, măr, păr, *in vitro*, medii nutritive, multiplicare microclonală, înrădăcinare, aclimatizare.

Domeniul de cercetare: 411.06 - Pomicultură.

Scopul lucrării: constă în elaborarea tehnologiei de micromultiplicare clonală a portaltoaielor de specii sămânțoase omologate și de perspectivă pentru implementare și utilizare ca metodă pentru producerea accelerată a materialului săditor de înaltă calitate pentru măr și păr.

Obiectivele cercetării: elaborarea procedeele de sterilizare a vîrfurilor apicale a portaltoaielor culturilor sămânțoase și condițiilor de regenerare a explanților sterili; optimizarea mediului nutritiv pentru inițierea în cultura *in vitro* și multiplicării microclonale a portaltoaielor; selectarea componentei chimice a mediului nutritiv, tipului de auxină, concentrației optime și modul de interacțiune asupra microlăstarului, care asigură un nivel de rizogeneză înalt la etapă înrădăcinării portaltoaielor cercetate; studierea metodelor alternative de stimulare proceselor de proliferare și rizogeneză a plantelor; elaborarea procedeele efective de adaptare a plantelor de ieprubetă la condițiile nesterile de seră.

Noutatea cercetării: pentru prima dată în Republica Moldova a fost elaborată și prezentată tehnologia de înmulțire microclonală a portaltoaielor de perspectivă pentru păr Sydo și Pyriam și măr 54-118, precum și pentru portaltoi omologat de măr MM106.

Problema științifică rezolvată: au fost depășite principalele dificultăți la fiecare etapă de multiplicare *in vitro* - obținerea unei culturi sterile cu posibilitatea de a utiliza preparate mai puțin poluante; obținerea de material omogen stabil genetic; creșterea eficienței proceselor de proliferare și rizogeneză folosind metode alternative; modernizarea metodelor de adaptare a microplantelor la condiții nesterile.

Semnificația teoretică a lucrării: tehnologia de micropropagare pe care am elaborato poate fi utilizată pentru a ghida clonarea *in vitro* a portaltoiurilor MM106, 54-118, Sydo și Pyriam. Rezultatele obținute completează datele teoretice acumulate în domeniul micropropagării portaltoaielor pomicoli.

Semnificația aplicativă: implementarea tehnologiei elaborate în ciclul de producere materialului săditor va contribui la multiplicarea accelerată a materialului de portaltoi sănătos, identic genetic, cu potențial biologic sporit; va accelera tranziția pepinierelor din țară către producerea de material săditor certificat; va deschide noi perspective pentru cultivarea unor specii atât de importante precum mărul și părul.

Implementarea rezultatelor științifice: cu ajutorul tehnologiei elaborate de multiplicare microclonală a portaltoaielor sămânțoase a fost înmulțit portaltoiul de măr MM106, omologat în Moldova, care a fost plantat într-o plantație-mamă devirozată de categoria biologică BAZĂ în Institutului Științifico - Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare și de asemenea transferat în pepinierele GT „Melnic Ioana Feodor” și GT „Cebotari Feodor Mihail” (s. Jora de Mijloc, raionul Orhei). Portaltoiurile 54 - 118, Sydo, Pyriam, înmulțite de noi *in vitro*, au fost transferate în pepiniera stației experimentale Codru a fostului Institutul Științific de Pomicultura pentru un studiu extins al noilor combinații soi - portaltoi.

ANNOTATION

Gendov Natalia, "Elaboration of a technological process for micropropagation of zoned and promising clonal rootstocks of pome crops in Republic of Moldova." dissertation for the degree of Doctor of Agricultural Sciences, Chisinau, 2025

Structure of the dissertation: introduction, 4 chapters, conclusions and recommendations, on 155 pages of the main text, 265 bibliographic sources, 11 figures, 52 tables. The results were published in 13 scientific papers.

Key words: nursery, virus free material, nutrient media, clonal rootstocks, apple, pear, microclonal propagation, *in vitro*, rooting, acclimatization, methods, pome species.

Area of research: 411.06 - Fruit Growing.

Purpose of the work: to develop a technology for microclonal propagation of zoned and promising rootstocks of pome crops for its implementation and use as a method for accelerated propagation of high-quality planting material for apple and pear trees.

The objectives of the research: to develop methods for obtaining aseptic culture and conditions for the regeneration of sterile explants. To optimize the composition of the nutrient medium for the initiation of explants and microclonal propagation of rootstocks. To select the chemical composition of the nutrient medium, the type of auxin, its optimal concentration and the method of influencing the microshoot, ensuring a high level of rhizogenesis at the rooting stage. To study alternative methods for increasing the efficiency of proliferation and rhizogenesis processes in microplants. To develop effective methods for adapting microplants to non - sterile conditions.

Originality of research: for the first time in Moldova, a technology for the microclonal propagation of rootstocks was developed and presented for protection for the pear rootstocks Sydo and Pyriam (OH - 11), the apple rootstock 54 - 118, as well as the zoned apple rootstock MM106.

Resolved scientific problem: the main challenges at each stage of *in vitro* propagation were overcome - obtaining a sterile culture using environmentally safe preparations; reproduction of homogeneous, genetically stable material; increasing the efficiency of proliferation and rhizogenesis using alternative methods and improving the *ex vitro* adaptation stage of plants.

Theoretical significance: the developed microclonal propagation technology can be used as a guide for cloning the MM106, 54-118, Sydo and Pyriam rootstocks *in vitro*. The results obtained expand the theoretical data accumulated in the field of fruit rootstocks micropropagation.

Practical significance: the introduction of the developed technology into the production process of planting material will facilitate the accelerated reproduction of healthy, genetically identical clones of the studied biotypes with increased biological potential; it will accelerate the transition of Moldavian nurseries to the production of certified planting material and it will open up new prospects for the cultivation of such important crops as pears and apples.

Implementation of scientific results: the developed microclonal propagation technology made it possible to propagate the zoned in Moldova apple rootstock MM106, which was planted in a virus-free mother orchard of the "Base" category at the Scientific and Practical Institute of Horticulture, Viticulture, and Food Technologies. It was also transferred to the nursery farms GȚ "Melnic Ioana Feodor" and GȚ "Cebotari Feodor Mihail" (Orhei). The 54 - 118, Sydo, and Pyriam rootstocks propagated *in vitro* were transferred to the nursery of the Codru Experimental Station of the Scientific Research Institute of Fruit Growing for an expanded study of new variety-rootstock combinations.

**INSTITUȚIA PUBLICĂ INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETĂRI
APLICATIVE ÎN AGRICULTURĂ ȘI MEDICINA VETERINARĂ**

Cu titlu de manuscris
CZU: 634.10:581.143.6 (478,9)

GENDOV NATALIA

**ELABORAREA PROCESULUI TEHNOLOGIC DE
MICROMULTIPlicARE A CLONELOR DE PORTALTOAIE
A SPECIILOR SĂMÂNȚOASE OMOLOGATE ȘI DE
PERSPECTIVĂ ÎN REPUBLICA MOLDOVA**

411.06 - POMICULTURĂ

Rezumatul tezei de doctor în științe agricole

CHISINĂU, 2025

ГЕНДОВ НАТАЛЬЯ

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ РАЙОНИРОВАННЫХ И
ПЕРСПЕКТИВНЫХ В РЕСПУБЛИКЕ МОЛДОВА
КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ СЕМЕЧКОВЫХ КУЛЬТУР**

411.06 - ПЛОДОВОДСТВО

**Автореферат диссертации на соискание учёной степени
доктора сельскохозяйственных наук**

Aprobat spre tipar: 8.05.2025

Formatul hârtiei: A4

Hârtie offset. Tipar digital

Tiraj: 50 ex.

Coli de tipar: 2,4

Comanda nr. 50

Tipografia PRINT-CARO
m. Chisinau, str. Columna, 170
printcaro@gmail.com
tel. 069124696