

**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

Диссертация на соискание учёной степени доктора
сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:



Рапча Михаил,
доктор хабилитат сельскохозяйственных
наук, профессор исследователь

Научный консультант:



Доника Илья,
доктор хабилитат сельскохозяйственных
наук, профессор исследователь

Автор :



Гендов Наталья

КИШИНЭУ, 2025

**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
SPECILOR SĂMÂNȚOASE OMOLOGATE ȘI DE
PERSPECTIVĂ ÎN REPUBLICA MOLDOVA**

411.06– POMICULTURĂ

Teză de doctor în științe agricole

Conducător științific:



Rapcea Mihail,
doctor habilitat în științe agricole,
profesor cercetător

Consultant științific:



Donica Ilie,
doctor habilitat în științe agricole,
profesor cercetător

Autor:



Gendov Natalia

CHISINĂU, 2025

© ГЕНДОВ НАТАЛЬЯ, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

АННОТАЦИЯ	6
СПИСОК ТАБЛИЦ	9
СПИСОК РИСУНКОВ	13
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	14
ВВЕДЕНИЕ	15
1. АНАЛИЗ СИТУАЦИИ В ОБЛАСТИ РАЗВИТИЯ МЕТОДОВ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ	23
1.1. Сущность микроклонального размножения растений и история возникновения метода	23
1.2. Применение методов культуры <i>in vitro</i> в практике размножения растений.	26
1.2.1. Введение эксплантов в культуру <i>in vitro</i>	27
1.2.2. Микроклональное размножение	34
1.2.3. Укоренение микрорастений <i>in vitro</i>	42
1.2.4. Адаптация к нестерильным условиям	46
1.3. Размножение клоновых подвоев семечковых культур методом культуры клеток и тканей	49
1.4. Выводы к главе	51
2. ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ И МЕТОДЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	52
2.1. Объекты и условия проведения исследований	52
2.2. Методы научных исследований на основных этапах технологии микроклонального размножения	57
2.2.1. Этап введения в культуру <i>in vitro</i>	57
2.2.2. Микроклональное размножение подвоев	60
2.2.3. Укоренение подвоев <i>in vitro</i>	61
2.2.4. Адаптация укоренённых растений к нестерильным условиям	62
2.3. Планирование и постановка экспериментов	63
2.4. Выводы к главе	70
3. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ПОДВОЕВ СЕМЕЧКОВЫХ КУЛЬТУР	71
3.1. Введение в культуру <i>in vitro</i> эксплантов подвоев семечковых культур	71
3.1.1. Стерилизация исходного материала	71
3.1.2. Подбор питательных сред для введения в культуру <i>in vitro</i>	85
3.2. Микроклональное размножение подвоев семечковых культур	90
3.3. Укоренение подвоев семечковых культур в условиях <i>in vitro</i>	107
3.4. Адаптация растений в условиях <i>ex vitro</i>	119

3.5. Выводы к главе	127
4. ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МАТОЧНИКА КЛОНОВОГО ПОДВОЯ ЯБЛОНИ ММ106	130
4.1. Расчет экономической эффективности эксплуатации маточника	130
4.2. Выводы к главе	132
ВЫВОДЫ	133
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	134
БИБЛИОГРАФИЯ	135
ПРИЛОЖЕНИЯ	156
ДЕКЛАРАЦИЯ ОБ ОТВЕТСТВЕННОСТИ	170
CURRICULUM VITAE	171

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, подвой, яблоня, груша, *in vitro*, питательные среды, микроразмножение, укоренение, акклиматизация.

Область исследований: 411.06 - Плодоводство.

Цель работы: разработать технологию микрклонального размножения районированных и перспективных подвоев семечковых культур для внедрения и использования её в качестве инструмента для ускоренного размножения качественного 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 микроразмножения 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 повышения эффективности процессов пролиферации и ризогенеза микрорастений; разработать эффективные приёмы адаптации пробирочных растений к нестерильным условиям.

Новизна исследований: впервые в Республике Молдова разработана технология микрклонального размножения перспективных подвоев для груши Sydo и Pyriam (ОН-11), яблони- 54-118, а также районированного подвоя яблони ММ106.

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 пролиферации и ризогенеза с помощью альтернативных методов, усовершенствование этапа адаптации растений *ex vitro*.

Теоретическое значение работы: разработанная технология микрклонального размножения может быть использована для руководства при клонировании подвоев ММ106, 54-118, Sydo и Pyriam. 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 изученных 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 микрклонального размножения подвоев семечковых культур был размножен районированный в Молдове подвой яблони ММ106, который был высажен в безвирусный маточник категории База Научно - Практического Института Садоводства Виноградарства и Пищевых Технологий, а также передан в питомниководческие хозяйства ГТ “Melnic Ioana Feodor” и ГТ “Sebotari Feodor Mihail” (с. Средние Жоры, Оргеевского района). Подвой 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 комбинации.

ADNOTARE

Gendov Natalia, „Elaborarea procesului tehnologic de micromultiplicare a clonelor de portaltoaie a speciilor 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, micromultiplicare, 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 procedeelelor 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 componenței 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 procedeelelor 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 proliferării și rizogenezei 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 portaltoaielor MM106, 54-118, Sydo și Pyriam. Datele obținute completează datele teoretice acumulate în domeniul micropropagării portaltoaielor pomicali.

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 asemeni transferat în pepinierele GȚ „Melnic Ioana Feodor” și GȚ „Cebotari Feodor Mihail” (s. Jora de Mijloc, raionul Orhei). Portaltoiurile 54-118, Sydo, Pyriam, înmulțite *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.

Список таблиц

Таблица 2.1. Композиция минеральных солей в питательных средах для микроклонального размножения изучаемых подвоев	59
Таблица 2.2. Экспериментальные схемы по стерилизации эксплантов подвоев семечковых культур	63
Таблица 3.1. Влияние стерилизующих препаратов на получение асептической культуры вегетирующих верхушек подвоя яблони ММ106	71
Таблица 3.2. Стерилизация клоновых подвоев яблони в зависимости от вида экспланта	73
Таблица 3.3. Стерилизация клоновых подвоев для груши в зависимости от вида экспланта	74
Таблица 3.4. Стерилизация вегетирующих верхушек подвоев семечковых культур препаратом Табидез 56	75
Таблица 3.5. Дисперсионный анализ стерилизации подвоев семечковых культур препаратом Табидез 56	77
Таблица 3.6. Стерилизация вегетирующих верхушек подвоев семечковых культур раствором Пергидроль	78
Таблица 3.7. Дисперсионный анализ результатов стерилизации изучаемых подвоев раствором Пергидроль	79
Таблица 3.8. Влияние схемы стерилизации и изучаемых биотипов на качественные показатели изолированных эксплантов	80
Таблица 3.9. Оптимизация процесса стерилизации эксплантов подвоя яблони ММ106	83
Таблица 3.10. Развитие эксплантов подвоев семечковых культур в зависимости от минерального состава питательной среды	85
Таблица 3.11. Развитие эксплантов подвоев семечковых культур в зависимости от концентрации стимуляторов роста в питательной среде	87
Таблица 3.12. Дисперсионный анализ влияния концентрации стимуляторов роста на развитие эксплантов изучаемых подвоев	88
Таблица 3.13. Действие флороглюцинола в питательной среде на развитие эксплантов подвоев яблони	91
Таблица 3.14. Влияние минерального состава питательных сред на коэффициент размножения подвоев яблони	91

Таблица 3.15. Дисперсионный анализ влияния минерального состава питательных сред на коэффициент размножения подвоев яблони	92
Таблица 3.16. Коэффициент размножения подвоев яблони и его достоверность на питательных средах с разным минеральным составом	92
Таблица 3.17. Дисперсионный анализ влияния минерального состава питательной среды на среднюю высоту побегов подвоев яблони	93
Таблица 3.18. Средние значения высоты микропобегов у подвоев яблони на разных минеральных составах питательных сред и их достоверность	93
Таблица 3.19. Влияние минерального состава питательных сред на коэффициент размножения подвоев груши	94
Таблица 3.20. Дисперсионный анализ влияния минерального состава питательной среды на коэффициент размножения подвоев груши	94
Таблица 3.21. Дисперсионный анализ влияния минерального состава питательной среды на среднюю высоту побегов подвоев груши	95
Таблица 3.22. Влияние стимуляторов роста на размножение микропобегов подвоев семечковых культур	96
Таблица 3.23. Дисперсионный анализ влияния стимуляторов роста на пролиферацию подвоев семечковых культур	97
Таблица 3.24. Влияние стимуляторов роста на высоту микропобегов подвоев семечковых культур	98
Таблица 3.25. Дисперсионный анализ влияния концентрации стимуляторов роста на среднюю длину побегов	100
Таблица 3.26. Влияние витаминов и концентрации сахарозы в питательной среде на размножение подвоев семечковых культур	101
Таблица 3.27. Показатели коэффициента размножения подвоев семечковых культур в зависимости от расположения побега на питательной среде	102
Таблица 3.28. Влияние гиббереллиновой кислоты на формирование дополнительных побегов у подвоев яблони	104
Таблица 3.29. Дисперсионный анализ влияния гиббереллиновой кислоты на размножение микропобегов яблони	104
Таблица 3.30. Влияние пониженных концентраций стимуляторов роста на высоту побегов подвоев семечковых культур на этапе удлинения	106
Таблица 3.31. Укоренение подвоев семечковых культур в условиях <i>in vitro</i>	107

зависимости от вида ауксина

Таблица 3.32. Дисперсионный анализ влияния ауксина на укоренение микропобегов изучаемых подвоев	108
Таблица 3.33. Укоренение подвоев яблони в зависимости от изменений концентрации макро- и микросолей в питательной среде Мурасиге – Скуга	109
Таблица 3.34. Укоренение микропобегов яблони в зависимости от концентрации углеводов в питательной среде	110
Таблица 3.35. Укоренение подвоев семечковых культур в зависимости от концентрации минеральных солей, стимуляторов корнеобразования и способа насыщения ауксином	111
Таблица 3.36. Эффективность ризогенеза при разных концентрациях ауксина в питательной среде	112
Таблица 3.37. Эффективность ризогенеза при пересадке укореняемых побегов на безгормональную среду после насыщения ауксином	112
Таблица 3.38. Динамика процесса укоренения подвоя яблони ММ106 на питательных средах с разной концентрацией ауксина	113
Таблица 3.39. Влияние активированного угля на процесс корнеобразования у подвоя ММ106	114
Таблица 3.40. Укоренение микропобегов яблони на питательных средах разной плотности	115
Таблица 3.41. Показатели качества микропобегов яблони укоренившихся в условиях <i>in vitro</i>	116
Таблица 3.42. Показатели качества микропобегов подвоев для груши, укоренившихся в условиях <i>in vitro</i>	117
Таблица 3.43. Результаты укоренения подвоев семечковых культур за весь период наблюдений	118
Таблица 3.44. Приживаемость и развитие растений подвоя яблони ММ106 на разных субстратах при адаптации в теплице	120
Таблица 3.45. Влияние субстрата на приживаемость и рост укоренённых микропобегов	120
Таблица 3.46. Приживаемость микрорастений изучаемых подвоев на этапе акклиматизации	122

Таблица 3.47. Приживаемость растений подвоя яблони ММ106 на этапе акклиматизации в зависимости от условий индукции ризогенеза <i>in vitro</i>	123
Таблица 3.48. Процент приживаемости растений ММ106 при доращивании в теплице	124
Таблица 3.49. Влияние минерального питания на прирост растений подвоя яблони ММ106	125
Таблица 3.50. Экономическая эффективность маточников клонового подвоя яблони ММ106	131

Список рисунков

Рисунок 2.1. Комната для культивирования микрорастений в условиях <i>in vitro</i> .	54
Рисунок 2.2. Процесс извлечения экспланта при введении в культуру <i>in vitro</i> .	55
Рисунок 3.1. Стерилизация вегетирующих верхушек подвоев семечковых культур.	81
Рисунок 3.2. Стерилизация верхушек искусственно пробуждённых черенков	82
Рисунок 3.3. Микроразмножение подвоя Sydo в условиях <i>in vitro</i> .	99
Рисунок 3.4. Микроразмножение подвоя яблони 54-118 в условиях <i>in vitro</i> .	99
Рисунок 3.5. Влияние разных концентраций БАП : ГК ₃ в питательной среде на выход растений высотой более 15 мм.	105
Рисунок 3.6. Приживаемость микрорастений ММ106 в зависимости от внесения минеральных удобрений.	121
Рисунок 3.7. Развитие микрорастений подвоя ММ106 в зависимости от внесения минеральных удобрений	121
Рисунок 3.8. Адаптированный в теплице подвой яблони ММ106	126
Рисунок 3.9. Адаптированный в теплице подвой яблони 54-118	126

Список сокращений

- БАП - 6-бензиламинопурин
- ВБДЯ - вирус бороздчатости древесины яблони
- ВХПЛЯ - вирус хлоротической пятнистости листьев яблони
- ВЯДЯ - вирус ямчатости древесины яблони
- ГК₃ - гиббереллиновая кислота
- ИМК - 3-индолилмасляная кислота
- ИУК - 3-индолилуксусная кислота
- ИФА - иммуноферментный анализ
- ИЭМ - иммуноэлектронная микроскопия
- НИПИСХВМ - Национальный Институт Прикладных Исследований в области Сельского Хозяйства и Ветеринарной Медицины
- НПИСВПТ - Научно - Практический Институт Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий
- НИИП - Научно - Исследовательский Институт Плодоводства
- НСР - наименьшая существенная разница
- НУК - нафтилуксусная кислота
- ПАВ - поверхностно активные вещества
- ПВП - поливинилпирролидон
- ПЭГ - полиэтиленгликоль
- ФАВ - физиологически активные вещества
- В5 - питательная среда на основе минеральных солей Гамборга
- К - калий
- N - азот
- MS - питательная среда на основе минеральных солей по Мурасиге и Скугу
- P - фосфор
- WPM - питательная среда на основе минеральных солей по Ллойд-Маккауно (Woody Plant Medium)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень изученности темы исследований

На сегодняшний день плодоводство остаётся важной отраслью в сельском хозяйстве Республики Молдова и является устойчивой социальной и экономической опорой страны [18; 31].

Современное направление развития этой отрасли ориентируется на создание плотных малогабаритных насаждений интенсивного типа, закладка которых возможна только при использовании клоновых подвоев [1; 8; 9; 13; 14; 103; 182; 198; 248]. Им принадлежит энергосберегающая роль в регулировании роста деревьев, которую невозможно компенсировать другими приёмами, воздействующими на ростовой потенциал [16; 115; 129; 181; 182]. Кроме того, клоновые подвои оказывают влияние на совместимость с сортами, скороплодность, продуктивность [114], прочность закрепления в почве, влияют на адаптивные способности привитых сортов к неблагоприятным факторам и устойчивость к вредителям и болезням [6; 94; 127; 156; 248].

Важное значение при этом имеет качество посадочного материала [135; 175], что в последние десятилетия является серьёзной проблемой и определяет необходимость создания мощной базы безвирусных оригинальных маточников клоновых подвоев и перевод питомниководства на выращивание сертифицированного посадочного материала [50; 79; 88; 175; 179; 207].

Маточные и промышленные насаждения, заложенные таким материалом, способны максимально реализовать свой генетический потенциал. От качества посадочного материала во многом зависит дальнейшее состояние плодовых деревьев, продуктивность будущих садов, а, следовательно, и эффективность отрасли [97]. Сады, заложенные сертифицированным материалом, обладают долговечностью и повышенной продуктивностью, в пределах 25 - 30 %, по сравнению с обычными насаждениями [50; 248].

Несмотря на то, что нормативная база по сертификации соответствует международным требованиям [54; 63; 186], в стране 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 [247; 248]. Развитие питомниководства Молдовы и оперативное расширение производства высококачественного посадочного материала является первостепенной задачей [27; 79; 186; 207]. Мощным инструментом для этого

является использование микроклонального размножения [149], что служит основой данной научной работы.

Научный и производственный опыт показывает, что это один из самых перспективных путей ускоренного размножения вегетативных подвоев. В ряде развитых стран (Франции, Голландии, Германии, Польше) этот метод прочно вошел в практику садоводства и используется на промышленной основе для закладки маточников по производству безвирусного посадочного материала [77; 190].

Во многих регионах мира важными промышленными культурами из семечковых пород являются яблоня и груша [34; 248]. В Молдове плантации этих пород ежегодно сокращаются за счёт раскорчёвки старых насаждений и ограниченной посадки молодых садов [15; 17; 39; 83]. Особенно слабо развита грушевая отрасль, в то время как рынок сбыта груши также является перспективным, с постоянно возрастающим потреблением [149; 197], а плоды этой культуры представляют ценный продукт питания для человека [128; 248].

По данным Национального бюро статистики Республики Молдова [232] на территории нашей страны плодовые насаждения семечковых культур занимают 62,5 тыс. га - из них площадь яблоневых садов 58,1 тыс.га, грушевых 3,1 тыс.га. Ограничивающим фактором распространения этих пород является недостаточное местное производство качественного подвойного материала, а также отсутствие широкого ассортимента вегетативных подвоев груши, их слабая изученность [2; 248].

На европейском континенте из подвоев яблони наибольшее распространение получили подвой серии М и ММ (Ист-Молингская опытная станция), серии В (селекция В.И. Будаговского), серии Р (польская селекция) [127]. При выращивании груши в качестве слаборослых подвоев нашли применение клоновые подвой айвы (*Cydonia oblonga*) - айва А (или МА, Анжерская), айва С (или МС, английская карликовая), айва ВА 29 [35; 197; 198; 203; 248].

В Молдове перечень районированных клоновых подвоев для яблони и груши достаточно узок. Динамика государственных сортоиспытаний семечковых подвоев и их регистрация в каталоге разрешённых для использования, не соответствует реальным потребностям плодородческого сектора страны [247]. В реестр включены подвой М4, М-26, ММ106, 62-396, М-9, айва А, ВА-29, а также сеянцы груши, которые часто используются при производстве привитых саженцев.

Основным недостатком применения этих подвоев у груши является низкая биологическая совместимость с большинством сортов, подверженность хлорозу и

чувствительность к вирусным заболеваниям, а также недостаточная зимостойкость; у яблони- сила роста, якорность, ломкость древесины, предрасположенность к болезням, уязвимость перед важнейшими климатическими рисками - засухой и морозами [29; 30; 86; 101; 121; 123; 248].

Особенности почв нашей зоны [93], дефицит осадков и другие неблагоприятные факторы среды требуют тщательного подбора подвоев. Изложенное определяет существование проблемы, требующей разрешения, и стимулирует к поиску и внедрению новых биотипов, перспективных для эколого-географической зоны нашей страны [122; 131; 156; 197].

В Научно - Исследовательском Институте Плодоводства (НИИП) в отделе питомниководства во главе с доктором с/х наук Мындра В. Г. проводились работы по изучению хозяйственно - биологических свойств новых подвойных форм, выделению из числа изучаемых наиболее перспективных и адаптированных к местным условиям [177; 178]. Нам были предложены для разработки технологии микроклонального размножения подвой яблони российской селекции 54-118 и французские подвои для груши - айва Sydo и груша Ругіам, а также районированный в Молдове подвой яблони ММ106.

Выбор в пользу подвоя 54-118 обоснован его широкими адаптационными возможностями; морозо - и засухоустойчивостью, хорошим креплением в грунте, стабильными урожаями [8; 182; 198].

Подвои Ругіам и Sydo - результат селекционной работы Анжерской опытной станции в Франции. Ругіам (ОН-11) - получен в результате свободного опыления потомства груши Old Home - отличается компактностью кроны и толерантностью к бактериальному ожогу. Sydo получил распространение как грушевый подвой высокоустойчивый к карбонатам почвы, с ранним вступлением в плодоношение [34; 203; 231; 233], что экономически выгодно и эффективно для отрасли.

Микроразмножение этих подвоев поможет открыть долгосрочные перспективы для возделывания культуры яблони и груши, предоставит возможность их изучения, внедрения и массового воспроизводства для закладки скороплодных интенсивных насаждений.

Клональное размножение растений - это самое современное, динамично развивающееся направление в размножении посадочного материала с повышенным биологическим потенциалом. Метод выгодно сочетает в себе преимущества размножения в условиях *in vitro* с требованиями современного питомниководства [70; 186]. Для этого используют небольшие апикальные фрагменты растений, содержащие меристематические

клетки. В результате из одного растения или его части можно получить множество микроклонов - миниатюрных копий оригинального организма [212].

Высокий коэффициент размножения растений *in vitro* и возможность работы круглый год позволяют в короткие сроки с оптимальными затратами размножить посадочный материал до необходимого количества и покрыть возникающий производственный дефицит, что сегодня крайне необходимо.

Метод позволяет быстро вывести на рынок новые биотипы и сорта растений; даёт возможность получить высококачественный безвирусный материал в соответствии с установленными требованиями европейской сертификации [32; 46; 186].

Несмотря на это, существующие сегодня методы микроразмножения древесных и плодовых пород не являются идеальными [70; 96; 196]. В практическом аспекте на каждом технологическом этапе существует узкое место, требующее углубленного изучения, доработки и решения проблем. В то же время, существует немалое количество растительных видов, демонстрирующих непредсказуемость и затруднение при культивировании в условиях *in vitro*.

Перед исследователями в области микроразмножения встают проблемы достижения высокого экономического эффекта размножения; предотвращения генетического отклонения от сорта; соблюдения оптимального баланса при применении ростовых стимуляторов и других физиологически активных веществ [12; 96].

Изложенное подчеркнуло необходимость в индивидуальном подходе при разработке технологии микроразмножения отобранных для изучения подвоев, с учётом их биологических особенностей, места произрастания исходных растений и конкретных внешних условий [94]. Перечисленное легло в основу и определило направление наших исследований.

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

В задачи исследований входило:

- разработать приёмы получения асептической культуры и условия регенерации стерильных эксплантов;
- оптимизировать состав питательной среды для инициации эксплантов в культуру *in vitro* и микроразмножения 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 повышения эффективности процессов пролиферации и ризогенеза микрорастений;
- разработать эффективные приёмы адаптации пробирочных растений к нестерильным условиям.

Гипотеза исследований базируется на предположении, что разработка технологии микрклонального размножения изучаемых подвоев семечковых культур (ММ106, 54-118, Sydo, Ругіам) 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 Научно Исследовательского Института Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий (НИИСВПТ), 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 и ягодных культур методом микрклонального размножения. Математическую обработку основных результатов проводили с использованием методов однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа с помощью программы для статистической обработки Microsoft Office Excel 2019.

Научная новизна и оригинальность исследований: 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.

Теоретическая значимость и прикладная ценность работы: 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.

Научные результаты, выдвигаемые на защиту: разработана и усовершенствована технология микроклонального размножения подвоев семечковых культур. Продемонстрированы пути преодоления основных проблем при использовании технологии микроразмножения - получение стерильной культуры с использованием экологически безопасных препаратов; размножение однородного, генетически стабильного материала. Выделены композиции питательных сред для процессов регенерации, пролиферации и ризогенеза, отвечающие индивидуальным требованиям изучаемых культур и способствующие повышению эффективности технологических этапов; оптимизирован этап адаптации растений *ex vitro*.

Апробация результатов: материалы работ были представлены на Международной научной конференции „Realizări și perspective în horticultură, viticultură și silvicultură” посвященной 65 - летию основания факультета Плодоводства, Овощеводства и Виноградарства Государственного Аграрного Университета Молдовы (ГАУМ), Кишинёв, 2005 ; на Международной научной конференции ”Realizări și perspective în horticultură, viticultură, vinificație și silvicultură”, ГАУМ, Кишинёв, 2007; а также на Международной научной конференции “Genetics, Physiology and Plant Breeding”, ГУМ, ИГФЗР, Кишинёв, 2024.

Результаты проведённых исследований были доложены и обсуждались на заседаниях Учёного Совета Научно - Исследовательского Института Плодоводства (НИИП) 07.04.2005, 27.02.2006, 29.01.2007, а также на расширенном заседании лаборатории Вирусологии и Фитосанитарного контроля плодовых культур НПИСВПТ 05.03.2024, в настоящее время Национальный Институт Прикладных Исследований в области Сельского Хозяйства и Ветеринарной Медицины (НИПИСХВМ).

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, Pygiam размноженные *in vitro*, были переданы в питомник экспериментальной станции Кодру бывшего Научно - Исследовательского Института Плодоводства для расширенного изучения новых сортоподвойных комбинации.

Полученные результаты могут быть рекомендованы для руководства при ускоренном размножении посадочного материала изученных подвоев.

Публикации по теме диссертации: по теме диссертации опубликовано 13 научных работ: 4 статьи в изданиях, рекомендованных Национальным Агентством по Обеспечению Качества в Образовании и Исследовании Республики Молдова, 2 из которых без соавторов; 6 статей на международных и национальных конференциях, 3 статьи в научных сборниках, изданных в Республике Молдова.

Структура диссертации: диссертационная работа изложена на 155 страницах машинописного текста и содержит аннотацию на русском, румынском и английском языке, список сокращений, введение, 4 главы, выводы и практические рекомендации. В работу включены 11 рисунков и 52 таблицы, 265 библиографических источников, 6 приложений. Результаты опубликованы в 13 научных работах.

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

Краткое изложение диссертации: основные разделы диссертации включают введение и 4 главы. В введении описаны актуальность проблемы и важность её исследования; цели и задачи диссертационной работы; методология научных исследований и научная новизна полученных результатов; теоретическая значимость и ценность работы; краткое содержание разделов диссертации.

Краткое содержание диссертации

1. Анализ ситуации в области развития методов микроклонального размножения растений: описывается сущность метода микроклонального размножения *in vitro* - анализ, состояние изученности и применение метода культуры тканей в мировой практике размножения растений. Отражены этапы истории развития метода от возникновения до настоящего времени. В главе изложен опыт исследователей при культивировании различных видов растений в условиях культуры тканей; 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: описаны объекты, условия и методы наших исследований, отображена методика составления схем опытов, перечислены учёт, анализы и наблюдения, проведенные в процессе исследований.

3. Разработка технологии микрклонального размножения подвоев семечковых культур: представлены полученные результаты по всем этапам технологического процесса. Установлены оптимальные условия для получения асептической культуры для каждого изучаемого подвоя; выделен состав питательных сред, способствующих полноценному развитию и дальнейшей регенерации первичных эксплантов. Описана возможность минимализировать отрицательные эффекты токсического действия стерилизующих веществ и полифенольного окисления эксплантов.

Индивидуально для каждого подвоя установлен оптимальный состав минеральных солей в питательной среде и концентрация стимуляторов роста, поддерживающие динамику пролиферационных процессов и позволяющие к следующему технологическому этапу получить хорошо развитые микрорастения в необходимом количестве. Предложены альтернативные приёмы повышения коэффициента размножения и укоренения растений *in vitro*; составы питательных сред для активного ризогенеза; описана целесообразность применения разных видов ауксина, методы их воздействия на укореняемые растения. Изложена техника адаптации микрорастений к условиям *ex vitro*; выполнена сравнительная оценка различных субстратов и внесения минеральных удобрений в вегетационный период. Глава включает основные выводы результатов исследований по каждому этапу технологии микрклонального размножения.

4. Экономическая эффективность маточника клонового подвоя яблони ММ106: включает обоснование и расчеты экономической эффективности эксплуатации маточника клонового подвоя, посаженного материалом, размноженным с помощью разработанной технологии.

1. АНАЛИЗ СИТУАЦИИ В ОБЛАСТИ РАЗВИТИЯ МЕТОДОВ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ

1.1. Сущность микроклонального размножения растений и история возникновения метода

Вегетативное размножение растений практиковали в течение многих столетий. За это время было предложено много приёмов его усовершенствования, однако, только достижения в области культуры клеток и тканей позволили значительно расширить область и возможности использования такого способа размножения [64; 133; 196].

Клональное микроразмножение - новый метод вегетативного размножения, который заключается в репродукции клонов - генетически идентичных исходному экземпляру растений, полученных в условиях *in vitro* неполовым путём [116]. Метод основывается на уникальной способности реализовать свойство тотипотентности, которым обладают растительные клетки - то есть на способности клетки реализовать генетическую программу развития с образованием нового организма путём деления. В экспериментальных условиях даже из одной вегетативной клетки любого органа можно восстановить целое растение [64; 110; 134; 159].

Сущность метода микроклонального размножения состоит в том, что экспланты-группа клеток или фрагменты тканей и органов, отделяются от материнского растения и культивируются на питательных средах в условиях *in vitro*, которые предусматривают полную стерильность. В качестве эксплантов могут быть использованы апикальные меристемы почек или побегов, узлы вегетирующих побегов, семена [42; 76; 213]. Образцы растительного материала культивируются в пробирках или других сосудах с питательной средой в строго контролируемых условиях.

Процессы регенерации, активизирующиеся в изолированных эксплантах, приводят к росту и делению клеточных субстанций, что способствует формированию новых почек и побегов [116; 133; 134]. Полученный материал подвергается циклической пересадке на свежие питательные среды с одновременным делением сформировавшихся конгломератов почек и побегов на более мелкие части - начинается процесс микроразмножения. Новые побеги могут образовываться из придаточных почек, которые формируются непосредственно на самих эксплантах - в таких случаях размножение побегов происходит как из пазушных, так и из придаточных почек.

С таким последовательным субкультивированием линии могут размножаться неограниченно. Цикл микроразмножения растений завершается после переноса побегов

по одиночке на питательную среду, способствующую образованию придаточных корней. Все операции *in vitro* проводят в стерильных условиях с использованием ламинарных боксов, что сводит к минимуму возможность инфицирования культур и последующую их гибель [118; 120]. В результате использования метода клонального микроразмножения из одного небольшого растения или его части можно получить большое количество микроклонов - миниатюрных копий материнского организма [116; 136; 137].

Истоки метода культуры тканей восходят к началу 19 в. Немецкий учёный G. Gaberland в 1902 г. (цитировано Podwyszynska M. и др. (2022)), основываясь на результатах своих экспериментов по выделению и поддержанию жизнеспособности растительных клеток, предположил, что любая клетка может дать начало новому организму. Была выдвинута гипотеза о возможности выращивания растительных тканей на искусственных питательных средах [77].

В 1910 -1920 г. американский ученый Роббинсом (цитировано Дитченко Т. (2007)) проводил исследования по получению асептической культуры корней. В 1930 - 1940 г. в Калифорнийском институте технологий изучалась область асептической культуры почек и побегов. Уже в те годы предпринимались первые попытки стандартизировать компоненты сред и условия выращивания *in vitro* [116; 120].

В 1946 г. E. Ball (цитировано Arditti J. (2008)) стал первым учёным, которому удалось указанным методом получить укоренённые растения из апикальных меристем люпина и настурции [215]. Возможности этого метода изучались и закреплялись учёными в период между 1946 - 1960 г. К тому времени начали появляться сообщения исследователей P. Limasset, P. Cornuet, (1949 г.) (цитировано Палий А. и др. (2004 г.)) о том, что вирусы, поражая все части растения, в верхушечную меристему не проникают. Возникла идея использовать это преимущество при оздоровлении растений от инфекционных патогенов и базировать его на возможность культивирования тканей на искусственных питательных средах [75]. Позже учёными была разработана методика изолирования и выращивания меристем в асептических условиях и получены свободные от вирусов растения некоторых цветочных культур и картофеля.

В 1963 г. французский учёный G. Morel (цитировано Демидчик В. и др. (2019)), изучая возможность применения культуры меристем для лечения орхидеи, отметил способность тканей к разрастанию. В результате исследований он заключил что процесс размножения бесконечен и таким способом можно получить большое количество генетически однородного потомства [75; 116; 137]. Так возникла идея размножения *in vitro* или микроразмножения растений.

Период 1950 - 1980 г. отличался бурным развитием методов микрклонального размножения как нового раздела научной биологии и физиологии растений. Изначально эти методы были малоэффективны, особенно при работе с взрослыми формами деревьев. Большинство сообщений о таком размножении *in vitro* касались лишь редкого или случайно полученного растения [118]. Однако сплотив накопленный многолетний опыт углублённого изучения в области культуры тканей с попытками совершенствования методов, были достигнуты результаты, позволившие эффективно использовать репродуктивный потенциал растений с помощью методов микрклонального размножения [212].

С конца 20-го века и по сегодняшний день фундаментальные исследования и достижения, накопленные в области культуры *in vitro* активно интегрировали в практические разделы биологии и коммерческую биотехнологию. Углубленные научные исследования по микрклональному размножению проводятся во всех развитых странах мира, в том числе и в государствах постсоветского пространства. Технология клонального размножения *in vitro* на лабораторном уровне разработана для многих видов растений [136; 213]. Преимущества и широкие возможности метода по сравнению с традиционными способами размножения растений очевидны и высоко оцениваются.

Основные преимущества культуры изолированных тканей и органов заключаются в следующем:

- повышенный коэффициент размножения растений - высокая способность к регенерации *in vitro* позволяет быстро и в большом количестве получить клоны растений, в том числе таких, которые в обычных условиях размножаются трудно [159; 212; 213],
- получение генетически однородного материала,
- возможность получения здорового потомства от растений, поражённых вирусными и грибными заболеваниями за счёт использования в качестве первичного экспланта апикальную меристему [20; 196],
- возможность работы в лабораторных условиях в течение всего года, независимо от сезона и погодных условий; возможность планирования выпуска растений к определённому сроку [109; 190],
- экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала,
- сохранение ювенильности при размножении растений в условиях *in vitro* и ускоренный переход растений к репродуктивной фазе в условиях *ex vitro* [65; 108; 118; 125; 236].
- возможность депонирования пробирочных растений при пониженных температурах или с использованием метода криоконсервации, которые позволяют без ущерба технологии

хранить интересующие виды растений в течении длительного периода; при необходимости даёт возможность создать банк коллекционных форм растений и сократить площади под маточными насаждениями [155; 205; 239].

- позволяет проводить обмен пробирочными растениями, в том числе и в международном масштабе, без риска заражения или распространения карантинных объектов.

Метод микроклонального размножения широко используют для быстрого размножения новых выведенных сортов; для получения безвирусного посадочного материала; для размножения древесных растений, вегетативное размножение которых затруднено; в селекции для поддержания и размножения генотипов; для сохранения некоторых видов редких и исчезающих растений [90; 136; 154].

Преимущества и область применения, которые даёт этот метод, делает его заманчивой альтернативой традиционным технологиям размножения растений. В настоящее время метод массового клонального размножения растений нашел широкое применение в ряде стран Европы, Азии и Америки [184; 210], эффективно используется в России, Украине, Белоруссии и Молдове [49; 116; 161].

1.2. Применение методов культуры *in vitro* в практике размножения растений

Существуют различные классификации методов клонального микроразмножения [75; 213]. Согласно одной из них, методы разделяют на два принципиально разных типа размножения:

1 - индукция возникновения почек или эмбриоидов *de novo*,

2 - активация уже существующих в растениях меристем (апекс, пазушные и спящие почки).

Последний - основной метод при микроклональном размножении. Он основан на подавлении апикального доминирования и положен в основу промышленного размножения многих видов растений, в том числе и садовых [116]. Преодолеть апикальное доминирование можно двумя путями:

- делением микропобегов в условиях *in vitro* на однопочковые микрочеренки, которые используются в качестве вторичных эксплантов для повторения цикла размножения.

- добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа, что приводит к формированию побегов с укороченными междоузлиями и развитию многочисленных пазушных побегов [108; 120].

В дальнейшем, при необходимости, каждый побег может быть дополнительно рекультивирован. Метод относительно универсален и имеет хорошую воспроизводимость результатов в пределах вида и даже рода растений [110; 212].

Для большинства растений процесс клонального микроразмножения подразделяют на несколько последовательных этапов:

1. Введение в культуру *in vitro*: выбор растения - донора, отбор подходящих эксплантов и получение асептической культуры, культивирование на питательной среде, получение развивающейся стерильной культуры.
2. Микроразмножение *in vitro*: пролиферация микропобегов на питательной среде с целью получения максимального количества меристематических клонов.
3. Укоренение *in vitro*: перенос микропобегов на питательную среду, стимулирующую образование корневой системы.
4. Адаптация растений к условиям *ex vitro*: перенос растений из *in vitro* в нестерильные условия теплицы, посадка в почву или искусственный субстрат, доращивание, подготовка к высадке в открытый грунт [116; 136; 137].

1.2.1. Введение эксплантов в культуру *in vitro*

На эффективность введения в культуру *in vitro* влияет масса факторов различной природы. Это физиологические особенности растения, иницируемого в культуру тканей, химические и физические условия культивирования и многое другое. Одним из важных моментов является выбор материнского растения и экспланта.

При выборе растения - донора необходимо учитывать его физиологические, сортовые и видовые особенности. Для успешного культивирования эксплантов *in vitro*, их необходимо отбирать с здоровых, сильных растений, не поражённых грибными, бактериальными и вирусными болезнями [108; 143; 145; 161; 191].

На успех введения в культуру тканей оказывают влияние условия предварительного культивирования материнских растений. Экспланты можно заготавливать с растений, находящихся как в открытом грунте, так и в теплице. Однако, некоторые исследователи отмечают, что исходные растения желательно выращивать в возможно более чистой окружающей среде, чтобы избежать чрезмерного загрязнения и переувлажнения [64; 161].

При выборе экспланта необходимо учитывать его возраст и стадию развития. Практически любую часть растения можно успешно культивировать *in vitro*, если эксплант отобран на соответствующей стадии развития. Экспериментально установлено,

что экспланты растений, находящиеся в ювенильной фазе, обладают большим потенциалом к массовому формированию побегов и их укоренению (яблоня, смородина, хвойные) по сравнению с эксплантами взрослых растений [3; 137]. Незрелые ткани и органы являются более пластичными с точки зрения способности к морфогенезу *in vitro* [110; 136]. Чем меньше абсолютный возраст исходного растения, тем интенсивнее при прочих равных условиях развиваются экспланты и тем раньше они переходят к этапу пролиферации и образованию корней [110; 213].

Исследования показали, что обычно экспланты с взрослых деревьев в условиях *in vitro* растут медленно или вообще не развиваются, если взяты не из реювенилизованных тканей [118]. Использовать молодые, слабо дифференцированные ткани желательно также для обеспечения максимальной стабильности клонируемого материала - во избежание появления аномальных растений.

В качестве источника эксплантов при культивировании в стерильных условиях используют вегетативные и генеративные органы растений - в зависимости от поставленных целей это почка, апикальный конец стебля или его участок [48; 108; 209]. Материалом для введения в культуру тканей у разных авторов служат разные типы эксплантов: меристематические верхушки размером 200 - 500 мкм с несколькими примордиальными листочками [171]; верхушки растущих побегов от 1 до 1,5 см [145; 162; 179; 204; 246]; пазушные и верхушечные почки, очищенные от покровных чешуй [117; 179; 212], почки и верхушки побегов с искусственно пробуждённых черенков [209; 214], одревесневшие и зелёные черенки [140; 195].

От размера экспланта зависит его развитие. Чем он меньше, тем меньше его регенерационная способность. Однако, следует учитывать, что в крупном экспланте повышается вероятность присутствия в его клетках вирусов или других патогенов, что может нивелировать усилия по размножению растительного материала. В случаях, когда цель оздоровления не преследуется, размер экспланта обычно не играет определяющей роли и зависит от возможности экспериментатора простерилизовать иницируемый объект [23; 213; 246]. Не играет роли размер экспланта в случаях, когда в культуру *in vitro* вводится здоровый материал, прошедший тестирование.

Способность растительных эксплантов к регенерации зависит от местоположения вычлняемой части на растении. Высоцкий В. (1998 г.), Бутенко Р. (1999 г.) отмечают, что у ряда культур способность терминальных почек к регенерации выше, чем у боковых [109; 110; 246]. Также установлено что способность почек к развитию в условиях *in vitro* пропорционально увеличивается с повышением ярусности листьев [136; 246].

Время года и фаза развития родительского растения определяют реакцию развития экспланта на культивируемые условия. Многие исследователи считают, что лучшим сроком изолирования эксплантов является фаза выхода растений из покоя (начало активного роста) [53; 106; 108; 111] или фаза активного роста [141; 144; 204]. Отмечено, что у эксплантов в этот период наблюдается лучшая адаптация и выживаемость в условиях *in vitro* - они лучше переносят стерилизацию и начинают быстро развиваться. В некоторых случаях, работы по введению в культуру можно проводить и в более поздние сроки, в том числе и в период покоя [193]. Несмотря на то, что процент прижившихся эксплантов в этом случае несколько ниже, чем во время вегетации, в дальнейшем регенеранты развиваются лучше.

Thakur A. (цитировано Hasseb ur Rehman (2014)), Benjongliba A. (1990 г.) Самусь В., Семенас С., Коноплёва А. (2002 г.), Туровская Н. (1989 г.) и др. проводили изолирование эксплантов с черенков, заготовленных в зимний период и хранящихся при пониженной температуре [22; 53; 146; 193; 204]. Браткова Л, Цаценко Н. (2020 г.) для введения в культуру тканей рекомендуют сроки с февраля по июнь [108]. Ряд исследователей для введения в культуру использует почки, находящиеся в стадии покоя (декабрь - февраль) [53; 179] и почки, находящиеся в состоянии активного роста [140; 147; 167]. В феврале - марте меристематическая зона защищена от воздействия компонентов стерилизующей смеси покровными почечными чешуями. Экспланты яблони, изолированные в фазу выхода из покоя наименее подвержены отрицательным явлениям, связанным с процессами окисления и поликонденсации фенольных соединений [53; 120; 145].

Неотъемлемые условия культуры *in vitro* - это получение асептической культуры [196; 212]. Стерилизация приводит к уничтожению патогенных микроорганизмов (грибков, бактерий), оказывающих подавляющее действие на развивающиеся экспланты, жизнеспособность побегов, а также последующее формирование корней. Выбор стерилизующего агента определяется особенностями экспланта (травянистые ткани, зелёные и одревесневшие черенки, семена). Чем моложе и нежнее эксплантируемое растение, тем чувствительнее оно к агрессивному воздействию дезинфицирующего препарата [161]. Стерилизатор должен обеспечить наибольший процент неповреждённых тканей, способных к росту и новообразованиям, при наименьшем проценте инфекции. Это следует учитывать и при выборе продолжительности стерилизации [12; 110; 116].

Для освобождения от микроорганизмов исследователи подвергают растительный материал поверхностной стерилизации в ртутьсодержащем растворе сулемы 0,05 - 0,2 % [53; 62; 68; 116; 132; 141], в диациде 0,1 - 0,2 % [171; 195; 202], гипохлорите кальция 5 – 7

% [53; 141; 171], гипохлорите натрия 0.5 – 5 % [10; 68; 152; 172; 179; 195], в хлорамине 0,1 – 6 %, в коммерческом препарате гипохлорита натрия «Белизна») [53], перекиси водорода 6 – 10 % [53; 116; 179; 195] этаноле, нитрате серебра 0,1 % [104; 105; 116; 167; 171; 195], антибиотиках [204], растворе йода 0,01 % [151; 173].

Эффективность использования каждого препарата и продолжительность стерилизации у разных авторов варьирует в зависимости от вида растений и сорта, возраста и качества растительного материала, типа экспланта [20; 82; 147; 148]. Так, обработка покоящихся и искусственно пробуждённых почек в 0,1 % растворе сулемы длится 3 - 8 минут, в 9 % растворе гипохлорита кальция 20 минут. Стерилизацию меристематических верхушек в сулеме 0,1 % рекомендуют проводить в течение 1,5 минут; а в 0,1 % растворе нитрата серебра в течение 20 минут. Большинство исследователей применяют поэтапную стерилизацию с предварительным погружением растительного материала в этиловый спирт [105; 152; 193].

До сих пор в работах исследователей упоминается применение препаратов ртути, несмотря на риски применения и высокую токсичность для тканей растений [62]. Наиболее мягкими по стерилизующему действию и менее вредными для здоровья исследователя являются перекись водорода и раствор йода [109]. Добавление детергентов Твин - 80, Твин - 20 [53; 82; 110] способно повысить успешность стерилизации.

Для увеличения количества стерильного материала практикуется проведение многоступенчатой стерилизации - растительные объекты тщательно отмывают под проточной водой (1 - 2 часа), иногда с моющими средствами; обрабатывают стерилизующим раствором и далее, многократно промывают в дистиллированной воде в течение 3 - 10 минут [20; 53].

Более сложную методику стерилизации применял в своих исследованиях Benjongliba A. (1990 г.) - экспланты окунались в раствор гипохлорита натрия в течение одной минуты, промывались в дистиллированной воде и помещались на питательную среду [22]. На следующий день материал повторно подвергался процедуре обеззараживания и легко выдерживал нахождение в растворе того же стерилизатора в течение 40 минут. По мнению исследователя, экспланты становятся более устойчивыми после короткого периода культуры на питательной среде.

Замечено, что эндогенное инфицирование тканей у исходных эксплантов может быть намного сильнее, чем поверхностное [64; 116; 137; 202]. Заражение, особенно бактериальное, может выявляться даже после нескольких пассажей, вследствие проникновения микроорганизмов в ткани растения. Ущерб от него в отдельных случаях

достигает 100% [212]. Для борьбы с латентной инфекцией некоторые авторы рекомендуют использовать антибиотики и системные фунгициды - стрептомицин и тетрацилин по 10 - 80 мг/л, ампициллин и нистатин по 200 - 400 мг/л, бензилпенициллин 100 - 200 мг/л, левомицетин и другие [110; 161]. В первую очередь это относится к древесным растениям, у которых наблюдается тенденция к накоплению внутренней инфекции. Антибиотики вводят в питательную среду или экспланты промывают в растворе препарата при инициации в культуру *in vitro*.

После изучения действия комплексного антибактериального препарата *Sulfamethoxazolium - Trimethoprimun* на получение стерильной культуры яблони, Долгих С. (2004 г.) заметил разную реакцию эксплантов в зависимости от сорта. Было установлено, что у некоторых сортов применение препарата повышало показатель стерильности культуры до 70 %, в то время как на другие сорта антибиотик оказывал токсическое действие даже при низких концентрациях [107; 124].

В процессе культивирования подвоев яблони, Чернец А., Потехина Г. (1993 г.) испытывали антибиотик тетрацилин в концентрации 20 - 100 мг/л для подавления бактериальной инфекции [206]. Добиться полного подавления патогенной микрофлоры не удалось, хотя в целом, как они отмечают, растения, прошедшие такую обработку, лучше росли и имели тёмно - зелёную окраску листьев. Не достигла желаемых результатов при применении канамицина и гигромицина Муратова С. (2002 г.) [251].

В тоже же время существует круг исследователей, призывающих к отказу от применения антибактериальных препаратов в культуре тканей. Применение антибиотиков зачастую затруднено из - за того, что спектр бактерицидного действия каждого из них довольно узок. Высокие концентрации антибиотиков, которые угнетают рост ткани или вызывают нарушения её обмена, порой бывают недостаточными для подавления развития инфекционных микроорганизмов [110].

Некоторые источники рекомендуют при введении в культуру проводить тест на заражённость эксплантов сапрофитной микрофлорой. На этом этапе добавление в питательную среду гидролизата казеина в концентрации 500 - 1000 мг/л провоцирует интенсивное развитие микроорганизмов и позволяет отбраковать инфицированный материал на ранней стадии [105; 136; 196; 213]. В отдельных случаях эксплант помещают на питательную среду, лишённую регуляторов роста, с добавлением гидролизата казеина. Такой приём позволяет экономить регуляторы роста и в тоже время вовлекать в дальнейший процесс микроразмножения заведомо стерильные экспланты [196].

Ещё одним фактором, снижающим эффективность технологии, является окисление фенолов [108; 199; 196]. В результате травмы, полученной эксплантом при изолировании, активизируются ферменты, которые окисляют фенолы растений до различных фенолаз. Визуальным признаком подобного явления служит потемнение питательной среды в местах контакта с растительной тканью. Продукты окисления фенолов подавляют деление и рост клеток первичного экспланта [162].

В литературе имеются сведения, что экспланты, изолированные в фазу выхода из покоя, меньше подвержены отрицательным явлениям, связанным с продуцированием избыточного количества фенольных веществ. В этот период они лучше переносят стерилизацию и начинают быстро развиваться [108]. Леонтьев - Орлов О. (1988 г.) отмечает, что меристематические верхушки, заготовленные в период жаркого лета, выделяют значительно большее количество фенолов и это предопределяет угнетение роста и массовую гибель эксплантов [162]. К таким же выводам пришел Долгих С. (2004 г.) заготавливая апексы для изолирования в августе - в период второй волны роста [124].

Для преодоления отрицательного действия фенольных соединений на эксплант, ряд исследователей рекомендует применение протекторов - антиоксидантов. Некоторые из них могут быть добавлены в воду для промывания при изолировании или входить в состав питательной среды на первых этапах культивирования [145; 195].

Исследователями замечено, что после проведения стерилизации, промывание экспланта и дальнейшие манипуляции с ним следует проводить в слабом растворе аскорбиновой кислоты (1 мг/л) [137], цистеина (250 мг/л). Это позволяет уменьшить негативное влияние окислительных процессов [145]. В экспериментальные питательные среды добавляют аскорбиновую кислоту (1 мг/л), глутатион (4 - 5 мг/л), диэтилдитиокарбамат (2 - 5 мг/л), высокомолекулярный поливинилпирролидон (5000 - 10000 мг/л), цистеин (1 мг/л) [108; 132; 167; 220; 237]. Было замечено что в некоторых случаях рост и регенерацию можно улучшить добавлением в питательную среду сорбента - древесного активированного угля (0,5 - 1%), который способствует удалению ингибирующих веществ [108; 64; 237; 255]. Однако, при использовании сорбентов, концентрации гормонов, витаминов, железа и других компонентов питательной среды могут меняться, что может тормозить развитие эксплантов [133; 137]. Эта специфичность затрудняет широкое применение этих веществ в культуральной среде.

При фенольном окрашивании среды в зоне контакта с эксплантом проводят ряд последовательных пересадок на новые среды до полного прекращения процесса окисления [167; 196; 213]. Первую пересадку рекомендуется делать не позднее чем через 2

- 5 дней после инициации культуры, а последующую с интервалом в 2 - 3 недели; при этом необходимо очистить эксплант от омертвевших тканей [134]. Упомянуто о эффективности содержания изолированного материала в полной темноте в течение 4 - 5 дней с последующим переносом на свет [53].

Питательная среда на этапе введения в культуру *in vitro* оказывает прямое воздействие на жизнеспособность экспланта и должна индуцировать его ускоренный переход к регенерации. Правильно подобранная среда - основной фактор успешного культивирования изолированных тканей и клеток [136; 137; 157]. Основными компонентами питательной среды являются минеральные соли (макро - и микроэлементы), источник углеводного питания (сахароза), витамины и регуляторы роста (фитогормоны). Из большого количества существующих питательных сред, часть из них пользуется большей популярностью ввиду своей универсальности. Такие среды как Мурасиге-Скуга (MS) [71; 142; 148; 163; 265], Гамборга и Эвелега (B5) [47; 199; 204], Уайта [199; 204], Кворина-Лепуавра (QL) [60; 167; 170].

На первом этапе исследователями используются те же композиции питательных сред, что и на протяжении остальных этапов, но в ряде случаев встречаются упоминания о необходимости модификации. Так, Сибиряткин С. (2017 г.), Соловых Н. (2023 г.) модифицируют среду Мурасиге-Скуга на этапе культивирования экспланта [191; 195] - в одних случаях понижают аммонийную и нитратную форму азота в два раза, в других предусматривают пониженные концентрации витаминов и фитогормонов (0,3 - 0,5 мг/л); Лободина Е. (2020 г.) снижает концентрацию азота в среде в 4 раза [163]; Ряго Н. (2022 г.), Матушкина О. (2009 г.) рекомендуют использовать полную концентрацию солей MS и цитокинин в пределах 1 мг/л [166; 167; 188].

Физические условия культивирования растений оказывают существенное значение на успех процесса микроразмножения. Интенсивность, тип, продолжительность освещения, температура, соотношение кислорода и углекислого газа в сосуде для культивирования также, как и физический состав среды - всё это относится к важным факторам культивирования растений *in vitro* [12; 116; 213].

Экспериментальные данные о влиянии света на рост культуры тканей очень пестры. Установлено, что прямой солнечный свет тормозит рост культур и вызывает некроз тканей микрорастений. Размножение *in vitro* практикуют под люминесцентными лампами [99; 105; 161; 241], светодиодными источниками [199; 217], с подбором оптимальной интенсивности освещения. Обычно она в пределах 1000 - 5000 люкс. Мурасиге Т. (цитировано Ивановой Н. и др. (2014)) обнаружил, что низкая освещённость -

300 люкс, как и высокая - до 10000 люкс, сильно подавляют рост культур [71; 255]. Интенсивность роста зависят от спектрального состава света [110; 217]. Bertazza G. (1995 г.), Чивилева В. (2003 г.), Макаров С. (2022 г.), Высоцкий В. (1998 г.) указывают на синий свет, как основной компонент могогенеза растений на этапе размножения и красный свет - на этапе индукции корней [21; 210; 217; 241; 246]. Бъядовский И. (2018 г.), Алексеенко Л. (2000 г.) отметили улучшение укореняемости земляники при синем свете, а в красном и оранжевом областях спектра - увеличение количества корней [99; 223]. Однако, важное значение имеет сочетание спектрального состава света и гормональных факторов среды.

Для большинства растений оптимальным периодом освещённости считается 16 - 18 часов. При этой продолжительности наблюдается наилучшее развитие эксплантов и в дальнейшем образуется наибольшее количество дополнительных побегов. Эти параметры зависят от биотипа и связаны с существованием определённого ритма клеточных делений и роста [119; 217].

Оптимальный температурный режим для развития эксплантов большинства растений зоны умеренного климата + 22 +25 °С, с отклонением от него для отдельных растений на 2 - 3 °С [90; 100; 158; 171]. Для роста тканей древесных растений наиболее благоприятна температура +28 +30 °С [196]. Оптимальная относительная влажность воздуха в условиях культуры тканей 65 - 75% [137; 196].

Обычно на первом этапе растения культивируют в пробирках небольшого объёма с питательной средой по 5 - 6 мл, а в дальнейшем в колбах 100 - 200 мл, банках 150 - 250 мл с 50 мл питательной среды. Сосуды с растениями закупориваются различными типами крышек (алюминиевой фольгой, стеклянными или пластиковыми прозрачными крышками) [19; 245].

В процессе клонального микроразмножения необходимо проведение циклических пересадок эксплантов на свежую питательную среду. Это обусловлено истощением питательных веществ в среде, накоплением в ней токсичных продуктов метаболизма в месте контакта с эксплантом. Также, необходимость пересадок вызвана нарастанием объёма растительного материала в культуральном сосуде. Продолжительность одного культивирования зависит от биотипа, темпов развития его экспланта и в основном составляет от 3 до 8 недель [109; 133; 243].

1.2.2. Микрклональное размножение растений

Одним из ключевых этапов метода культуры тканей растений является микроразмножение - получение наибольшего количества побегов от каждого первичного

экспланта с их последующей рекультивацией на свежих питательных средах. На этом этапе определяющую роль играют такие факторы, как сортовые и видовые особенности растения, состав питательной среды и содержание в ней регуляторов роста, расположение растений в пространстве, физические условия культивирования. Способность растений к мультипликации *in vitro* является генетически обусловленной и коррелирует со способностью к вегетативному размножению в естественных условиях [64; 134; 212; 213].

Наиболее эффективным приёмом индукции различных форм морфогенеза является подбор оптимального соотношения элементов питательной среды - макро и микросолей, витаминов, источника углеводов и стимуляторов роста (ауксинов, цитокининов, гиббереллинов) [12; 89; 100; 119; 136]. Реакция растительных тканей на наличие химических элементов в питательной среде зачастую неравномерна. Объясняется это тем, что каждая растительная клетка, имея свою собственную генетическую программу, может специфически отвечать на регуляторы роста в среде. Такую же вариабельность в ответных реакциях могут спровоцировать и разные стадии развития одной и той же клетки. В связи с этим, точный состав питательной среды для культивирования тех или иных растительных объектов должен быть подобран с учетом их индивидуальных особенностей, а также потребностей определённых групп растений [100; 157; 161; 171].

Большая доля исследователей на первом и втором этапе клонального микроразмножения наиболее часто используют среду по прописи Мурасиге и Скуга (1962 г.); состав и сочетание стимуляторов роста в ней меняется в зависимости от растительного объекта [49; 48; 105; 106; 112; 204; 221]. Питательная среда Мурасиге и Скуга (MS) наиболее универсальная и многоцелевая среда, пригодная для культивирования растительных клеток многих видов растений [91; 110; 118; 138; 185; 265]. Её отличительной чертой является высокое содержание азота, калия и аммония по сравнению с другими средами. Также, при размножении древесных пород *in vitro* распространение получили среды Ллойда - Маккауна (WPM) [19; 67; 69; 171; 179], Кворина - Лепуавра [60; 164; 167; 170; 172; 221], Гамборга (B5) [171; 200; 204], Уайта [200; 204] Ли и Фоссарда [200].

Основой для всех питательных сред для культивирования растительных тканей является комплекс минеральных солей. Вопрос оптимального соотношения $\text{NH}_4 : \text{NO}_3$ до сих пор остается открытым, так как универсального рецепта для всех видов растений не существует, а литературные данные отображают весьма противоречивые результаты. Катаева Н. и Бутенко Р. (1983 г.) считают, что соотношение аммонийного и нитратного азота в составе среды Мурасиге - Скуга оптимально для процессов неорганизованного

роста и органогенеза [136]. Однако, Туровская Н. (1989 г.), Семенас С. (2002 г.), Матушкина О. (2014 г.), Лободина Е. (2020 г.) отмечают, что уменьшение концентрации аммонийного азота в среде MS в 4 раза повышает количество и скорость развития микрорастений яблони, в то время как уменьшение фосфора на одну четвертую часть напротив, сильно задерживает их развитие [163; 169; 171; 173; 193; 204].

В качестве источника углеводов в питательные среды обычно добавляют дисахариды (сахароза), моносахариды (глюкоза, фруктоза), рафинированный сахар в концентрации 20 – 40 г/л. [110; 118; 139; 219; 234]. Большинство исследователей считают присутствие сахарозы в питательной среде обязательным, так как изменением её уровня можно влиять на характер морфогенеза [218]. Разные культуры на разных этапах культивирования требуют разной концентрации углеводов [265].

Для стимуляции биохимических реакций в клетке используют биологические катализаторы - витамины группы В (В₁, В₆, В₁₂), С (аскорбиновую кислоту), мезо-инозит и РР (никотиновую кислоту) [53; 92; 116; 138; 157]. Наиболее важную роль в росте растений играют витамины группы В, которые усиливают их рост и развитие [196].

Для управления процессами морфогенеза в культуре тканей применяют биологические регуляторы роста - фитогормоны [51]. В основной классификации их подразделяют на *группу ауксинов* : индолил-3- масляную кислоту (ИМК), β -индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), α-нафтилуксусную кислоту (НУК); *группу цитокининов* : 6-бензиламинопуридин (БАП), 6-фурфуриламинопуридин (кинетин), диметилаллиламинопуридин (2ip) и *гиббереллинов* : ГК₁, ГК₃, ГК₄, ГК₇ и др. [100; 119; 120; 180; 213].

Соотношение и концентрация внесённых в питательную среду цитокининов и ауксинов играют основную роль при подборе оптимальных условий культивирования растений. Из цитокининов чаще используют БАП в концентрациях от 1 до 5 мг/л, а из ауксинов ИМК в концентрациях 0,1 - 3 мг/л. В зависимости от поставленной цели, сочетание и соотношение этих веществ может резко меняться [37; 133; 213].

Цитокинин является обязательным компонентом питательной среды для прямой индукции побегообразования [51; 172; 213]. Леонтьев – Орлов (1988 г.) при размножении подвоев яблони получил оптимальные результаты, используя БАП в концентрации 3 мг/л. Он отметил, что при БАП 5 мг/л, что процесс образования дополнительных побегов ингибировался [161]. Отрицательный эффект от высоких концентрации БАП подтверждают данные многочисленных авторов [164; 169; 174].

Некоторые исследователи утверждают, что совместное добавление в состав питательной среды ауксина и цитокинина отрицательно сказывается на регенерационной

способности культивируемых объектов. Высокая насыщенность питательной среды стимуляторами роста может угнетать и даже привести к гибели. Зафиксированы случаи, когда культивирование на питательных средах без ИМК положительно сказывалось на росте и развитии растений [171; 196].

Существуют исследования с обратными результатами, подтверждающие успешное совместное добавление в среду стимуляторов обеих групп, что позволяет повысить частоту стеблевого органогенеза в несколько раз [44; 62; 148; 221]. На этапе пролиферации концентрация ауксина и цитокинина должна быть строго нормирована, так как высокие дозы этих гормонов способны вызвать гипертрофию клеточного роста и образование гигантских, неспособных к делению клеток [53; 77; 110; 213].

Для стимуляции процессов мультипликации для некоторых видов растений в состав питательных сред помимо цитокинина и ауксина вводят другие регуляторы роста, в частности, ГК, а также дополнительные биологические добавки - растительные экстракты, кокосовое молоко, кислоты, масло нима и др. [74; 84; 85; 196; 222; 225; 255].

Так, Упадышев М. (2011 г.), изучая действие фенолкарбоновых кислот на размножение ряда культур *in vitro*, установил положительное влияние галловой кислоты на интенсивность пролиферации груши [225]. Однако таких добавок рекомендуется избегать в связи с трудностями воспроизведения результатов и наличия в них неизвестных факторов роста [110].

В начале 70-х годов английский исследователь Jones, изучая ростовые вещества сока ксилемы яблони, обнаружил соединение, способствующее росту растений, влияние которого усиливалось ИУК в концентрациях более низких, чем те, когда ИУК оказалась эффективной самой по себе. Это вещество имело особенности флороглюцина - продукта распада флоридзина [59]. В своей статье Jones отметил, что флороглюцин в питательной среде вызывал двух - трёхкратное увеличение роста и укоренения побегов у подвоя М7. Однако, такое действие фенольных соединений сохранялось лишь в первые три месяца культивирования, когда способность к росту и образованию корней у микрорастений довольно низкая.

В отношении определённых растительных объектов, флороглюцинол действовал как синергист ауксина при индукции корней, что делало целесообразным его последовательное применение на этапе пролиферации и ризогенеза. Другие исследователи, Cheema G., Sharma D. (1983 г.) в своих наблюдениях отметили отрицательный эффект этого соединения - растения проявляли угнетение [222].

До сих пор роль эндогенных фенольных соединений в потенциальной активизации роста растений довольно туманна; в одних источниках указывается, что флороглюцин стимулирует морфогенез стеблей на фоне действия традиционных стимуляторов [57; 136; 238], в других подчеркивается, что это соединение напротив, уменьшает количество побегов, однако значительно улучшает их качество [253]. Леонтьев – Орлов (1988 г.), проведя ряд экспериментов, отметил, что влияние флороглюцина на развитие яблони *in vitro* нельзя считать положительным с учётом снижения темпов прироста побегов и ухудшения развития листового аппарата. Степень подавленности растений яблони возрастала с увеличением концентрации БАП в питательной среде [161; 162]. До сих пор нет глубоко понимания принципа действия и избирательности этого вещества.

Для культивирования растений в условиях *in vitro* применяют безагаровые (жидкие) и агазированные (твёрдые) питательные среды [116; 185; 196; 212; 226; 255; 265]. Агазированные среды готовят на основе агар - агара - полисахарида, добываемого из некоторых морских водорослей, который с водой образует гель при pH 5.6 - 6.0 [53; 146; 147; 196]. В составе обычного неочищенного агара обнаружено некоторое содержание макро - и микроэлементов, а также витаминов тиамина и биотина. Концентрация агара в питательной среде 0,8 - 1,5 % [213].

Ввиду дефицита и высокой стоимости агар - агара исследователи неоднократно предпринимали попытки найти ему заменитель или разработать технологию выращивания растений на безагаровых питательных средах. В качестве отвердителей среды были испытаны заменители - желирующие вещества (желатин, геллан, пектин, гомополисахариды, фитогель) [224; 225]. По мнению некоторых исследователей, желатиновые среды не пригодны для использования в культуре *in vitro*, так как желатин токсичен для тканей растений [212]. Долгих С. (2004 г.) в своей статье приводит результаты, указывающие на стимулирующее действие картофельного крахмала с желатином (100 : 1) на коэффициент пролиферации у сортов и подвоев яблони [124]. Упадышеву М. (2011 г.) с целью повышения рентабельности технологии удалось подобрать в качестве заменителя агар - агара желирующие вещества, которые обеспечивали показатели размножения и развития растений на уровне использования агара или несколько выше [225].

Для культивирования суспензий, каллусов, изолированных органов и тканей также возможно применение жидких питательных сред [196]. В отдельных случаях выращивание тканей в жидких средах имеет ряд несомненных преимуществ перед агазированными, так как ткани лучше снабжаются питательными веществами и быстрее

происходит удаление токсических веществ, в результате чего растение растёт более интенсивно [120; 137; 255]. К тому же, проведение исследований о действии микросолей и витаминов на развитие экспланта возможно только при применении жидкой среды. Имеются сведения об успешном культивировании на жидкой среде разных видов растений, в том числе и подвоев яблони [53; 143].

Для поддержания эксплантов на поверхности среды применяют специальные мостики - опоры из фильтровальной бумаги или синтетически пористых материалов. Однако, многие авторы считают, что необходимость применения гидрофильных вкладышей снижает технологичность процесса культивирования на жидкой среде [118], поэтому в настоящее время способ мало применяется на практике из-за сложности использования. Альтернативой стало применение двухслойных питательных сред: нижний слой - агазированный, верхний - жидкий, содержащий полный набор элементов питания. Идея этого метода заключается в том, что основная твёрдая среда фиксирует эксплант в нужном положении и обеспечивает его питание через основание. В это же время, жидкая среда действует как постоянное внекорневое удобрение и обеспечивает проникновение питательных веществ и стимуляторов роста через поверхность побега [196; 226].

Известно, что у многих растений боковые побеги не развиваются активно, пока растёт главный апикальный побег. Большинство исследователей решают проблему снятия апикального доминирования в условиях *in vitro* путём введения в питательную среду стимуляторов роста типа цитокинина [134; 212; 246] или удалением точки роста. В то же время, литературные источники приводят данные об эффективном ингибировании верхушечного доминирования путём изменения направления роста микропобегов. Замечено, что у горизонтально ориентированного побега без верхушки, за счёт лучшего контакта со средой, происходит повышение мультипликации в 1,2 - 1,6 раз вне зависимости от генотипа [171; 226]. Туровская Н. (1989 г.), изучая зависимость коэффициента размножения от ориентации побега на среде Гамборга заметила, что микропобеги подвоя яблони 62-396 при вертикальном положении образовывали в среднем 2,7 дополнительных побега, при горизонтальном - 5, а при наклонном - 4,7 побега [204]. Схожие результаты получили Sandoval Prando M. (2014 г.), Леонтьев - Орлов О. (1988 г.), Высоцкий В. (1998 г.) [161; 246; 254].

У растений, выращиваемых в условиях *in vitro*, наблюдается тенденция к повышению интенсивности размножения пропорционально увеличению количества пассажей [120; 212; 213]. На протяжении второго, третьего пассажа коэффициент

размножения невелик, однако с последующими пассажами этот показатель значительно увеличивается и зависит от генотипа [137]. По данным Джигадло Е. (2005 г.) у подвоев и сортов вишни максимальная скорость размножения достигается уже к четвёртому пассажиру [117]. Схожие данные были получены при культивировании подвоев яблони. Наибольшей активностью отрастания почек характеризовались 4 - 6 пассажи у Туровской Н. (1989 г.) и 5 - 7 пассажи у Матушкиной О. (2009 г.) [167; 204]. В литературных источниках имеются сведения, что при длительном пассировании в условиях *in vitro*, регенерационный потенциал растений постепенно снижается. Однако, наблюдения ряда исследователей за развитием разных культур в условиях *in vitro* не констатировали этого факта [151; 189; 193].

При долгом культивировании растений на питательных средах с повышенным содержанием цитокининов происходит постепенное их накопление в растительных тканях выше необходимого физиологического уровня [120; 212; 213; 255]. Это приводит к проявлению токсического действия и формированию растений с изменённой морфологией. При этом возможно наблюдать такие нежелательные для клонального микроразмножения эффекты, как подавление пролиферации пазушных побегов, снижение способности растений к дальнейшему укоренению [120; 255]. По некоторым данным укоренение побегов, культивируемых на средах с пониженным содержанием БАП может быть выше, чем на средах с повышенными концентрациями [184; 255]. Избежать этого можно применяя питательные среды с оптимизированной концентрацией цитокининов, а также путём чередования циклов культивирования на средах с низким и высоким уровнем регуляторов роста [136; 173; 255].

При клональном микроразмножении исследователи сталкиваются с серьёзной проблемой у многих растений в связи с формированием в условиях *in vitro* витрифицированных побегов [196]. Такое явление также называют «оводнённостью тканей» или «стекловидностью». При возникновении этого явления развиваются набухшие, деформированные листья, которые становятся прозрачными и некротируют [213]. Аномальные побеги обладают пониженной жизнеспособностью и при пересадке погибают. При длительном культивировании количество деформированных побегов увеличивается и может достигать 70 - 100 %. Хотя факторы, вовлечённые в развитие витрифицированных растений, были изучены, взаимосвязь среди них до сих пор непонятна. Существует много версий о причинах возникновения аномального морфогенеза, однако, единых путей предотвращения этого явления ещё нет. Считается, что избежать витрификации можно путём снижения концентрации цитокинина в среде до

величины, не превышающей необходимую [53; 136; 168; 255]. В то же время, существуют данные, указывающие на появление стекловидных эксплантов даже при низких концентрациях БАП на одной и той же среде, рядом с нормально развитыми побегами [98].

В отдельных работах по микроразмножению было зафиксировано развитие гиперводненных побегов, распространённость которых зависела от концентрации регуляторов роста или агара в питательной среде. У артишока подобное явление было предотвращено путём увеличения концентрации агара до 1,1 % [118]. Hamza A. (2011 г.) отмечал, что частота витрификации при размножении лаванды снижалась при использовании 1/4 MS питательной среды и увеличении содержания сахарозы [56]. По данным Змушко А. (2006 г.) формирование витрифицированных эксплантов может наблюдаться на питательных средах, содержащих аскорбиновую кислоту. С повышением концентрации витамина С в среде увеличивается число деформированных эксплантов [130]. Ziv M. (1991 г.) считает, что различные проявления витрификации - это результат условий культивирования и подчёркивает необходимость оптимизации процессов *in vitro* [98]. Физическое состояние среды и газовый состав в пробирке (накопление углерода и этилена) являются главными факторами, нуждающимися в постоянном контроле. Для преодоления витрификации предлагают повышать градиент испарения воды с поверхности листовой пластинки за счёт улучшения газообмена в сосудах. Однако условия выращивания растений не вмещаются только в один ключевой процесс - они могут иметь и самостоятельный характер, так как различные физиологические дефекты могут быть следствием расстройства метаболических путей [109; 120].

Известно, что поддержание коллекции растений *in vitro* чрезвычайно дорого из-за необходимости проведения регулярных пересадок и обеспечения стабильных условий культивирования: температуры, влажности, освещения. В тоже время, при многократном пересаживании под воздействием цитокинина у растений могут снижаться темпы роста и проявляются признаки старения культуры. Чтобы свести эти процессы к минимуму в случаях, когда необходимо длительное поддержание культуры *in vitro*, а также для удешевления содержания генофонда исследователи практикуют депонирование пробирочных растений при низких положительных температурах [173; 227; 228].

По данным Семенас С. и Змушко А. (2014 г.) растения подвоев яблони могут храниться в условиях бытового холодильника до 16 месяцев. Сохранность материала при этом составляет 84 % [194]. G. Volk. (2021 г.) отметил, что растения могут храниться в течение года и более при +1 +4 °С без потерь ростовой потенции. При этом после

холодного хранения скорость пролиферации растений значительно увеличивалась [228]. Уровень регенерационной способности при хранении в условиях пониженных температурах зависит от генотипа, длительности депонирования и от гормонального состава среды. Для увеличения беспересадочного хранения плодовых культур *in vitro* исследователи применяют различные методики. Так, Матушкина О. (2016 г.) считает целесообразным поддержание эксплантов яблони и груши на среде с БАП 1,0 мг/л при +4 °С в условиях темной фазы [171; 173]. Существует мнение что нужно прерывать длительное хранение растений в холодильнике (8 - 12 месяцев) кратковременным культивированием в климатической комнате. В таком случае, смена условий содержания позволяет добиться наибольшего выхода жизнеспособных побегов при сохранении высокого потенциала регенерации [226].

Содержание растений *in vitro* при низких температурах - эффективный приём хранения фитопатологически чистых клонов растений без риска их реинфицирования, а также привлекательный способ экономии земельных площадей [113; 213].

1.2.3. Укоренение микрорастений *in vitro*

Одной из главных проблем в технологии микрклонального размножения является укоренение побегов, особенно у древесных плодовых культур. Процесс ризогенеза растений зависит от многих факторов: от генотипа, от вида и концентрации ауксинов, способа воздействия на эксплант, от минерального состава среды на текущем и предшествующем этапе, концентрации углеводов, уровня освещённости, температуры и ряда других факторов. Это свидетельствует о сложности процесса ризогенеза и трудности управления им [137; 212].

Эффективность этапа ризогенеза напрямую зависит от грамотно подобранных условий культивирования растений на предыдущих стадиях. Применение высоких концентраций 6-бензиламинопурина на этапе микроразмножения обычно препятствует дальнейшим процессам активного корнеобразования у растений. Для уменьшения ингибирующего действия цитокинина, этапы микроразмножения и укоренения разделяют промежуточной фазой культивирования, в ходе которой растения помещают на питательную среду с пониженным содержанием БАП (0,1 - 0,3 мг/л) [119; 151; 171; 179; 246]. К тому же, практический опыт исследователей показал, что лучше укореняются и в дальнейшем растут побеги, длина которых превышает 10 - 15 мм [28]. Процесс ризогенеза у укороченных побегов резко заторможен, растения отличаются сдержанным ростом и впоследствии плохо переносят пересадку в условия *ex vitro* [200; 229]. С помощью

промежуточного культивирования удаётся получить побеги длиной 15 - 20 мм. Кроме того, это повышает процент укоренения в целом, так как позволяет избежать последствия цитокинина.

Введение в схему размножения дополнительного этапа отражают в своих работах Кухарчик Н. (2010 г.), Леонтьев - Орлов О. (1988 г.), Минаев В. (2002 г.), Верзилин А. (2007 г.), Туровская Н. [111; 153; 161; 174; 204]. Некоторые исследователи предлагают альтернативный способ удлинения - элонгацию побегов за счёт присутствия в питательной среде гибберелловой кислоты [139; 149; 179; 216; 229; 255].

Чтобы оптимизировать процессы ризогенеза и повысить процент укоренения растений, необходим индивидуальный подбор подходящей питательной среды, вида и концентрации ауксина [12; 45; 213]. На третьем этапе технологии микроклонального размножения основной состав среды модифицируется за счёт изменения концентрации макро - и микросолей. Установлено, что понижение концентрации минеральных компонентов среды позволяет улучшить качество корневой системы, а для некоторых растений повысить интенсивность укоренения [172; 184]. Практикуется использование питательных сред по прописи Мурасиге и Скуга [142; 143; 200; 235], Кворина - Лепуавра [23; 53], Гамборга [184; 200], Ллойда - Маккоуна [184; 200] или же менее концентрированной среды Уайта [120; 196; 200].

Укоренение микропобегов в условиях *in vitro* в большинстве случаев проводят при разведении минеральной части среды в 2 раза [32; 45; 48; 142; 179; 184]. Туровская Н., исследуя процессы ризогенеза яблони, пришла к выводам, что с уменьшением содержания азотнокислого аммония в питательной среде MS в 4 раза, укореняемость увеличивалась на 25 % [150]. В то же время, не для всех растений такой подход обеспечивает высокий результат - уменьшение концентрации азотнокислого калия в среде может сопровождаться ослаблением процесса ризогенеза [124; 184; 189].

Обычно, для индукции корнеобразовательного процесса в питательную среду добавляют вещества из группы ауксинов; цитокинины или не добавляют вовсе, или добавляют в пониженных концентрациях. О стимуляции укоренения с помощью 6-бензиладенином упоминается в работах Nemth G. (1975 г.) [72]. Однако, в большинстве случаев наиболее эффективно себя зарекомендовали ауксины: β -индолилмасляная, β -индолилуксусная, α -нафтилуксусная кислота [24; 53; 120; 212; 265]. Без использования веществ этой группы укоренение растений очень слабое или отсутствует совсем, в зависимости от вида. В то же время, продолжительный контакт ауксина с микропобегом отрицательно сказывается на развитии корневой системы, что вызывает затруднения при

использовании этих стимуляторов. Ауксин вызывает разрастание каллуса и подавляет рост корней. С учётом этого, воздействие его на растение должно быть ограничено временем [136; 213].

В настоящее время разработано много техник индуцирования ризогенеза. Один из них - кратковременное замачивание основания побегов (на 2 - 24 часа) в водном или спиртовом концентрированном растворе ауксина с последующей культивацией их на безгормональной питательной среде или в подходящем почвенном субстрате [174; 179]. Отмечаются высокие результаты при замачивании побегов яблони в растворе ИМК 50 мг/л в течение 18 - 20 часов; побегов айвы в растворе ИМК 2000 мг/л на несколько секунд, что обеспечивает появление корней на 5 - 7 дней раньше, чем в вариантах с введением ИМК в питательную среду [45; 179; 200]. Развитие каллуса при этом минимальное. Положительные результаты укоренения были получены Туровской Н. (1989 г.) при замачивании микропобегов груши в растворе ИМК 30 мг/л и последующей высадкой в перлит [150]. Однако, вышеописанный способ может быть рекомендован только для укоренения микропобегов в небольших количествах, так как является достаточно трудоёмким и сложно реализуемым при массовом укоренении [196].

При больших производственных объёмах распространённой является практика введения ауксина непосредственно в питательную среду. В этом случае укоренение побегов может наблюдаться, начиная со второй недели культивирования в зависимости от растительного вида и концентрации стимулятора корнеобразования в среде. В литературных источниках отражены данные, подтверждающее успешное укоренение плодовых подвоев на средах с ИМК 0,5 - 1 мг/л и 1 - 4 мг/л [40; 53; 60; 111; 149; 161; 172; 187]; чёрной и красной смородины с ИМК 0,8 - 1 мг/л [140; 188], земляники, ежевики и малины с ИМК 0,5 мг/л [38; 112; 180; 190].

Замечено, что применение ИМК в отношении некоторых видов растений приводило к образованию каллуса и ингибировало ризогенез [110; 120]. Так, укоренение груши, миндаля более эффективно протекало в присутствии НУК 1 - 1,5 мг/л или ИУК 3 - 5 мг/л [41; 81; 104; 183; 184].

Ряд исследователей практикует обработку растений ауксинсодержащей пудрой с дальнейшей высадкой их в почвенные субстраты в нестерильных условиях. Этот способ укоренения позволяет сократить время культивирования побегов в условиях *in vitro* и тем самым удешевить технологию микроразмножения, однако применим он, в основном для тех растений, у которых образование корней начинается ещё на этапе микроразмножения [41; 109; 196; 200; 213].

Существенная роль в процессе корнеобразования в культуре *in vitro* принадлежит углеводам. Изменением уровня сахарозы в питательной среде можно стимулировать процессы ризогенеза у растений. Как правило, на этом этапе содержание сахаров снижают до 1 - 3 % [226; 234]. При отсутствии сахарозы в среде, даже под воздействием ИМК, корни не закладываются [170; 171; 234]. При культивировании косточковых пород, крыжовника хорошие результаты укоренения получены при добавлении в среду сахарозы 20 г/л [148; 192; 206]. Джигадло Е., Джигадло М. (2005 г.) наблюдали образование корней у сортов и подвоев вишни на питательной среде с сахарозой 15 г/л [117]. Исследования Durul (2023 г.) показали возможность успешного укоренения айвы при добавлении сахарозы 30 мг/л и НУК 2 мг/л [235]. Пронина И. (2008 г.) успешно применяла глюкозу в концентрации 20 - 30 г/л при укоренении подвоев яблони [184].

Часто авторы рекомендуют проводить процесс инициации корней в темноте, объясняя это усилением адсорбции стимуляторов роста [53; 67; 80; 95; 125; 235; 236]. Иногда корнеобразование может подавляться высокой интенсивностью света, которая стимулирует развитие фотосинтезирующих листьев. Для решения этого вопроса практикуют обёртывание нижней части пробирок фольгой или добавление в питательную среду активированного угля [236]. Mona Quambusch (2017 г.) в своих публикациях отражает успешную практику переноса высаженных на укоренение растений *Prunus avium* в темноту на 4 дня [257], Jae-Young Song (2022 г.) выдерживает побеги груши в темноте после замачивания в высококонцентрированном растворе ИМК или НУК [256]. Manel Boudabous, Mongia Mars (2009 г.) для укоренения использовали среду MS с добавлением ИМК и активированного угля 1 – 2 г/л [258]. Пронина И. (2008 г.) в ходе экспериментов также наблюдала положительное действие активированного угля (2 г/л) на количественные и качественные показатели развития корневой системы [184].

В некоторых случаях для ускорения сроков корнеобразования в питательную среду добавляют хлорогеновую или феруловую кислоты, различные антиоксиданты - аскорбиновую и лимонную кислоты, поливинилпирролидон, флороглюцинол и сорбенты [212; 213; 225; 237]. О действии последнего имеются сведения, что данный препарат также повышал выживаемость растений в почве [213; 238].

Для укоренения микропобегов *in vitro* используют агазированную или жидкую питательные среды [76; 118; 143; 196; 213]. К существенным достоинствам жидкой среды можно причислить значительное ускорение процесса образования корней, развитие корней второго порядка. Однако, необходимость использования подложки для удержания черенка в вертикальном положении исключает возможность её масштабного применения.

Кроме того, на жидкой среде возможно образование хрупких корней, что усложняет последующую адаптацию растений к нестерильным условиям.

В случае формирования слабой неразветвленной корневой системы некоторые исследователи предлагают использовать подрезание корневой системы (до 0,5 – 0,7 см) и повторную пересадку на питательную среду [153].

Температура - один из ключевых факторов на этапе ризогенеза. Во время индукции корнеобразования она оказывает большое влияние на состояние надземной части растения и успех укоренения в целом. Для побегов яблони температурный оптимум находится в пределах + 24 °С. Jones O. (1979 г.) сообщает, что при более низкой температуре побеги сначала накапливают антоциан, а затем становятся хлоротичными [59]. Длительное понижение температуры до +8 +10 °С создаёт стрессовую ситуацию для растений и приостанавливает корнеобразование [259].

По мнению некоторых исследователей укоренение *in vitro* является трудоёмким процессом, к тому же не всегда образованные в этих условиях корни способны приспособиться к нестерильным условиям. Более рациональным по завершении этапа микроразмножения может быть укоренение растений модифицированными традиционными методами в условиях *in vivo* - применяя гидропонику [36; 43] или прямое укоренение микрорастений в субстрате [43; 236; 239; 240]. В ряде случаев при посадке микрорастений в субстрат было укоренено от 75 до 90 % растений. О прямом укоренении микрорастений в субстрате с использованием ауксинсодержащей пудры упоминают Ташматова Л. (2013), Высоцкий В. (1998 г.) и др. Для изготовления обычно используют тальк и ИМК 50 - 100 мг, ИУК 50 - 200 мг. Обработанные в пудре растения высаживали в смесь торф : песок, торф : перлит, сфагнум; при возможности растения содержали под туманом при +21 °С. При строгом соблюдении технологии удавалось добиться 80 % укоренившихся растений [200; 246].

1. 2. 4. Адаптация микрорастений к нестерильным условиям.

Пересадка растений - регенерантов в почвенный субстрат, их последующая адаптация к нестерильным условиям являются наиболее трудоёмким и ответственным этапом, от которого зависит успех технологии клонального микроразмножения [212].

У листьев, образовавшихся в условиях *in vitro* отсутствует кутикулярный слой, широко открыты устьица. Ввиду этого, одной из основных причин, вызывающих гибель растений при пересадке в почву, является водный дефицит, создаваемый высокой транспирацией листьев при низкой поглотительной способности корней, их слабой

функциональности [96; 230]. Кроме того, в новых условиях корневая система приспособляется к усиленной инфекционной нагрузке и переходит с гетеротрофного способа питания на автотрофный. Состояние стресса, которое неизбежно в начальный период акклиматизации, может повлечь за собой большие потери растений [120; 153; 196; 213].

Чтобы пробирочные растения легче переносили изменения условий среды, необходимо строгое соблюдение некоторых условий. Готовыми для адаптации считаются растения, у которых хорошо сформирована корневая система, а листья достаточно развиты и способны к фотосинтезу, чтобы обеспечить полную автотрофность [136]. У исследователей нет единого мнения об оптимальных сроках пересадки укоренённых растений. Есть сведения, подтверждающие успешное проведение адаптации в период с весны до начала лета, а также в зимний период [160; 142; 153; 242]. Наилучшим временем для акклиматизации ягодных и плодовых культур является март - начало апреля, а при отсутствии регулируемых условий - май или сентябрь [153; 161]. Замечено что растения, высаженные в другие сроки, отличаются слабыми темпами роста [260].

Обнадёживающие результаты получены при использовании антитранспирантов с целью снижения уязвимости микропобегов при обезвоживании листьев [212; 243]. Метод заключается в том, что растения в течение всего акклиматизационного периода подвергаются обработке протекторными препаратами. В этом качестве используют раствор глицерина, парафин, жир в диэтиловом спирте (1:1) [153]. Важно подчеркнуть, что различные виды растений по-разному приспособляются к изменениям условий культивирования, поэтому рекомендации, сформулированные в литературных источниках, имеют только общий характер. Применение препаратов для регуляции обезвоживания растений находится на стадии изучения и до сих пор имеет противоречивые результаты.

Для достижения высоких результатов при адаптации растений стали широко и успешно применяться регуляторы роста [153]. Деменко В. и Лебедев В. (2011 г.) сообщают о успешном применении препаратов Крезацин, Мивал. С их помощью удалось повысить выход адаптированных растений до 75 - 100 % [261]. Высоцкий В., Валиков В. (2014 г.) сообщают о хорошей приживаемости растений и сокращении периода доращивания после применения Эпин-экстра и Силиплант [241].

Перед тем, как переместить растение в субстрат, корни тщательно отмывают от остатков агара и обрабатывают в растворе фунгицида, для уменьшения ингибирующего воздействия почвенных патогенов. Упоминается применение слабоокрашенного раствора

перманганата калия, фундазола 0,5 - 1 % [212; 261]. Для успешной адаптации растений важен состав субстрата. Он должен отличаться достаточной влагоудерживающей способностью, при этом обладать хорошими условиями для аэрации корневой системы; должен быть свободным от возбудителей грибных и бактериальных болезней, вредителей и семян сорняков [212]. Традиционно для посадки растений используют торф, чистый перлит, смесь торф : перлит (3 : 1), торф: песок (3 : 1 или 1 : 1), а также двухслойные субстраты [10; 53; 142; 153; 185; 240; 242]. Кухарчик Н., Красинская Т. (2010 г.) описывают преимущества применения ионообменных субстратов, которые заключаются в высоком уровне минерального питания, контролируемом составе и рН, хороших условиях аэрации и удобстве в работе [153].

Посадку растений осуществляют в торфяные стаканчики, гончарные горшки, пластиковые ящики, кассеты разной ёмкости [196].

Стерилизацию субстрата для адаптации проводят автоклавированием или сухим воздухом [244]. Эффективно использование индивидуальных контейнеров, заполненных стерильным субстратом, обогащённым компонентами минерального питания. Это позволяет практически для всех культур увеличить приживаемость до 90 - 95 % [200].

Для лучшей приживаемости растений, в течение первых двух недель адаптации рекомендуют создавать условия 100 % влажности и постепенно снижать её до 50 - 60 % в течение месяца [109; 142; 153; 213; 245]. С этой целью регенеранты помещают в условия искусственного тумана или в полиэтиленовые туннели, которые постепенно открывают до полной адаптации растений.

Адаптируемые растения нужно обеспечить необходимыми элементами питания для активного роста и развития [185]. Через 20 - 30 дней после посадки, хорошо укоренившиеся регенеранты подкармливают растворами минеральных солей. Первую подкормку рекомендуют проводить раствором с низкой концентрацией минеральных солей - раствором Кнопа [244], $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{4}$ раствора Мурасиге- Скуга [110]. В дальнейшем, в зависимости от вида растений, используют растворы Кнудсона, Мурасиге и Скуга, Чеснокова, Кнопа или комплексные минеральные удобрения. По мере роста, растения пересаживают в большие ёмкости со свежим субстратом.

Проблемой, с которой сталкиваются исследователи во время адаптации плодовых культур после условий *in vitro*, является недружный рост микрорастений. Есть сообщения о том, что через несколько недель после адаптации, растения прекращают рост, который может не возобновляться на протяжении 5 - 7 месяцев. Причиной этого явления считается

отсутствие периода покоя в жизненном цикле растений [208; 260]. Установлено, что почки древесных культур, не прошедшие режим холодной обработки, разворачивают только листья, при этом рост практически отсутствует. Такое же явление может наблюдаться у растений, размноженных методом *in vitro* [245]. Во избежание остановки роста некоторые исследователи практикуют включение в технологию микроклонального размножения временного помещения побегов или укоренённых растений в холодильник [210; 260]. В случаях, когда эта операция не была предусмотрена, её с успехом заменяет обработка растений гибберелловой кислотой [59].

Пролиферация пазушных меристем путём снятия апикального доминирования имеет минимальную степень риска в отношении получения неоднородного потомства [241]. Меристемные ткани растений непрерывно поддерживаются в эмбрионально активном состоянии, что делает их устойчивыми к генетическим отклонениям. Апексы и пазушные почки стебля являются наиболее предпочтительными объектами для клонального микроразмножения так как их генетическая резистентность способна противостоять возможному мутагенному действию системы культивирования [110; 120; 212]. Риск получения мутантных растений уменьшается за счёт увеличения количества исходных эксплантов, при исключении повторного использования растений, выращенных *in vitro* в качестве материнских, а также за счёт тщательного отбора растений, соответствующих данному фенотипу.

1.3. Размножение клоновых подвоев семечковых культур методом культуры клеток и тканей

Разработке методов микроклонального размножения вегетативных подвоев семечковых культур посвящено много работ. Экспериментаторы разных стран изучают и совершенствуют возможности массового размножения разных биотипов яблони, груши, айвы [19; 60; 61; 84; 161; 92; 169].

Исследователи, посвятившие свои труды размножению яблони в культуре тканей - Rafail S. Toma, Gharbia H. Danial [92], Keresa S. [60], Верзилин А. [111; 112], Матушкина О. [167; 169], Самусь В., Семенас О. [193]. Груша в условиях *in vitro* изучалась Behzad K. [19], Regni L., Facchin S. [84], Ломовской Л. [164], Матушкиной О. [172], Бартиш И. [104], Корбинец [149], Ташматовой Л. [200], Прониной И. [184].

Не смотря на приложенные усилия, сообщения о результатах исследований и научные рекомендации по размножению клоновых подвоев в ряде случаев существенно отличаются. Так, например, хорошее развитие эксплантов яблони при введении в

культуру *in vitro* достигнуто на средах В5 [204], MS [145; 146; 193], QL [173]; для эксплантов груши рекомендуют MS [200], QL [167; 169; 173].

Jones O. (1979 г.) сообщает о успешной стерилизации эксплантов яблони М26 в 10 % растворе Domestos [59]; Корнацкий С. (1991 г.) - при использовании йода 0,01 % [151]; Бартиш И. (1994 г.) стерилизовал грушу нитратом серебра 0,1 - 0,3 % [104].

Dunstan D. (1985 г.) рекомендует для размножения яблони М4 вводить в среду БАП 1,15 мг/л и ИМК 0,15 мг/л [44]. Laimer M. (2021 г.) предложил совместное использование БАП 2 мг/л и 0,4 мг/л НУК [62]. Однако существует другая точка зрения, согласно которой перенасыщение питательной среды гормонами нецелесообразно и может привести к угнетению растений. При этом на первых этапах технологии рекомендуют использовать только цитокинин. Высокие дозы цитокинина (от 2 мг/л в питательной среде и выше) в ряде случаев вызывают витрификацию микропобегов [149; 167; 204].

Рабочая концентрация азотнокислого аммония и калия в питательной среде у многих исследователей также отличается. R. Bahri-Sahloul (2005 г.) при микроклональном размножении груши снижает азотные соли в два раза на всех этапах [23], Корбинец П. (2017 г.) - на этапе удлинения побегов [149]. Ташматовой Л. (2013 г.) для формирования корней у некоторых сортов груши потребовалось снижение концентрации азота в питательной среде MS в 4 раза [200].

Литературные источники указывают, что на этапе ризогенеза корнеобразование может успешно протекать в присутствии в питательной среде ИМК [28; 142], в ряде случаев в присутствии НУК [19; 45; 61], а также при совместном применении ИМК и ИУК [69; 200; 256]. Эффективным оказалось и кратковременное воздействие ауксина на основание микропобегов яблони и груши [167]. Пронина И. (2008 г.) и Матушкина О. (2017 г.) установили положительный эффект совместного использования ауксинов и антиоксидантов (аскорбиновой, лимонной кислоты, ПВП) при культивировании яблони и груши [184; 169].

Существуют расхожие мнения относительно физических условий культивирования, стимулирующего действия спектрального состава.

Исходя из изложенного видно, что универсальной схемы для эффективного микроразмножения всех подвоев для яблони и груши не существует. Затруднение в воспроизводимости разработанных методик часто связано с их трудоёмкостью [176]. Очевидно, что видовые и индивидуальные особенности клоновых подвоев требуют дальнейшей углубленной разработки технологических этапов для каждого биотипа в отдельности [176].

Требуют дополнения и доработки такие вопросы как низкая способность к регенерации, чаще у груши; получение и поддержание асептической культуры; предотвращение ингибирования эксплантов продуктами окисления фенолов; оптимизация состава питательных сред на каждом этапе с учетом поставленных задач; отработка приёмов, повышающих эффективность этапов пролиферации, ризогенеза и адаптации микрорастений. Ключевые вопросы были включены в программу наших исследований и проработаны на изучаемых подвоях для груши и яблони.

1.4. Выводы

Метод микроклонального размножения является весомым инструментом при повышении генетического потенциала растительного организма в интересах современного общества. С его помощью решается проблема ускоренного массового размножения оздоровленных растений. Однако вариабельность растительных видов в реакции на культивирование в условиях *in vitro* подчёркивает необходимость индивидуальной отработки техники и методов микроразмножения, что требует проведения глубоких исследований в этой области. До сих пор открытыми для поиска и исследований остаются такие вопросы как выбор оптимального вида, размера и физиологического состояния экспланта; успешное применение малотоксичных стерилизующих препаратов; предотвращение факторов, ингибирующих жизнеспособность изолированной культуры; проблема регуляции морфогенеза *in vitro* - оптимизирование всех составляющих процесса культивирования для поддержания функций растительных тканей и их индукции к пролиферации и ризогенезу; разработка системного подхода при адаптации микрорастений к нестерильным условиям содержания.

Перечисленное легло в основу наших исследований по разработке технологии микроклонального размножения районированных и перспективных в Республике Молдова подвоев семечковых культур.

2. ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ И МЕТОДЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты и условия проведения научных исследований

Объектом наших исследований стали районированный в Молдове подвой яблони ММ106, а также выделенные отделом питомниководства как перспективные - подвой яблони 54-118; подвой для груши Pugiам - (ОН-11) и Sydo.

ММ106 - районированный классический вегетативный подвой яблони. Выведен в Англии селекционным путём на Ист - Моллингской опытной станции при скрещивании М1 с сортом Северный разведчик. Является одним из наиболее популярных и изученных подвоев для яблони. Повсеместно распространён в странах СНГ и Евросоюза.

Относится к группе среднерослых подвоев. Идеальная совместимость со всеми сортами яблони. Скорость роста зависит от почвенных условий. Подвой имеет гибкую, крепкую древесину. Обладает хорошей экологической пластичностью, легко приспосабливается к разным климатическим условиям. Корневая система хорошо развита, проникает глубоко в почву и обеспечивает растению хорошую устойчивость, дерево не требует дополнительной опоры. Отличается морозостойкостью корневой системы (до - 12 °С) и зимостойкостью. ММ106 может расти на тяжелых почвах, а также почвах с близким залеганием грунтовых вод. Прекрасно переносит непродолжительные периоды засухи. Активное плодоношение привитых на нём сортов наступает на 4 - 5-й год после посадки. Продолжительность жизни таких деревьев - 30 - 35 лет. В маточнике и питомнике подвой слабо поражается мучнистой росой, относительно устойчив к парше, чувствителен к фитофторозу и ожогу плодовых деревьев [8; 25; 55; 78; 102; 198; 181; 231].

54-118 - распространённый яблоневоый подвой полученный В. И. Будаговским на базе скрещивания Парадизки Будаговского (ПБ9) с гибридом 13-14. В зависимости от почв можно отнести к группе среднерослых или полукарликовых подвоев. Снижает высоту деревьев на 20 %. Объём кроны снижается на 1/3. Рано вступает в плодоношение; характеризуется повышенной и стабильной урожайностью. В садах поросль образуется редко. Отличается большой устойчивостью к вымоканию корневой системы. Морозоустойчивость корней (до - 16 °С), зимостойкость и засухоустойчивость подвоя высокие. Деревья на 54-118 надёжно закреплены в грунте, не требуют опоры. Не поражается мучнистой росой, относительно устойчив к парше. Испытания подвоя в странах СНГ, Европы показало его высокую адаптационную способность, что позволило его районировать или выделить как перспективным во многих промышленных зонах плодоводства [8; 182; 198].

Айва Sydo - французский полукарликовый клоновый подвой для айвы и груши. Получен в 1976 г. из айвы Анжерской на Анжерской исследовательской станции. На данный момент считается самым перспективным подвоем для груши с высокой степенью устойчивости к карбонатным почвам. По силе роста дерева на 40 - 60 % ниже стандартной высоты и на 15 % ниже, чем на подвое ВА-29. Подходит для насаждений средней и повышенной плотности. Обладает высокими показателями при вегетативном размножении. Совместим со всеми сортами айвы и груши основных промышленных сортов - Ноябрьская, Конференция, Аббат Фетель, Мария и др. Плоды груши на айве Sydo отличаются особой крупноплодностью. Обеспечивает высокую продуктивность в насаждениях. Рано вступает в плодоношение - на третий год после посадки. Зимостойкость подвоя средняя. Частично устойчив к фитофторе. Обладает толерантностью к вирусным инфекциям [78; 203; 231; 233; 250; 262; 264].

Pyr iam (ОН - 11) - среднерослый грушевый подвой, полученный от свободного опыления потомства сорта Old Home вследствие селекционной работы на Анжерской исследовательской станции в Франции. Хорошо переносит известковые почвы. Отличается толерантностью к бактериальному ожогу. Зимостойкость и засухоустойчивость лучше, чем у айвы. Обладает большей сортовой совместимостью чем подвой айвы, повышает производительность насаждений ранним вступлением в плодоношение и стабильными урожаями. Также представляет интерес с точки зрения компактности кроны. Плоды немного меньше, чем на ВА-29. В 1997 г. ОН-11 выпущен как Pyriam (от *Pyrus*, устойчивого к *Erwinia amylovora*) [203; 233; 249; 263; 264].

Исследования проводили в лаборатории вирусологии и фитосанитарного контроля Научно - Исследовательского Института Плодоводства в 2004 - 2007 г., а затем дополнили в 2019 - 2022 г. в Научно -Практическом Институте Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий (в настоящее время НИПИСХВМ). Материнские кусты исследуемых подвоев были протестированы на основные вирусы, поражающие данные виды, согласно международной системе сертификации посадочного материала [46]. Тестирование с помощью метода иммуноэлектронной микроскопии (ИЭМ) проводили на наличие латентных вирусов:

- хлоротической пятнистости яблони (ВХПЛ);
- борозчатости древесины яблони (ВБДЯ);
- ямчатости древесины яблони (ВЯДЯ)

Исходный материал - верхушки побегов, срезанные с вегетирующих растений в стадии активного роста - (май, июнь) и верхушки искусственно пробуждённых черенков после хранения при пониженных температурах (+2 +6 °С) - (февраль, март).

Культивирование микрорастений проводили в помещении площадью 40 м², оснащённом четырехъярусными стеллажами (каждый площадью около 0,9 – 1,2 м²) с 7-5 люминесцентными лампами. Освещение в пределах 3 - 4 тыс. люкс; оптимальный спектр достигался чередованием белых и цветных ламп (ЛБ - 40, ЛЦ - 40).



Рис. 2.1. Комната для культивирования микрорастений в условиях *in vitro*
(архив лаборатории вирусологии НИИП)

Температурный режим и перемешивание воздуха обеспечивалось двумя кондиционерами Mitsubishi SRK40 HA. Днём температура воздуха поддерживалась в пределах +22 +24 °С, ночью +18 +20 °С; светопериод 16 часов. Относительная влажность воздуха в помещении 60 - 75 %.

Работы по изолированию и пересадкам эксплантов и микрорастений проводились в ламинарах фирмы Flow и LCB. Соблюдение стерильных условий обеспечивалось с помощью вмонтированных на стены и в ламинарные боксы бактерицидных ламп - обработку проводили за 30 - 40 минут перед началом стерильных работ. Для удобства проведения дезинфекции, покрытие пола, стен и потолка в стерильной зоне, позволяющие делать влажную уборку.

Во время изолирования проводили вычленение эксплантов из растительных верхушек с использованием бинокляров МБС 1, МБС 9, Биолар.

Необходимый набор материалов и инструментов для проведения работ включал: мерные колбы и цилиндры, химические стаканы, чашки Петри, пробирки, стеклянные палочки, мембранные фильтры, ланцеты - глазные и хирургические, пинцеты, ножницы, скальпели, бритвенные лезвия, препаровальные иглы, фильтровальная бумага, фольга алюминиевая, стерильная марля.



Рис. 2.2. Процесс извлечения экспланта при введении в культуру *in vitro*
(архив лаборатории вирусологии НИИП)

Стерилизацию питательных сред и необходимых материалов проводили в автоклавах марки ГК - 100 - 2 с общей вытяжной вентиляцией для удаления паров. Режим работы: давление 1 атмосфера (температура 120 °С) в течение 13 - 18 минут для питательных сред; 1,5 атмосфер в течение 1,2 - 2 часов для стерилизации дистиллированной воды, ваты, пробок, фильтровальной бумаги.

Сушильные шкафы использовались для просушивания и стерилизации химической посуды и сопутствующих материалов при температуре 160 - 180 °С в течение 2 часов.

Бидистиллятор производительностью 5 - 10 л/час.

Для приготовления питательных сред использовали водяные бани для растворения маточных растворов, весы Mettler Toledo, весы аналитические Sartorius для взвешивания микронавесок, рН - метр лабораторный ЭВ - 380, иономер лабораторный И-160М, ЭВ -74, магнитные мешалки, холодильники для хранения маточных растворов, гормонов и витаминов - бытовой Calex и медицинский Sanyo, необходимый набор химических реактивов квалификации ч.д.а. и х.ч. (Sigma Aldrich, Fluka, Serva).

Химические реактивы и фитогормоны, применяемые в культуре тканей:

Макросоли:

- аммоний азотнокислый – NH_4NO_3 ;
- калий азотнокислый – KNO_3 ;
- кальций хлористый – $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- магний сернокислый – $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$;
- дигидрофосфат калия – KH_2PO_4 .

Микросоли:

- калий йодистый – KI ;
- борная кислота – H_3BO_3 ;
- сульфат марганца – $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$;
- этилендиаминтетрауксусной кислоты натриевая соль – $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- железо сернокислое – $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$;
- натрий молибденовокислый – $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- кобальт хлористый – $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$;
- сульфат цинка $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$;
- сульфат меди $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

Витамины:

- мезо-инозитол;
- тиамин хлорид (В1);
- пиридоксин хлорид (В6);
- никотиновая кислота (РР);
- аскорбиновая кислота (С)

Регуляторы роста:

- гиббереллин (ГК₃);
- ауксины: β-индолилмасляная кислота (ИМК); β-индолилуксусная кислота (гетероауксин, ИУК); α-нафтилуксусная кислота (НУК);
- цитокинины: 6-бензиламинопурин (БАП)

Сахароза, агар - агар.

Адаптацию растений - регенерантов проводили в остекленной теплице площадью 1000 м². В жаркий период проводили побелку стёкол раствором извести.

Для улучшения роста и развития микрорастений в субстрат периодически вносили минеральные удобрения. В период вегетации проводили своевременные мероприятия по защите растений для соблюдения фитосанитарных требований к содержанию растений.

Первые недели адаптации молодые растения укрывали каркасами из полиэтиленовой плёнки для сохранения влажности и притеняли от прямых солнечных лучей.

2.2. Методы научных исследований на основных этапах технологии микрклонального размножения

Процесс микрклонального размножения делится на 4 этапа:

- 1- введение в культуру *in vitro* - отбор исходного растения, стерилизация и вычленение эксплантов, создание оптимальных условий для их развития на питательной среде,
- 2- микрклональное размножение - снятие апикального доминирования, стимуляция развития пазушных почек, микрочеренкование побегов, создание условий для развития качественных растений,
- 3- укоренение микрорастений - индукция процесса корнеобразования,
- 4- адаптация укоренённых растений - пересадка пробирочных растений в нестерильные условия.

Каждый этап отличался соответствующими методами и приёмами проведения исследований. В основу наших экспериментов были положены классические приёмы работы с культурой изолированных тканей и органов растений (по Чернец А. [206], Высоцкому В. [246], Туровской Н. [150; 204], Матушкиной О. [172], Прониной И. [184]).

2.2.1. Этап введения в культуру *in vitro*

Материал для изолирования отбирали с здоровых, чистосортных исходных растений, наиболее развитых и продуктивных, свободных от грибных и бактериальных заболеваний.

В культуру *in vitro* вводили верхушки побегов размером 4 - 8 мм. Стерилизация материала является сложной задачей, так как поверхностные ткани растений заражены грибными и бактериальными патогенами. При выборе стерилизующего агента мы учитывали 2 условия: необходимость нейтрализовать микрофлору и не повредить ткани растений.

Стерилизацию начинали с подготовки материала, заключающейся в удалении листочков и кроющих чешуек и в промывке верхушек под проточной водой в течение 1 часа. Окончательную стерилизацию проводили в ламинар - боксе над спиртовкой. Для этого материал погружали на несколько секунд в 70⁰ этиловый спирт или раствор Domestos (5 мл на 100 мл дистиллированной воды в течении 10 минут). В качестве стерилизаторов применяли препараты, содержащие активный хлор - гипохлорит кальция и Табидез 56 (дихлоризоцианурат натрия); ртутьсодержащий препарат - сулему; пероксид водорода. Экспозиция при стерилизации растительного материала составила от 2 до 25 минут. Экспланты подвергались 3 - кратной промывке от дезинфицирующего раствора автоклавированной дистиллированной водой в течение 5 - 15 минут.

Для яблони, которая на этапе введения в культуру характеризуется способностью выделять фенольные вещества, мы предусматривали применение антиоксидантов и детоксицирующих препаратов. При лёгком незначительном пожелтении питательной среды в зоне контакта с изолятом, проводили его пересадку на чистую питательную среду.

Успех выращивания изолированных верхушек в значительной степени связан с правильно подобранным составом питательной среды. Чтобы обеспечить экспланты минеральными элементами необходимыми для сбалансированного роста и развития, мы использовали среду на основе минеральных солей Мурасиге-Скуга (1962) [71], как наиболее универсальную и многоцелевую для большинства плодовых растений; а также модифицированную среду Мурасиге-Скуга с пониженной в два раза концентрацией макросолей и среду Ллойда -Маккауна (WPM) [66] (таб. 2.1).

На этапе изолирования состав питательных сред дополняли мезо-инозитолом 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.

При приготовлении питательных сред пользовались заранее приготовленными исходными концентрированными растворами, за исключением мезо-инозитола, аскорбиновой кислоты и сахарозы.

Приготовление растворов макросолей на примере питательной среды по Мурасиге-Скуга: каждый раствор готовили отдельно в литровой колбе, на которой делали соответствующую надпись. Для этого в колбу доливали 400 мл бидистиллированной воды, подогревали ее до 60 °С, растворяли в ней реактив, после чего доливали водой до уровня одного литра.

- NH₄NO₃ – 82,5 г/л;
- KNO₃ – 95 г/л;

- $\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ – 88 г/л;
- $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$ – 74 г/л;
- KH_2PO_4 – 34 г/л

На 1 литр питательной среды вносили по 20 мл азотсодержащих растворов и по 5 мл остальных.

Таблица 2.1. Композиция минеральных солей в питательных средах для микроклонального размножения изучаемых подвоев

Компоненты:	Концентрация веществ, мг/л среды:		
	MS	WPM	B5
NH_4NO_3	1650	400	-
KNO_3	1900	-	2500
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	556	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	96	150
K_2SO_4	-	990	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370	250
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	-	150
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	134
KH_2PO_4	170	170	-
$\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	37,3	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8	-
KJ	0,83	-	0,75
H_3BO_3	6,2	6,2	3,0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	22,3	-
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	-	10
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	8,6	2,0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,25	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	-	0,025
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	-	10

Приготовление растворов микроэлементов по Мурасиге-Скуга:

а) на 1 литр бидистиллированной воды вносили:

- KI – 0,166 г;
- H_3BO_3 – 1,24г;

- $\text{MnSO}_4 + 4 \text{H}_2\text{O} - 4,46\text{г}$;
- $\text{Zn SO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O} - 1,72\text{г}$

На 1 литр питательной среды – 5 мл маточного раствора.

б) на 1000 мл бидистиллированной воды:

- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O} - 0,05\text{г}$;
- $\text{CuSO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O} - 0,005\text{г}$;
- $\text{CoCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O} - 0,005\text{г}$

На 1 литр питательной среды использовали 5 мл раствора.

в) для приготовления хеллата железа в 1 литре дистиллированной воды растворяли:

- $\text{Na}_2 \text{ЕДТА} - 7,45 \text{ г}$;
- $\text{Fe SO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O} - 5,57 \text{ г}$

Приготовление растворов витаминов:

В 100 мл бидистиллированной воды отдельно растворяли:

- тиамин хлорид (B_1) 100 мг;
- пиридоксин хлорид (B_6) 100 мг;
- никотиновую кислоту (PP) 100 мг.

Приготовление растворов ростовых регуляторов:

Ауксины и гиббереллиновую кислоту: 100 мг препарата растворяли в 1 мл спирта и доливали 99 мл бидистиллированной воды. Растворы готовили отдельно.

Цитокинин: 100 мг препарата растворяли в 1 мл HCl 1Н и доливали 99 мл бидистиллированной воды.

Агар - агар растворяли в половинном объеме воды, нужной для приготовления питательной среды и нагревали до полного расплавления. рН доводили до нужных пределов после окончания приготовления среды. С помощью 1Н KOH понижали кислотность среды, а с 1Н HCl - повышали. Рекомендуемые пределы рН для подвоев семечковых 5,6 - 5,8.

Автоклавирование питательной среды проводили в режиме 13 - 18 минут при 1 атм. В связи с накоплением в питательной среде продуктов метаболизма, а также в связи с её истощением, развивающиеся экспланты пересаживали на свежую питательную среду каждые 5 недель.

2.2.2. Микрклональное размножение подвоев

Этап микрклонального размножения пробирочных растений основывается на подавлении апикального доминирования и активации пазушных меристем. Начало активного процесса побегообразования наблюдали со 2–4-го пассажа после

изолирования. Образовавшийся конгломерат почек и побегов подвергался препарированию, при котором его разделяли на отдельные розетки из 3 - 4-х побегов и высаживали на свежую питательную среду. Повреждённые наркотизирующие листья и побеги при этом удаляли. Материал, подвергшийся бактериальному или грибному заражению, отбраковывали; в исследованиях участвовали исключительно здоровые, стерильные растения.

На этапе микроразмножения изучали влияние минерального состава питательной среды на скорость пролиферации и развитие микрорастений: в схему опыта вошли питательные среды по прописи Мурасиге-Скуга (MS) с полной концентрацией солей, а также с пониженным в два раза содержанием аммонийного азота; питательная среда Гамборга и Эвелега (B5) и Ллойда -Маккауна (WPM).

Процессы дифференциации тканей регулировали комбинацией и концентрацией экзогенных фитогормонов, которые индуцируют деление и растяжение клеток в тканях растений. Было изучено действие регуляторов роста как БАП, ИМК, ИУК, НУК, ГК₃.

На основе питательных сред, на которых были зафиксированы хорошие показатели роста и развития растений, была изучена целесообразность вариаций в концентрациях неорганических веществ и витаминов; был заложен опыт по влиянию расположения побега в пространстве на пролиферацию.

С целью повышения выхода пригодных к ризогенезу растений были изучены несколько способов удлинения микропобегов в фазе элонгации.

2.2.3. Укоренение подвоев *in vitro*

Чтобы получить полностью сформированные растения, микропобеги по одиночке пересаживали на специальную питательную среду, индуцирующую образование корней. Для хорошего укоренения побегов применяли обеднённый минеральный состав питательной среды.

В качестве индукторов ризогенеза хорошо себя зарекомендовали β-индолилмасляная, β-индолилуксусная и α-нафтилуксусная кислоты. В то же время ауксин, введенный в питательную среду, в ряде случаев способен вызывать разрастание каллуса и тормозить рост корней. Учитывая эти факты, нами было изучено несколько способов индукции корнеобразования.

Стимуляцию ризогенеза проводили только для одиночных, хорошо развитых пробегов, длина которых превышала 15 мм. Обычно, продолжительность фазы укоренения составляла от 3 недель у легко укореняемых подвоев и до 6 - 7 недель у трудно укореняемых.

Об эффективности применяемых методов судили по биометрическим параметрам - по проценту укоренившихся микропобегов, количеству и длине корней, высоте растений, числу листьев, а также поэтапно анализировали динамику процесса корнеобразования.

2.2.4. Адаптация укоренённых растений к нестерильным условиям

Адаптация растений - финальный, но весьма сложный технологический этап. Выращенные *in vitro* растения под воздействием ряда факторов (снижение влажности воздуха, инфекционной нагрузки, смены субстрата) нелегко приживаются в условиях *ex vitro*.

Адаптационные возможности к изменению условий жизнедеятельности зависят от вида растений, поэтому в литературе сформулированы лишь самые общие рекомендации по высадке в субстрат.

Перенос растительного материала из *in vitro* в условия *ex vitro* выполняли по технологии, разработанной и апробированной сотрудниками лаборатории вирусологии НИИП в результате многолетнего опыта.

Пересадку микрорастений начинали, когда корневая система была хорошо сформирована, а молодые листья достаточно развиты и способны к фотосинтезу, чтобы обеспечить растению полную автотрофность. Микропобеги отмывали от остатков питательной среды и обрабатывали в слабом растворе марганцовокислого калия. Для предупреждения развития корневой гнили на начальном этапе адаптации, проводили обработку раствором фунгицида.

Пересадку проводили в пасмурные дни или вечернее время для предупреждения транспирационной нагрузки на укоренённые *in vitro* микрорастения. Оптимальные сроки - конец апреля, начало мая. Первые три недели высаженный материал находился в пленочных туннелях, позволяющих поддерживать влажность воздуха на уровне 90 - 100 %. Ежедневно проводили многократное краткосрочное проветривание растений, постепенно увеличивая его продолжительность. К концу 3 - й недели влажность снижали до 60 - 70 %, увеличивая период проветривания до 2 - 3-х часов в день. Через 5 - 6 недель укрытие полностью снимали.

Вегетационный уход включал в себя полив и проведение своевременных фитосанитарных мероприятий и регулярных подкормок.

При адаптации вегетативных подвоев яблони периодически мы сталкивались с тем, что часть растений после культуры *in vitro* отставала в росте и требовала доращивания на следующий вегетационный период. Это объясняется отсутствием у лабораторных растений периода покоя, водными стрессами, с которыми сталкиваются растения при

акклиматизации [208; 260]. Во время доращивания были продолжены наблюдения за приживаемостью и динамикой роста растений.

2.3. Планирование и постановка экспериментов

Планирование эксперимента - вступительный этап при поиске оптимальных решений для достижения максимальной точности результатов и сохранения их статистической достоверности. Перед началом исследований нами были запланированы опыты и условия их проведения, необходимые для реализации поставленной задачи.

Схемы основных экспериментов:

• Стерилизация иницируемых эксплантов

Чтобы получить асептическую культуру изучаемых биотипов были составлены экспериментальные схемы для испытания нескольких стерилизующих препаратов в разных концентрациях.

Результаты оценивали по количеству способных к регенерации эксплантов.

Таблица 2.2. Экспериментальные схемы стерилизации эксплантов подвоев семечковых культур

Опыт 1 (табл. 3.2 - 3.3)
Исходный материал: верхушки искусственно пробуждённых черенков
Период изолирования: февраль
Стерилизатор - длительность обработки: гипохлорит кальция 6% -10 минут; сулема 0,1% - 5 минут
Опыт 2 (табл. 3.2 - 3.3)
Исходный материал: верхушки вегетирующих побегов
Период изолирования: май
Стерилизатор - длительность обработки: гипохлорит кальция 6% - 10 минут; сулема 0,1% -5 минут
Опыт 3 (табл. 3.4)
Исходный материал: верхушки вегетирующих побегов
Период изолирования: май
Стерилизатор и длительность обработки: Табидез 56 – 0,5 % - 2 минуты, 5 минут, 10 минут
Опыт 4 (табл. 3.6)
Исходный материал: верхушки вегетирующих побегов
Период изолирования: май
Стерилизатор и длительность обработки: пергидроль 30 % - 7 минут; пергидроль 15 % - 15 минут; пергидроль 10% - 25 минут

• Применение антиоксидантов и протекторов

Были изучены протекторные свойства растворов ПЭГ, ПВП, ДИЕКА, аскорбиновой кислоты для подавления токсического действия полифенольного окисления в отношении эксплантов. Опытные варианты (А, В, С) отличались кратностью обработки и способом воздействия препаратов на верхушки побегов:

А - обработка эксплантов в растворе антиоксидантов в течение 6 минут до начала стерилизации.

В - обработка эксплантов в растворе антиоксидантов в течение 6 минут до проведения стерилизации и повторная краткосрочная обработка после стерилизации.

С - обработка эксплантов в растворе антиоксидантов в течение 6 минут до проведения стерилизации, а также извлечение апикальной части верхушки в растворе антиоксиданта.

Изолирование проводили на ранних стадиях активной вегетации растений. О целесообразности применения ингибиторов окисления судили, сравнивая полученные результаты с контрольным вариантом, исключаящим протекцию эксплантов (табл. 3.9).

• Минеральный состав питательных сред для изолированных культур

В поиске оптимальной композиции, обеспечивающей рост и развитие эксплантов, были испытаны 3 варианта питательных сред (табл. 3.10):

1 - среда на основе минеральных солей Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением БАП 1 мг/л.

2 - модифицированная среда MS с пониженной в два раза концентрацией макросолей, с добавлением БАП 1 мг/л.

3 - среда Ллойда -Маккауна (WPM) с добавлением БАП 1 мг/л.

Среды были дополнены мезо-инозитолом 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.

• Гормональный состав питательных сред для развития изолированных культур

На основе модифицированной питательной среды по MS с концентрацией макросолей пониженной в два раза (в варианте 5 - концентрация солей была понижена в три раза) изучили действие комбинации гормональных препаратов на развитие первичных эксплантов (табл. 3.11).

Схема опыта:

Фактор А: концентрация БАП: ИМК

A1. 0,5 мг/л : 0 мг/л

A5. 1 мг/л : 0 мг/л

A2. 0,5 мг/л : 0,1 мг/л

A6. 1 мг/л : 0,1 мг/л

A3. 0,5 мг/л : 0,5 мг/л

A7. 1 мг/л : 0,5 мг/л - контроль

A4. 1 мг/л : 0 мг/л

A8. 1 мг/л : 1 мг/л

Фактор В: подвой

B1. MM 106

B3. Sydo

B2. 54-118

B4. Pyriam

Питательную среду для введения в культуру *in vitro* оценивали путем визуальных наблюдений за развивающимися эксплантами. В наших исследованиях мы использовали 4-х балльную шкалу, по Туровской Н. [150; 204], Матушкиной О. [171]:

1 - эксплант без развития - к этой группе относились экспланты не получившие развития более, чем небольшое увеличение объема и высоты.

2 - линейный рост, раскрытие первых 2-3-х листочков – рост эксплантов и обязательное развитие листовой розетки не зависимо от высоты экспланта.

3 - образование розетки с листьями и зачатками почек – экспланты в начальной стадии процессов новообразования; помимо листьев, у основания верхушек наблюдается формирование почек.

4 - формирование конгломерата почек и побегов – хорошо развитые полноценные экспланты, у которых сформировалась группа почек, самые развитые из которых переросли в небольшие первые побеги.

Используя полученные данные, рассчитали влияние на регенерацию таких факторов как концентрация стимуляторов роста (А), генотип подвоя (В) и влияние взаимодействия этих факторов (АВ) (табл. 3.12).

• **Минеральный состав питательной среды для размножения микрорастений**

Было изучено действие биотипа и минерального состава питательной среды на скорость размножения и развитие микрорастений. В схему опыта вошли 5 вариантов питательных сред для подвоев яблони и 3 варианта питательных сред для подвоев груши, дополненные БАП 1 мг/л и ИМК 0,5 мг/л (табл. 3.14 и 3.19):

Фактор А: подвой яблони

А1. ММ 106

А2. 54-118

Фактор В: минеральные соли

В1. среда MS без гормонов

В4. среда В5

В2. среда MS - контроль

В5. среда WPM

В3. среда MS с NH_4NO_3 1/2

Фактор А: подвой для груши

А1. Sydo

А2. Pyriam

Фактор В: минеральные соли

В1. среда MS - контроль

В5. среда WPM

В3. среда MS с NH_4NO_3 1/2

Учеты включали количество дополнительных побегов, коэффициент размножения, среднюю и максимальную высоту побегов.

• **Гормональный состав питательной среды для размножения микрорастений**

Для подбора оптимального соотношения регуляторов роста для активного размножения подвоев, испытаны 4 концентрации цитокинина (БАП 0,5; 1; 2; 3 мг/л) и 2 концентрации ауксина (ИМК 0,5; 1 мг/л), что в общей сложности обеспечило 12 различных комбинации (табл. 3.22). В одном из вариантов ИМК был заменен на НУК. Изучаемые факторы:

Фактор А: концентрация БАП : ИМК

A1. 0,5 мг/л: 0 мг/л	A7. 2 мг/л: 0,5 мг/л
A2. 1 мг/л; 0 мг/л	A8. 3 мг/л :0,5 мг/л
A3. 3 мг/: 0 мг/л	A9. 0,5 мг/л: 1 мг/л
A4. 0,5 мг/л: 0,5 мг/л	A10. 1 мг/л :1мг/л
A5. 1 мг/л :0,5 мг/л- контроль	A11. 2 мг/л :1 мг/л
A6. 1 мг/л :0,5 мг/л	A12. 3 мг/л :1 мг/л

Фактор В: подвои

B1. ММ 106	B3. Sydo
B2. 54-118	B4. Pygiam

• **Удлинение побегов**

Для повышения количества пригодных к ризогенезу микропобегов, изучено действие гиббереллиновой кислоты (ГК₃) на высоту размноженных микропобегов на примере подвоев яблони (табл. 3.28, рис. 3.5).

Схема опыта состояла из комбинаций БАП: ГК₃ в разных концентрациях:

Фактор А: подвои

A1. ММ 106	A2. 54-118
-------------------	-------------------

Фактор В: концентрация БАП : ГК₃

B1. без гормонов-контроль	B7. 2мг/л : 1 мг/л
B2. 1 мг/л : 0,5 мг/л	B8. 4 мг/л : 1 мг/л
B3. 2 мг/ : 0,5 мг/л	B9. 8 мг/л : 1 мг/л
B4. 4 мг/л : 0,5 мг/л	B10. 4 мг/л : 2 мг/л
B5. 8 мг/л : 0,5 мг/л	B11. 4 мг/л : 4 мг/л
B6. 1 мг/л : 1 мг/л	B12. 4 мг/л : 8 мг/л

Результаты оценивали путём подсчёта количества микропобегов высотой более 1,5 см, а также учетом сформировавшихся дополнительных побегов.

Кроме этого, была изучена эффективность действия разных концентраций неорганических веществ и витаминов в питательной среде, а также заложен опыт по влиянию расположения побега на пролиферацию. Результаты этих исследований оценивали по коэффициенту размножения, рассчитанного путём деления количества размноженных побегов на число исходных; по средней высоте растений; приросту; количеству и качеству пригодных для укоренения растений.

● **Вид ауксина.** Для подбора стимулятора корнеобразования были испытаны 3 вида ауксина в концентрации 0,5 мг/л на питательной среде MS с пониженной концентрацией минеральных солей (табл. 3.31).

Фактор А: подвой

A1. MM 106

A3. Sydo

A2. 54-118

A4. Pyriam

Фактор В: вид ауксина

B1. ИМК - контроль

B3. ИУК

B2. НУК

● **Способы укоренения микрорастений, концентрация ауксинов**

Изучены несколько способов индукции корнеобразования в сочетании с различными концентрациями ауксинов (табл. 3.35, 3.40).

1) прямое внесение ауксинов в состав питательной среды:

Фактор А: концентрация ауксина:

A1. ИМК 0,5 мг/л

A4. ИМК 3 мг/л

A2. ИМК 1 мг/л

A5. НУК 3 мг/л

A3. НУК 1 мг/л

Фактор В: подвой

B1. MM106

B3. Sydo

B2. 54-118

B4. Pyriam

2) насыщение побегов на среде с ауксином в течение 7 дней и последующей пересадкой на питательную среду без регуляторов роста:

Фактор А: минеральные соли и концентрация ауксина:

A1. MS 1/2, ИМК 3 мг/л

A4. MS 1/2, ИМК 4 мг/л

A2. MS 1/4, ИМК 3 мг/л

A5. MS 1/2, ИМК 5 мг/л

A3. MS 1/8, ИМК 3 мг/л

Фактор В: подвой

В1. ММ106

В3. Sydo

В2. 54-118

В4. Pygiam

3) укоренение растений на жидкой питательной среде с использованием опоры из фильтровальной бумаги:

- MS $\frac{1}{2}$ с добавлением агара 6 мг/л и ИМК – 0; 0,5; 1 и 3 мг/л.

- MS $\frac{1}{2}$ без агара и ИМК – 0; 0,5; 1 и 3 мг/л.

На этом этапе учитывали количество укоренившихся микропобегов, динамику укоренения, высоту растений после укоренения, количество корней на один побег и их среднюю длину.

• Субстрат для акклиматизации

В процессе адаптации были испытаны 6 разновидностей субстрата (табл. 3.44):

- торф : перлит (1:1),

- торф : песок (2:1),

- двухслойные субстраты, где основным компонентом был торф : перлит (1:1), а в качестве верхнего слоя (3 - 4 см - зона размещения корней) перлит разных фракций диаметром от 1 до 5 мм.

• Внесение минеральных удобрений

Было изучено развитие адаптированных растений под воздействием элементов минерального питания (рис. 3.6, 3.7). Учитывали прижившиеся растения, высоту подвоев.

Варианты опытов предусматривали:

- **листовое внесение удобрений:**

Polyfeed 0,5% или 1% с интервалом 15 дней.

- **корневой внесение удобрений:**

Polyfeed 0,5% или 1% с интервалом 15 дней;

Polyfeed 1% с интервалом 10, 15 или 20 дней;

NH₄NO₃ 1% с интервалом 15 дней;

раствор Мурасиге- Скуга с интервалом 15 дней.

При разработке технологии микроразмножения был использован лабораторный метод исследования, который позволяет проводить опыты в искусственных, строго регулируемых условиях. Второй этап работы характеризовался переходом на вегетационный метод исследования. Акклиматизация размноженных растений проводилась в условиях теплицы, где также регулировались условия среды.

В некоторых экспериментах в качестве единицы сравнения использовали нулевой контроль - такой вид контроля, на который изучаемый вид не распространяется. Реакция растений на состав питательных сред и гормональных веществ индивидуальна. Поэтому при изучении действия физиологических активных веществ на растения - регенеранты нами был проанализировали опыт исследователей в этой области и в качестве контроля приняты наиболее часто используемые классические комбинации. В случае отсутствия отправных данных мы применяли крайний вид контроля - использовали одну из крайних градаций схемы опыта. Например:

Влияние стерилизатора на выход чистых эксплантов:

1. Без обработки (контроль)
2. Гипохлорит Са - 3 %
3. Гипохлорит Са - 6 %

(в схеме применяется нулевой вид контроля)

Влияние сочетания БАП : ГК₃ на развитие микропобегов:

1. БАП 0,1 мг/л : ГК₃ 0,5 мг/л (контроль)
2. БАП 1 мг/л : ГК₃ 0,5 мг/л
3. БАП 2 мг/л : ГК₃ 0,5 мг/л

(в схеме применяется крайний вид контроля)

Основные эксперименты проводились в трех - четырёх повторностях. В каждой повторности изучалось от 7 до 60 растений. Математическую обработку данных проводили по одно- и двухфакторному дисперсионному анализу с помощью пакета для статистической обработки Microsoft Office Excel 2019.

Расчёт наименьшей существенной разности (НСР) проводили с помощью формул:

1. обобщенная ошибка средней: $S_x = \sqrt{S^2 / n}$
2. ошибка разности средней: $S_d = \sqrt{2S^2 / n}$.
3. наименьшая статистически значимая разность: $НСР = t_{0,5} * S_d$,

В которых S - выборочное стандартное отклонение; n – объём выборки; t 0,5 - табличное значение критерия t для 5% уровня значимости [126; 165].

Ввиду того, что исследования проводились в лабораторных, а затем в тепличных условиях, которые позволяют поддержать абсолютно одинаковые условия в пространстве, необходимость составления плана размещения вариантов и повторностей отсутствовала.

Все учеты, анализы и наблюдения проводились только на типичном однородном материале. Из обязательных опытных учётов проводили:

- учёт микроклиматических условий;

- учёт химического состава среды.

Целевые учёты – статистические:

- учёт количества жизнеспособной асептической культуры;
- учёт коэффициента размножения растений при изучении питательных сред;
- учёт укореняемости растений на составах с преобладанием ауксинов;
- учёт приживаемости растений при акклиматизации.

Сопутствующие учёты – биометрические:

- высота растений, их исходное количество, диаметр стволика;
- интенсивность развития растений;
- длина, толщина и количество корешков на одно растение;
- сила роста и приживаемость при акклиматизации

2.4. Выводы

При реализации исследований были задействованы методические рекомендации по размножению плодовых культур методом микроклонального размножения [172; 184; 206].

В процессе работ применяли лабораторный и вегетационный методы постановки эксперимента; были соблюдены кратность, чистота и достоверность исследований. Схемы опытов составляли по принципу единственного различия и тождества остальных факторов.

Большинство полученных данных были обработаны двухфакторным дисперсионным анализом для выявления статистически значимой разницы среди вариантов по отношению к контролю и к средним значениям по изучаемым показателям. Установлены доли влияния изучаемых факторов на полученный результат.

3. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ПОДВОЕВ СЕМЕЧКОВЫХ КУЛЬТУР

3.1. Введение культуру *in vitro* эксплантов подвоев семечковых культур

3.1.1. Стерилизация исходного материала

На начальном этапе клонального микроразмножения первостепенным фактором, влияющим на успешное введение в культуру *in vitro*, является получение стерильного растительного материала. Вследствие проведения дезинфицирующей обработки не редко происходит сильное повреждение растительных тканей и их дальнейшее развитие может быть затруднено [265]. В наших исследованиях критерием пригодности препарата для стерилизации служил процент эксплантов свободных от бактериальной и грибной инфекции, способных к дальнейшему росту и регенерации. Эффективность применения стерилизаторов в расширенном диапазоне была изучена на примере подвоя ММ106. Данные таблицы 3.1 отчётливо демонстрируют важную роль дезинфицирующих мероприятий.

Таблица 3.1. Влияние стерилизующих препаратов на получение асептической культуры вегетирующих верхушек подвоя яблони ММ106

Стерилизатор	Экспозиция											
	5 минут			10 минут			15 минут			20 минут		
	инфекция, %	гибель, %	развивается эксплантов %	инфекция, %	гибель, %	развивается эксплантов %	инфекция, %	гибель, %	развивается эксплантов %	инфекция, %	гибель, %	развивается эксплантов %
без обработки (контроль)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Ca(ClO) ₂ 3 %	97	0	3	96	0	4	80	0	20	76	0	24
Ca(ClO) ₂ 6 %	82	0	18	74	0	26	58	0	42	20	0	80
Сулема 0,05%	39	0	61	21	0	79	0	32	68	0	60	40
Сулема 0,1 %	6	0	94	0	12	88	0	79	21	0	94	6

В контрольном варианте 100 % эксплантов были заражены патогенной микрофлорой. Успешность применения хлорсодержащих препаратов зависела от их концентрации и продолжительности обработки иницируемых верхушек. При использовании гипохлорита кальция 3 % выход жизнеспособных эксплантов повышался в 8 раз по мере увеличения продолжительности обработки. Однако доля развивающихся

верхушек при этом не превышала 24 % из-за высокой инфицированности эксплантов. Концентрация антисептического раствора была недостаточной для подавления патогенной микрофлоры. Стерилизация материала в гипохлорите кальция 6 % в течение 20 минут обеспечила 80 % здоровых потенциальных верхушек.

Результативной была стерилизация в растворе хлорида ртути. После обработки в течение 5 - 10 минут практически не наблюдали гибели верхушек. При использовании 0,05 % раствора доля эксплантов способных к дальнейшей регенерации составила от 61 до 79 %. Достичь максимального количества стерильных развивающихся эксплантов (94 %) удалось при обработке сулемой 0,1 % в течение 5 минут. Увеличение периода воздействия стерилизатора до 15 - 20 минут влекло за собой повреждение растительных тканей.

Успех введения в культуру *in vitro* коррелирует с множеством факторов, в числе которых вид иницируемого экспланта, фаза его вегетационного развития, условия содержания материнских растений. Нами была оценена эффективность инициации в культуру *in vitro* подвоев яблони и груши в разные периоды года – в феврале (верхушки искусственно пробуждённых растений) и в мае (активно вегетирующие верхушки).

В результате наших наблюдений установлено, что молодые, искусственно пробуждённые верхушки обладали низким уровнем контаминации микроорганизмов – количество иницированных эксплантов, свободных от бактериальной и грибковой инфекции было высоким, а их введение в культуру *in vitro* в меньшей степени зависело от стерилизующего агента и позволяло с успехом использовать малотоксичные препараты (табл. 3.2, 3.3).

При изолировании таких эксплантов у большинства испытуемых биотипов во всех вариантах достигнут хороший асептический эффект. У искусственно пробуждённых верхушек подвоя ММ106 получено от 71 до 77 % асептической культуры, а у подвоя 54-118 от 58 до 72 % [145].

У подвоя Sydo, оптимальное соотношение между стерильными и развивающимися эксплантами получено при стерилизации 6 % гипохлоритом кальция в течение 10 минут (табл. 3.3). Доля жизнеспособных эксплантов была максимальной и составила 80 %. Повреждение и гибель растительного материала в этом варианте отсутствовали. Раствор сулемы 0,1 % эффективно подавлял развитие бактериальной и грибной флоры, но значительная часть стерильных эксплантов некротизировала. Доля жизнеспособных верхушек после обработки сулемой составила 77 %.

При инициации в культуру *in vitro* подвоя Ругіам зафиксирован пониженный выход жизнеспособных эксплантов. Не зависимо от того, какого типа экспланты были

использованы, доля способного к регенерации материала не превышала 57 % при обработке гипохлоритом кальция и 64 % при обработке сулемой. Значительная часть изолированных эксплантов была потеряна в результате инфицирования или ингибирующего действия стерилизующего агента, что указывает на необходимость изучения дополнительных режимов стерилизации.

Таким образом, введение в культуру *in vitro* верхушек искусственно пробуждённых растений позволяло делать выбор в пользу малотоксичных препаратов. При стерилизации таких эксплантов 6 % гипохлоритом кальция в течение 10 минут нам удалось получить от 57 до 80 % асептической культуры для всех изученных биотипов (табл. 3.2, 3.3).

Таблица 3.2. Стерилизация клоновых подвоев яблони в зависимости от вида экспланта

Вид экспланта (период введения)	Подвой	Стерилизатор, (продолжительность обработки)					
		Гипохлорит кальция 6%, (10 минут)			Сулема 0,1%, (5 минут)		
		инфицированные экспланты, %	гибель эксплантов, %	развивающиеся экспланты, %	инфицированные экспланты, %	гибель эксплантов, %	развивающиеся экспланты, %
искусственно пробуждённые верхушки (февраль)	ММ 106	29,0	0	71,0	14	9,0	77,0
	54-118	40,0	2	58,0	10	18,0	72,0
Среднее по показателям		34,5	1	64,5	12	13,5	74,5
верхушки вегетирующих побегов (май)	ММ 106	78,0	0	22,0	16	5,0	79,0
	54-118	67,0	0	33,0	20	17,0	63,0
Среднее по показателям		72,5	0	27,5	18	11,0	71,0

В период вегетации, с ростом активности микроорганизмов, инфицированность растительного материала также возрастала. В ряде случаев применение сулемы ($HgCl_2$) способствовало достижению более высоких показателей при стерилизации растительных тканей (табл. 3.2, 3.3). Так, при обработке вегетирующих верхушек подвоев яблони сулемой 0,1 % большое количество прижившихся и регенерирующих эксплантов обуславливалось эффективным подавлением инфекции. Средние значения указывают, что заражённость эксплантов сократилась в 4 раза по сравнению с обработкой в гипохлорите кальция и составила 18 %, а количество эксплантов, способных к последующему развитию достигло 71 %. Использование хлорного препарата способствовало

минимализации или полному отсутствию некроза, однако дезинфицирующее действие препарата на экспланты яблони было недостаточным. Инфицированность эксплантов яблони в среднем достигала 72,5 %.

В период вегетации при введении активно растущих верхушек подвоев для груши было получено от 68 до 79% развивающихся эксплантов у Sydo и от 50 до 57 % у Pyriam.

Таблица 3.3. Стерилизация клоновых подвоев для груши в зависимости от вида экспланта

Вид экспланта (период введения)	Подвой	Стерилизатор, (продолжительность обработки)					
		Гипохлорит кальция 6 %, (10 минут)			Сулема 0,1 %, (5 минут)		
		инфицированные экспланты, %	гибель эксплантов, %	развивающиеся экспланты, %	инфицированные экспланты, %	гибель эксплантов, %	развивающиеся экспланты, %
искусственно пробуждённые верхушки (февраль)	Sydo	20,0	0	80,0	4	19,0	77,0
	Pyriam	32,0	11,0	57,0	12	24,0	64,0
Среднее по показателям		26,0	5,5	68,5	8	21,5	70,5
верхушки вегетирующих побегов (май)	Sydo	21,0	0	79,0	8	24,0	68,0
	Pyriam	40,0	10,0	50,0	18	21,0	57,0
Среднее по показателям		30,5	5,0	62,5	13	22,5	62,5

Высокая чувствительность к стерилизующим препаратам у эксплантов груши Pyriam приводила к их существенному повреждению и гибели что влияло на продуктивность дезинфицирующих мероприятий.

С учётом высокой токсичности сулемы для исследователя и окружающей среды [62], не смотря на положительные результаты использования этого препарата, нами был продолжен поиск эффективных решений для введения в культуру *in vitro*. Для этого были испытаны и оптимизированы схемы обеззараживания эксплантов менее токсичными стерилизаторами, применение которых может послужить достойной альтернативой препаратам на основе ртути.

Для получения асептической культуры изучаемых подвоев в период активной вегетации растений были изучены препараты Табидез 56 и пероксид водорода.

Во время предварительной очистки растительных верхушек 70 % этанол был заменен на раствор Доместоса (5 мл /100 мл H₂O) в течение 5 минут. Использование

Табидез 56 - 0,5 % в течение 5 минут при стерилизации эксплантов подвоев семечковых культур позволило получить асептическую культуру из более чем половины изолированного материала (табл. 3.4). Доля стерильных жизнеспособных эксплантов MM106, 54-118, Sydo составила 70 - 63 и 67 % соответственно [50].

Таблица 3.4. Стерилизация вегетирующих верхушек подвоев семечковых культур препаратом Табидез 56 - 0,5 %

Состояние эксплантов	Подвой (фактор А)	Продолжительность обработки (фактор В)			Среднее по фактору А Fрас. < Fтабл.
		2 минуты (К)	5 минут	10 минут	
Жизнеспособные экспланты, %	MM106	3,0	70*	77*	50,0
	54 -118	7,0	63*	63*	44,3
	Sydo	10	67*	60*	45,6
	Pyr iam	3,0	50*	63*	38,6
	Среднее по фактору В НСР 0,05 = 7,99	5,75	62,5	66	44,75
	НСР 0,05 частных различий = 15,98				
Некротизированные экспланты, %		2 минуты (К)	5 минут	10 минут	Среднее по фактору А НСР 0,05= 8,92
	MM106	0	0	3	1,0
	54-118	0	7	13**	6,6
	Sydo	0	10**	20**	10,0
	Pyr iam	0	10**	20**	10,0
	Среднее по фактору В НСР 0,05 = 3,71	0	6,75	14	6,9
НСР 0,05 частных различий = 7,40					
Инфицированные экспланты, %		2 минуты (К)	5 минут	10 минут	Среднее по фактору А Fрас. < Fтабл.
	MM106	97	30*	20*	49,0
	54-118	93	30*	23*	48,6
	Sydo	90	23*	20*	44,3
	Pyr iam	97	40*	17*	51,3
	Среднее по фактору В НСР 0,05 = 6,13	94,2	30,7	20	48,3
НСР 0,05 частных различий = 12,26					

Примечания:

(К) - контроль

*- существенные отличия по значению НСР частных различий

** - отрицательные существенные отличия по значению НСР частных различий

Исследования проводились в период с 2019 по 2022 г.

Двукратное увеличение продолжительности стерилизации не привело к статистически значимым положительным результатам в отношении количества способных к развитию эксплантов. При обработке в течение 10 минут процент инфицированных эксплантов был минимальный, но наблюдался некроз, выраженное повреждение растительных тканей.

У подвоя группы Rугіam максимальное количество здорового, потенциального в развитии материала получено при обработке в Табидез 0,5 % в течении 10 минут (63 %).

Замечено, что при использовании Табидез 56 некроз иницируемых тканей у подвоя ММ106 практически отсутствовал, в пределах 0 - 3 %, в то время как у эксплантов Sydo и Rугіam достигал 10 - 20 %. Полученные результаты подтверждаются статистическими расчётами и подчёркивают наличие отличительных особенностей между изучаемыми биотипами.

Таблица 3.5. Дисперсионный анализ стерилизации подвоев семечковых культур препаратом Табидез 56

Источник вариации	Сумма квадратов, SS	Степень свободы, df	Средний квадрат, ms	Доля влияния, Н² %	Достоверность, F	
					расчетная	табличная 0,05
Жизнеспособность эксплантов						
Подвои	564,75	3	188,25	0,32	2,0826	3,0087
Стерилизатор	27246,72	2	13623,36	95,50	150,7194	3,4028
Взаимодействие факторов	722,83	6	120,47	0,43	1,3328	2,5081
Случайные отклонения	2169,33	24	90,38	3,83	-	-
Общее	30703,64	35	-	100	-	-
Некротизация эксплантов						
Подвои	475	3	158,33	9,23	8,1196	3,0087
Стерилизатор	1205,55	2	602,77	69,27	30,9116	3,4028
Взаимодействие факторов	283,33	6	47,22	6,91	2,4216	2,5081
Случайные отклонения	468	24	19,50	14,59	-	-
Общее	2431,88	35	-	100	-	-
Инфицированность эксплантов						
Подвои	201,63	3	67,21	0,02	1,2648	3,0087
Стерилизатор	38425,06	2	19212,53	98,24	361,5531	3,4028
Взаимодействие факторов	377,61	6	62,93	0,10	1,1843	2,5081
Случайные отклонения	1275,33	24	53,13	1,64	-	-
Общее	40279,64	35	-	100	-	-

Дисперсионный анализ данных после испытания препарата Табидез 56, показал, что уровень инфицированных, а также жизнеспособных простерилизованных эксплантов не зависел от биотипа изучаемых подвоев. Его влияние на конечный результат не было доказано (0,30 - 0,02 %) (табл. 3.5) Основное действие на количество здоровых эксплантов оказывала продолжительность процесса стерилизации. Сила влияния схемы стерилизации на жизнеспособность эксплантов составила 95,5 %, а на качество стерилизации и подавление развития инфекционной микрофлоры 98,2 %. Роль взаимодействия факторов на выход стерильных и способных к регенерации эксплантов в этом опыте не доказана (0,10 - 0,43 %).

Доля влияние подвоя на развитие некроза у эксплантов была незначительна и составила 9,23 % (табл. 3.5.). Основным фактором, от которого зависело повреждение растительных тканей, был стерилизатор. Полученный результат на 69,27 % зависел от концентрации и продолжительности обработки стерилизующим раствором.

Собранные экспериментальные данные позволили нам глубже изучить роль основных факторов при стабилизации асептической культуры и обоснованно использовать накопленный опыт для достижения поставленных задач.

В ходе испытаний пергидроля в качестве стерилизатора вегетирующих верхушек побегов, были изучены три концентрации препарата, которые отличались продолжительностью воздействия на эксплант.

Установлена связь между повышенной концентрацией стерилизатора и необратимыми повреждениями большого количества эксплантов (табл. 3.6).

Обработка эксплантов в перексиде водорода в концентрации 30 % в течении 7 минут способствовала гибели минимум 30 % от числа иницируемых верхушек. Самый высокий показатель некротизации наблюдался у подвоев яблони 54-118 и груши Pygiam. Доля развивающихся регенерантов при этом варианте не превышала 40 и 47 %. При уменьшении концентрации пергидроля в два раза агрессивное воздействие препарата на экспланты ослабевало, а количество жизнеспособных верхушек пропорционально увеличивалось.

Для получения максимального количества стерильных, способных к регенерации эксплантов, оптимальным было применение пергидроль 15 % в течение 15 минут. У вегетирующих верхушек яблони 54-118 и MM106 получено 57 - 67 % асептической культуры. У подвоев Sydo и Pygiam этот показатель достиг 67 - 70 % соответственно.

Среднее значение жизнеспособных эксплантов в этой схеме составило 65.2 %, что было достоверно больше, чем в других испытанных схемах. В то же время среди подвоев не во всех случаях зафиксированы существенные отличия.

Таблица 3.6. Стерилизация верхушек вегетирующих побегов подвоев семечковых культур раствором Пергидроль

Состояние экспланта	Подвой (фактор А)	Концентрация стерилизатора- длительность обработки (фактор В)			
		30 % -7 минут (К)	15 % - 15 минут	10 % - 25 минут	Среднее по фактору А НСР 0,05 = 8,07
Жизнеспособные экспланты, %	ММ106	57	67	53	59
	54-118	40	57*	47	48
	Sydo	53	70*	60	61
	Pyriam	47	67*	57	57
	Среднее по фактору В НСР 0,05 = 6,99	49,2	65,2	54,2	56,2
	НСР 0,05 частных различий =13,99				
Некроз эксплантов, %		30 % -7 минут (К)	15 % - 15 минут	10 % - 25 минут	Среднее по фактору А НСР 0,05 = 4,44
	ММ106	30	16*	10*	18,6
	54-118	40	27*	13*	26,6
	Sydo	30	10*	0*	13,3
	Pyriam	43	20*	7*	23,3
	Среднее по фактору В НСР 0,05 = 3,85	35,7	18,2	7,5	20,4
НСР 0,05 частных различий =7,70					
Инфицированные экспланты, %		30 % -7 минут (К)	15 % - 15 минут	10 % - 25 минут	Среднее по фактору А НСР 0,05 = 4,33
	ММ106	13	17	37**	22,3
	54-118	20	16	40**	25,3
	Sydo	17	20	40**	25,6
	Pyriam	10	13	36**	19,6
	Среднее по фактору В НСР 0,05 = 3,75	15	16,5	36,6	22,7
НСР 0,05 частных различий = 7,49					

Примечания: (К) - контроль

*-существенные отличия по НСР частных различий

** - отрицательные существенные отличия по НСР частных отличий

Исследования проводились в период с 2019 по 2022 г.

Снижение концентрации стерилизатора до 10 % не смотря на повышенную продолжительность обработки оказало достоверно отрицательное влияние на количество свободных от инфекции эксплантов. В среднем 36 - 40 % изолированного материала проявили признаки заражения грибной или бактериальной инфекцией.

Результаты математической обработки данных подтвердили, что при испытании пергидроля на количество развивающихся эксплантов влияли два фактора: изучаемый биотип и схема стерилизации, но доля влияния последнего фактора была преимущественной и составила 69,6 % (табл. 3.7).

Таблица 3.7. Дисперсионный анализ результатов стерилизации изучаемых подвоев раствором Пергидроль

Источник вариации	Сумма квадратов, SS	Степень свободы, df	Средний квадрат, ms	Доля влияния Н ² %	Достоверность, F	
					расчетная	табличная 0,05
Жизнеспособность эксплантов						
Подвои	817,88	3	272,62	22,87	3,9400	3,0080
Схема стерилизации	1662,50	2	831,25	69,60	12,0130	3,4028
Взаимодействие факторов	123,94	6	20,65	1,73	0,2985	2,5081
Случайные отклонения	1660,66	24	69,19	5,80	-	-
Общее	4265	35	-	100	-	-
Некроз эксплантов						
Подвои	959,33	3	319,77	6,39	15,2476	3,0080
Схема стерилизации	5179,38	2	2589,69	87,85	123,4820	3,4020
Взаимодействие факторов	250,83	6	41,80	1,43	1,9930	2,5081
Случайные отклонения	503,33	24	20,97	4,33		
Общее	6892,88	35		100		
Инфицированность эксплантов						
Подвои	209,88	3	69,96	15,80	3,5127	3,0087
Схема стерилизации	4100,22	2	2050,11	92,57	102,9340	3,4028
Взаимодействие факторов	106,44	6	17,74	0,59	0,8907	2,5081
Случайные отклонения	478	24	19,91	5,44		
Общее	4894,55	35		100		

В отношении таких показателей, как некроз эксплантов и их инфицированность следует отметить, что F расчетная всегда преобладала над F табличной. Но по отношению

к схеме стерилизации была многократно больше, чем по отношению к изучаемым подвоям. Таким образом доля влияния стерилизующего препарата на гибель эксплантов была в 13 раз выше, чем влияние самих биотипов на этот показатель; а в отношении инфицированности изолированного материала почти в 6 раз выше. Взаимодействие изучаемых показателей в совокупности невелико или не доказано.

В таблице 3.8 отражена зависимость показателей качества стерилизации от дезинфицирующего препарата и подвоя через соотношение достоверностей F расчётной к F табличной. Достоверность влияния стерилизующего агента на чистоту и жизнеспособность изолированных эксплантов доказана во всех вариантах эксперимента. Его преобладающая роль подтверждена высоким процентом. Полученные результаты наглядно демонстрируют целесообразность проведения расширенных испытаний стерилизующих препаратов для достижения высоких положительных результатов.

Таблица 3.8. Влияние схемы стерилизации и изучаемых биотипов на качественные показатели изолированных эксплантов

Изучаемый показатель	Достоверность отличий по факторам при использовании двух видов стерилизатора	
	Табидез 56	Пергидроль
Жизнеспособность эксплантов	F расч. < $F_{кр.}$ - по фактору А F расч. > $F_{кр.}$ - по фактору В	F расч. > $F_{кр.}$ по фактору А F расч. > $F_{кр.}$ по фактору В
Некротирующие экспланты	F расч. > $F_{кр.}$ - по фактору А F расч. > $F_{кр.}$ - по фактору В	F расч. > $F_{кр.}$ по фактору А F расч. > $F_{кр.}$ по фактору В
Инфицированные экспланты	F расч. < $F_{кр.}$ по фактору А F расч. > $F_{кр.}$ по фактору В	F расч. > $F_{кр.}$ по фактору А F расч. > $F_{кр.}$ по фактору В

Примечания: фактор А - подвой, фактор В - стерилизатор; F - критерий Фишера

На рисунках 3.1, 3.2 обобщены основные результаты исследований по испытанию стерилизующих препаратов - наглядно сгруппированы данные по эффективности этапа стерилизации верхушек вегетирующих подвоев, а также для верхушек искусственно пробуждённых черенков.

Для получения асептической культуры в период активной вегетации у подвоев ММ106 и 54-118 было эффективным применение сулемы 0,1 % в течение 5 минут и как альтернативы - Табидез 0,5 % - 10 минут. Эти схемы обеспечили в наших исследованиях стерильность и способность к дальнейшему развитию у 77 – 79 % эксплантов подвоя ММ106 и 63 % эксплантов у подвоя 54-118 (рис. 3.1).

При инициации в культуру *in vitro* подвоя Sydo большинство из испытанных схем стерилизации были высокоэффективными. Наибольшую долю свободных от инфекции

эксплантов (75 %) наблюдали при обработке $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ – 6 %, а при использовании H_2O_2 – 15 % и HgCl_2 – 0,1 % – 70 % и 68 % эксплантов соответственно.

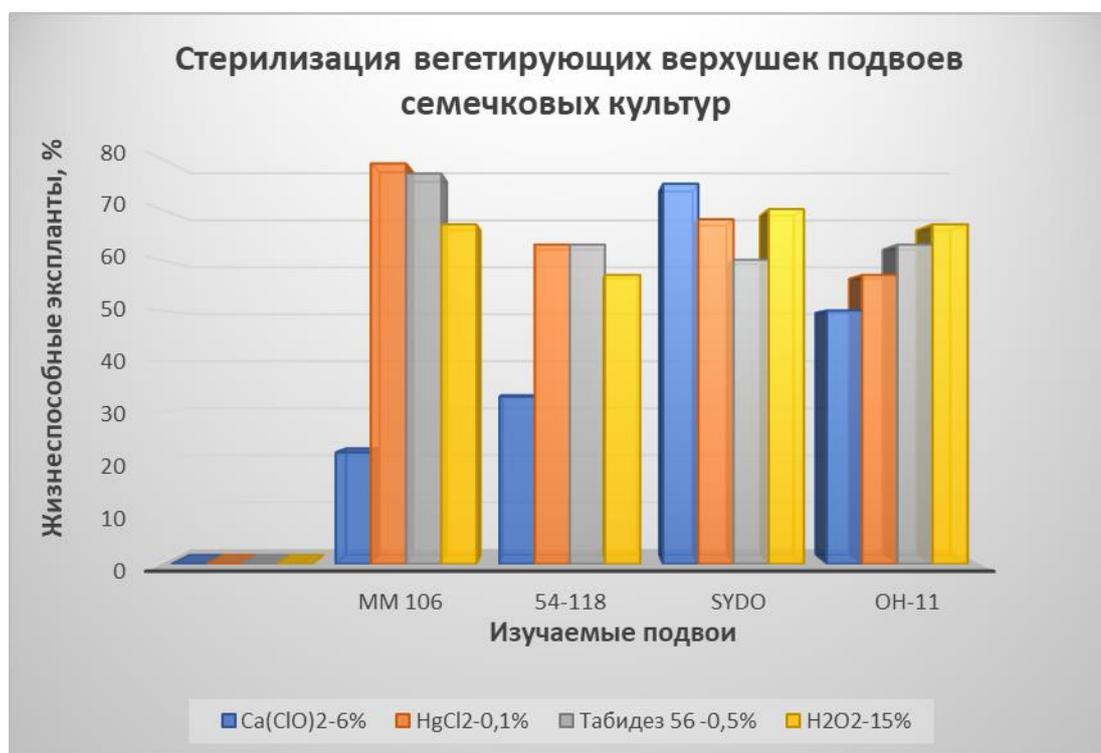


Рисунок 3.1. Стерилизация вегетирующих верхушек подвоев семечковых культур

При введении вегетирующих верхушек груши Ругіам (ОН-11) на протяжении всего периода испытаний наблюдали пониженный по сравнению с другими биотипами выход стерильных и прижившихся эксплантов. Применение растворов H_2O_2 – 15 % и Табидез 56 – 0,5 % обеспечило получение 67 - 63 % жизнеспособных эксплантов; в других схемах было получено только 50 - 57 %, способного к регенерации материала.

Введение эксплантов с искусственно пробуждённых черенков позволило существенно повысить эффективность применения гипохлорита кальция у подвоев яблони (рис. 3.2). У ММ106 получен 71 % жизнеспособного материала, по сравнению с инициацией вегетирующих верхушек, где этот показатель при обработке в $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ составил 22 %. Аналогично у подвоя 54-118 - получили 58 % по сравнению с 33 %. Молодые верхушки пробуждённых растений обладали пониженным уровнем контаминации по сравнению с активно вегетирующими.

У подвоев Sydo и Ругіам количество чистых регенерирующих эксплантов меньше зависело от времени года и вида изолируемого материала. У этих биотипов эффективность стерилизации искусственно пробуждённых верхушек повышалась в пределах 5 - 9 % по сравнению изолированием активно растущих верхушек.

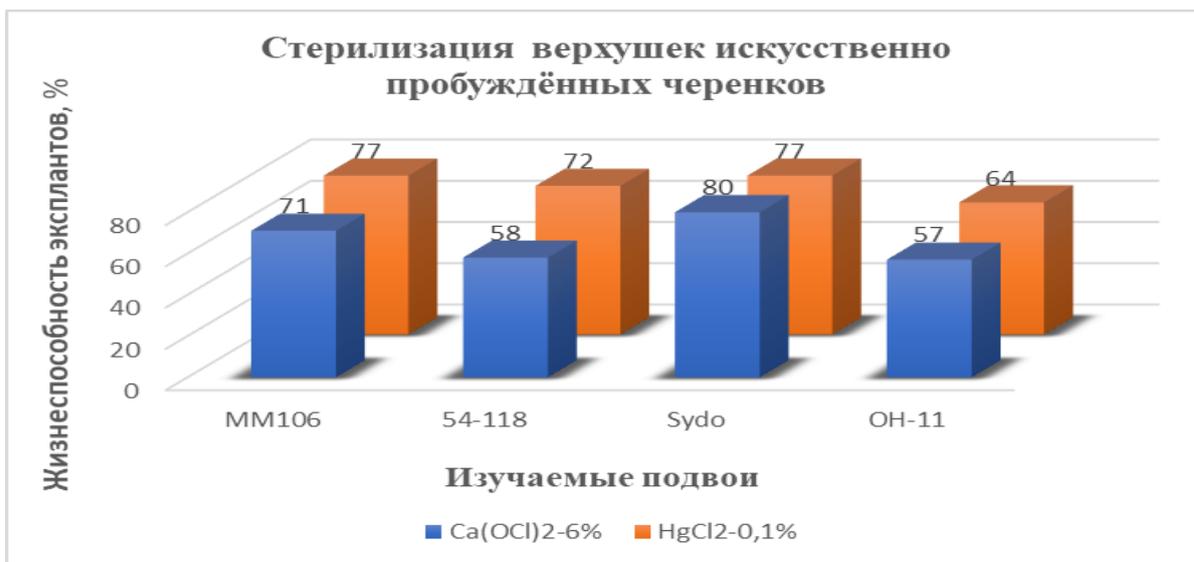


Рисунок 3. 2. Стерилизация верхушек искусственно пробуждённых черенков

Были установлены генотипические различия между изучаемыми подвоями. Оценивая результаты стерилизации подвоев груши и яблони, следует отметить, что подвой MM106 и 54-118 выделялись своей устойчивостью к повреждающему действию стерилизаторов, а также способностью к восстановлению и дальнейшему успешному развитию по сравнению с подвоями для груши. Подвой Sydo и Pygiam напротив, обладали повышенной чувствительностью. В большинстве случаев среднее значение повреждённых эксплантов у этих биотипов достигало 5,5 – 22,5 %, в то время как у подвоев яблони отсутствовало или не превышало 13,5 % (табл. 3.2, 3.3, 3.4).

Сравнивая подвой яблони между собой замечено что, доля жизнеспособных эксплантов у MM106 была выше, а количество верхушек с некрозом меньше. Среди подвоев для груши большей резистентностью и потенциалом к регенерации обладала айва Sydo (табл. 3.2, 3.3, 3.4, 3.6).

Несмотря на то, что применение ртутьсодержащего препарата в ряде случаев было высоко продуктивным, мы рекомендуем и считаем целесообразным использование более безопасных препаратов.

Таким образом, подвой MM106 и 54-118 могут быть успешно простерилизованы препаратом Табидез 56 - 0,5 %. В период покоя для инициации пробуждённых верхушек эффективна обработка в Ca(ClO)₂. Использование H₂O₂ – 15 % было оптимально для подвоев Pygiam и Sydo. В отношении последнего подвоя также получен хороший результат с Ca(ClO)₂ - как на активно растущих верхушках, так и на пробуждённых в период покоя.

Одним из факторов, усложняющих процесс введения в культуру тканей, является выделение эксплантами окислительных фенолов, которое усиливается при травматизации ткани во время препарирования. Эти условия способствуют угнетению роста растений-регенерантов, а иногда их массовой гибели. Яблоня - одна из пород которая наиболее сильно подвержена процессам окисления. С учётом этого мы изучили роль антиоксидантов и препаратов, предотвращающих ингибирующее токсическое действие полифенолов на примере подвоя ММ106 (табл. 3.9). Опытные схемы отличались способом воздействия протекторов на верхушки побегов:

схема А - обработка верхушек в растворе антиоксидантов в течение 6 минут перед началом стерилизации,

схема В - обработка верхушек в растворе антиоксидантов в течение 6 минут до начала стерилизации и повторная краткосрочная обработка после стерилизации,

схема С - обработка верхушек в растворе антиоксидантов в течение 6 минут до начала стерилизации с последующим выделением экспланта в этом растворе.

Таблица 3.9. Оптимизация процесса стерилизации эксплантов подвоя яблони ММ106

Схема обработки	Детоксицирующий препарат:	Экспланты, шт.	Экспланты без окисления или с лёгкими признаками, шт.	Количество жизнеспособных эксплантов, %
А	ПЭГ- 5 % м.м. 6000	12	7	58
	ПЭГ- 5 % м.м.20000	12	8	67
В	ПЭГ- 5 % м.м. 6000	12	6	50
	ПЭГ- 5 % м.м.20000	12	11	73
С	ПЭГ- 5 % м.м.20000	12	11	92
	ПЭГ- 15 % м.м. 6000	12	12	100
	аскорбиновая кислота – 0,01 %	12	8	67
	ПВП - 5% м.м. 30000	12	12	100
	ДИЕСА - 0,05%	12	10	83
(К)	-	12	6	50

При лёгком незначительном пожелтении питательной среды в зоне контакта, проводили пересадку изолята на чистую питательную среду. Было замечено, что при

повышении температуры воздуха возрастала контаминация растительного материала и также усиливались окислительные процессы в растительных тканях. С учетом этого изолирование проводили на ранних стадиях активной вегетации растений.

О целесообразности применения защитных препаратов судили, сравнивая полученные результаты с контрольным вариантом, исключая использование этих добавок (табл. 3.9). Исследования показали, что без применения протекторов более половины эксплантов имели признаки сильного окисления, которые могли сохраняться даже после пересадки на новую питательную среду. При использовании растворов протекторов наблюдалась отчетливая тенденция к повышению эффективности этапа введения в культуру *in vitro* [145].

Обработка верхушек в растворе ПЭГ 5 % до начала стерилизации (схема А) повышает выход жизнеспособных регенерирующих эксплантов в среднем на 8 - 17 % по сравнению с контролем (таблица 3.9). С повышением молекулярной массы ПЭГ защитные свойства препарата усиливаются. При обработке в растворе ПЭГ 5 % м.м. 20000 процент эксплантов без признаков окисления достигает 67 %, в то время как при ПЭГ м.м. 6000 этот показатель составляет 58 %.

При двукратной обработке изолированных верхушек в ПЭГ м.м 20000 (схема В) окисление и окрашивание питательной среды было едва заметным. Получили 73 % эксплантов без признаков выраженного угнетения, способных к дальнейшему развитию, что на 23 % превышает контрольный показатель.

Высокие результаты получены в схеме (С), которая предусматривала обработку иницируемых верхушек до и после стерилизации, то есть извлечение эксплантов непосредственно в испытуемом растворе. Используя в качестве протектора раствор ПЭГ 5 % было получено 92 % регенерирующих верхушек; ДИЕСА 0,05 % - 83 %. В вариантах, где были использовали растворы на основе ПЭГ 15 % м.м. 6000 и ПВП 5 % м.м.30000, признаки полифенольного окисления отсутствовали - выход жизнеспособных эксплантов составил 100 %. Применение аскорбиновой кислоты позволило на 17 % увеличить количество эксплантов без окисления по сравнению с контролем.

Таким образом, на примере подвоя яблони ММ106 установлено что на этапе введения в культуру *in vitro* обработка эксплантов в нейтрализующих защитных растворах положительно влияет на жизнеспособность эксплантов за счет подавления или максимального понижения активности полифенолов. Применение ПЭГ 15 %, ПВП 5 % по схеме С при изолировании на ранних стадиях вегетации позволило полностью избежать признаков фенольного окисления. Результаты успешного использования сорбентов,

антиоксидантов и других соединений для ингибирования активности фенольных соединений при культивировании первичных эксплантов упоминаются в работах многих исследователей [83; 171; 184].

3.1.2. Подбор питательных сред для введения в культуру *in vitro*

Рост и развитие изолированных эксплантов, их регенерационная способность зависит не только от правильно подобранной схемы стерилизации, а также от состава питательной среды на каждом этапе культивирования. На этапе введения изучаемых подвоев в культуру *in vitro* нами были изучены три варианта питательных сред, отличающиеся своим минеральным составом и дополненные БАП -1 мг/л (табл. 3.10).

Об эффективности используемых сред судили по доле развивающихся эксплантов путём подсчёта инциалий, достигших 3 - 4 -ой фазы развития по шкале, предложенной Н. Туровской (1989 г.) [204].

Таблица 3.10. Развитие эксплантов в зависимости от минерального состава питательной среды

Подвои	Питательные среды:	Состояние эксплантов по фазам развития (%) через 6 недель после введения:				Всего развивающихся эксплантов, (%)
		эксплант без развития	линейный рост, развитие 2-3 листиков	розетка с листьями и зачатками почек	конгломерат почек и побегов	
		1 фаза	2 фаза	3 фаза	4 фаза	
MM 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	40,0
	MS*	30,0	50,0	20,0	0	20,0
	WPM	70,0	20,0	10,0	0	10,0
Sydo	MS	10,0	40,0	30,0	20,0	50,0
	MS*	0	30,0	60,0	10,0	70,0
	WPM	20,0	50,0	30,0	0	30,0

* - модифицированная питательная среда по MS

В таблице 3.10 представлены данные, демонстрирующие схожее развитие эксплантов подвоя ММ106 на всех испытываемых средах - разница в количестве развивающихся эксплантов между вариантами не превышала 13 %. На среде MS у 73,3 % изолированного материала ММ106 наблюдали хорошее развитие розетки с листьями и формирование зачатков почек. 60 – 66 % активно развивающихся эксплантов получили на среде WPM и модифицированной по MS. На последнем питательном составе преобладало количество эксплантов, сформировавших конгломерат почек и побегов.

Экспланты подвоя 54-118, в отличие от ММ106, были более избирательны к минеральному составу. Они лучше развивались на питательной среде по MS с пониженной концентрацией солей, где было получено 80 % регенерирующих верхушек. Из них 27 % развилось до уровня конгломерата почек и зачатков побегов. На других изучаемых средах хороший уровень развития эксплантов подвоя 54-118 зафиксирован лишь у 46 – 53 %. Сравнивая между собой результаты, полученные по двум биотипам яблони можно отметить, что чувствительность эксплантов 54-118 по отношению к концентрации минеральных солей, подтверждает необходимость тщательного подбора и корректировки составляющих питательной среды, а также их концентрации.

У подвоя груши Rugiam инициированные экспланты отличаются более низким метаболическим потенциалом, чем у других изучаемых подвоев. Экспланты развивались медленно и к концу первого цикла выращивания часть из них формировала розетку с листьями и зачатками почек. Ни один из них не достиг максимального уровня развития - конгломерата почек и побегов несмотря на то, что были в хорошем состоянии и без повреждений. Самые высокие результаты у эксплантов Rugiam достигнуты на среде MS. На модифицированной среде MS и WPM развитие инициалей замедлялось в 2 - 4 раза. На питательной среде WPM 70 % изолированного материала осталось без развития.

У подвоя Sydo на среде WPM количество развивающихся эксплантов также было минимальным. У 70 % инициалей наблюдалась высокая регенерационная способность на модифицированной среде MS. В этом варианте все экспланты получили дальнейшее развитие, однако только единичные верхушки достигли самой высокой фазы - начало процессов новообразования отмечалось у 10 % [146].

Наиболее эффективным приёмом индукции различных форм морфогенеза является подбор оптимального соотношения гормональных веществ в составе питательной среды. Для этой цели на основе модифицированной минеральной среды MS были изучены разные концентрации и соотношение ауксина и цитокинина. В результате проведённых исследований установлено, что концентрация БАП в питательной среде в пределах 0,5

мг/л является не достаточной для обеспечения максимального уровня развития первичных эксплантов у всех изучаемых подвоев (табл. 3.11).

Меньше половины изолированного материала перешло к активному развитию и достигло стадии новообразований, на питательных средах с БАП 0,5 мг/л не зависимо от наличия ауксина и его концентрации в среде. У подвоев яблони MM106 и 54-118 на питательной среде с БАП 0,5 мг/л и ИМК от 0 до 0,5 мг/л зафиксировано от 40 до 53 % развивающихся верхушек. У подвоя Sydo 20 % эксплантов перешли к регенерации на питательной среде с БАП 0,5 мг/л, ИМК 0 - 0,1 мг/л и 50 % эксплантов при концентрации БАП 0,5 мг/л, ИМК 0,5 мг/л. Развитие эксплантов подвоя Pyriam на средах с БАП 0,5 мг/л было пассивным, наблюдалось их увеличение в размере без перехода к стадии новообразования.

Таблица 3.11. Развитие эксплантов подвоев семечковых культур в зависимости от концентрации стимуляторов роста в питательной среде

N:	Концентрация БАП : ИМК (мг/л) (фактор А)	Развивающиеся экспланты по подвоям (%): (фактор В)				Среднее - фактор 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	66,0	80,0*	70	20	59,0
5	1 : 0 ^	40,0**	42,7	30	10	30,6
6	1 : 0,1	66,6	66,3	60	20	53,2
7	1 : 0,5 (К)	66,7	53,3	60	30	52,5
8	1 : 1	47,0**	46,7	50	10**	38,4
Среднее по фактору В НСР 0,05 = 5,58		53,98	53,61	45	11,25	-
НСР 0,05 частных различий = 15,8						

Примечания: (К) - контроль,

*- существенные отличия по НСР частных различий

** - отрицательные существенные отличия по НСР частных отличий

^ - концентрация макроэлементов в питательной среде по MS снижена в 3 раза

Наибольшее количество активно развивающихся эксплантов было получено при увеличении концентрации цитокинина в питательной среде в два раза. Это подтверждает существенная разница по средним показателям фактора А - НСР 7,9. Исключение

составил вариант, где содержание минеральных солей по прописи MS было понижено в 3 раза.

При БАП 1 мг/л у подвоев яблони MM106 и 54-118 к дальнейшему развитию было способно от 66 до 80 % эксплантов. У подвоя груши Sydo этот показатель достигал 70 %. На таких средах были отмечены ускоренная регенерация эксплантов и активный переход к стадии образования дополнительных побегов [146].

Несмотря на то, что тенденция к замедленному, трудному развитию эксплантов груши Pyriam сохранялась и определялась сортовой особенностью, удвоенная концентрация цитокинина в среде инициировала переход к прямому морфогенезу у 20 - 30 % эксплантов.

Наши результаты совпадают с выводом ряда исследователей о том, что внесение ауксинов в питательную среду на этапе инициации культуры *in vitro* не несёт решающего значения [22; 48]. Добавление ИМК в питательную среду не оказывало доказанного положительного влияния на выход развивающихся эксплантов у изучаемых подвоев яблони. У подвоя Sydo эффективность регенерации снизилась на 10 % при внесении ауксина в питательную среду с БАП 1мг/л. Повышение концентрации ауксина в среде до 1 мг/л обуславливало снижение регенерационной способности иницируемых верхушек и уменьшало количество жизнеспособных эксплантов до 20 % по сравнению с средой без ауксина. У подвоя 54-118 на среде с ИМК 1 мг/л изучаемый показатель снизился на 33,3 % относительно установленного для этого подвоя максимума; у подвоя Sydo и MM106 на 20 %, у Pyriam - на 10 %.

Таблица 3.12. Дисперсионный анализ влияния концентрации стимуляторов роста на развитие эксплантов изучаемых подвоев

Источник вариации	Сумма квадратов, SS	Степень свободы, df	Средний квадрат, ms	Доля влияния Н ² %	Достоверность, F	
					расчетная	табличная 0,05
Стимуляторы роста	39878,58	3	13292,86	88,0	143,351	2,7481
Подвой	9064,83	7	1294,97	3,0	13,9651	2,1560
Взаимодействие Факторов	5423,91	21	258,28	3,37	2,7853	1,7230
Случайные отклонения	5934,66	64	92,72	5,63	-	-
Общее	60302	95	-	100	-	-

Математическая обработка данных указывает на влияние биотипа, а также композиции стимуляторов роста в питательной среде и их концентрации на развитие

изолированных эксплантов (табл. 3.12). Это подтверждают показатели достоверности по котором F расчётная превышает табличную. Доля влияния состава питательной среды на развитие эксплантов составляет 88 %, а влияние генотипа подвоя - 3 %. Взаимодействие обоих факторов составляет 3,37 %.

Детально динамика развития эксплантов всех изучаемых биотипов по фазам представлена в Приложении 1. Расчётные данные подтверждают, что биотипы яблони отличаются большей регенерационной активностью по сравнению с подвоями для груши. 54 – 58 % изолированных эксплантов подвоев ММ106 и 54-118 формировали зачатки почек, отличались ростом побегов в течении первых 6 недель содержания в культуре *in vitro*. У подвоя Sydo 47,5 % эксплантов активизировали процессы регенерации. Замедленное развитие первичных эксплантов у подвоя для груши Ругіам. Это единственный из изучаемых подвоев, у которого после первого культивирования не зафиксировано ни одного экспланта начавшего формирование конгломерата почек, а при низких концентрациях БАП (0,5 мг/л) не происходило даже развития розетки с листьями. До половины и больше из общего количества изолированных эксплантов Ругіам осталось без развития в течение первого пассажа.

Яблоня содержит большое количество вторичных соединений - фенолов, которые в изолированных тканях окисляются различными фенолазами. Продукты окисления фенолов обычно ингибируют деление и рост клеток что ведет к гибели первичного экспланта или уменьшает способность тканей к регенерации [162; 195; 196; 213].

В литературных источниках встречаются упоминания о применении флороглюцинола в питательной среде для подавления влияния фенолов на растительный эксплант, однако результаты имеющихся исследований противоречивы. Исследователи приводят данные как о стимулирующем [59; 253], так и об ингибирующем [112; 116; 162] действии этого соединения на эффективность культивирования некоторых подвоев яблони. Мы изучили действие флороглюцинола на развитие эксплантов подвоев ММ106 и 54-118 при прямом добавлении в питательную среду перед автоклавированием, а также при внесении с помощью мембранных фильтров после автоклавирования. К контрольной среде испытуемый препарат не добавляли.

Согласно полученным результатам (табл. 3.13) использование флороглюцинола, как стимулирующего и протекторного компонента в среде, не повлияло на количество развивающихся эксплантов в первом цикле культивирования. Напротив, на питательной среде с добавлением флороглюцинола и последующим автоклавированием, регенерация апексов протекала подавленно. Большая доля эксплантов не развивалась или наблюдался

только линейный рост. У подвоя ММ106 в этом варианте показатель развивающихся верхушек приравнивался к 0 %, в то время как контрольный вариант (без добавления флороглюцина) обеспечил 66 % развивающихся эксплантов. Аналогичная ситуация наблюдалась у подвоя яблони 54-118 - только 6,7 % эксплантов сформировали розетку с листьями на среде с флороглюцинолом. В контрольном варианте этот показатель достиг 80 %. Внесение флороглюцинола в питательную среду через ультрафильтр также не дало положительного эффекта. Уровень развития иницированных эксплантов был в 3 раза ниже контроля в случае с подвоем ММ106 и в 4 раза ниже у 54-118. На питательных средах с добавлением флороглюцинола отмечали процессы каллусообразования, что могло являться началом непрямого морфогенеза *in vitro*.

Таблица 3.13. Действие флороглюцинола в питательной среде на развитие эксплантов подвоев яблони

Подвои	Концентрация БАП : ИМК, мг/л	Состояние эксплантов по фазам развития (%) через 6 недель после введения:				Всего развивающихся эксплантов (%)
		эксплант без развития	линейный рост, развитие 2-3 листочков	розетка с листьями и зачатками почек	конгло- мерат почек и побегов	
ММ 106	1 : 0 (К)	6,7	26,7	40	26	66
	1 : 0*	53,3	46,7	0	0	0
	1 : 0**	40,0	40,0	20	0	20
54-118	1 : 0 (k)	6,7	13,3	53	27	80
	1 : 0*	46,7	46,6	6,7	0	6,7
	1 : 0**	46,6	33,3	20	0	20

Примечания: * - автоклавированный флороглюцинол (162 мг/л), ** - фильтрованный флороглюцинол (162 мг/л), К – контроль

3.2. Микрклональное размножение подвоев семечковых культур

Целью этапа микрклонального размножения является получение максимального количества дополнительных побегов от каждого исходного экспланта. На формирование новых микропобегов и их параметры большое влияние оказывает минеральный состав питательной среды. В поиске состава, стимулирующего процесс пролиферации у изучаемых подвоев, нами были изучены питательные среды, наиболее часто используемые для плодовых культур: MS, MS с пониженной в 2 раза концентрацией нитрата аммония, WPM и B5.

По данным исследований у подвоя яблони MM106 получена положительная достоверность коэффициента размножения на средах MS, MS с пониженной концентрацией азота и WPM (табл. 3.14 - 3.16). На каждый исходный побег было получено 2,8 - 3 дополнительных. Средняя высота в этих вариантах варьировала от 0,6 см до 1,1 см.

Таблица 3.14. 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	
	MM106	54-118	MM106	54-118	MM106	54-118	MM106	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	

Примечание: питательные среды содержат БАП - 1 мг/л, ИМК- 0,5 мг/л (к) - контроль

Подвой яблони 54-118 активно пролиферировал на питательной среде WPM, более умеренно на MS с $\frac{1}{2}$ NH₄NO₃ - коэффициент размножения составил 3,7 и 2,9 соответственно. Средняя высота побегов была в пределах 0,7 - 1 см. Максимальная высота микропобегов у подвоя MM106 составила 2,5 см; у 54-118 этот показатель достигал 4 - 5 см. Антоциановая окраска у микрорастений 54-118 более выражено проявлялась на среде WPM. Не было отмечено существенной положительной разницы между испытанными питательными средами с контрольной средой MS у MM106, а у подвоя 54-118 доказана достоверная разница между средой MS и средой WPM (НСР 0,87) (табл. 3.16).

По данным таблицы 3.15 сила влияния подвоев на коэффициент размножения в опыте невелика и составляет 7,61 %. Однако действие минеральной составляющей питательных сред на изучаемый фактор значительно, высоко достоверно и составляет 42,42 %. Достоверность этого воздействия составляет $\beta > 0,95$. Взаимодействие между факторами - генотипом и композицией питательных сред в опыте не доказанна.

Таблица 3.15. Дисперсионный анализ влияния минерального состава питательных сред на коэффициент размножения подвоев яблони

Источник вариации	Сумма квадратов, SS	Степень свободы, df	Средний квадрат, ms	Доля влияния, H ² %	Достоверность, F	
					расчетная	табличная 0,05
Подвои	1,024	1	1,02	7,61	2,8029	4,1708
Минеральный состав среды	27,93	4	6,98	42,42	19,1167	2,6896
Взаимодействие Факторов	2,976	4	0,74	10,29	2,0364	2,6896
Случайные отклонения	10,96	30	0,36	39,76	-	-
Общее	42,89	39	39	100	-	-

Таким образом на активность размножения подвоев яблони определяющее влияние оказывает минеральный состав питательной среды. Существенные генотипические отличия среди этих подвоев не доказаны что подтверждается расчётами (табл. 3.16).

Таблица 3.16. Коэффициент размножения подвоев яблони и его достоверность на питательных средах с разным минеральным составом

Подвои (фактор А)	Питательные среды (фактор В)					Среднее по фактору А F _{рас.} < F _{таб.}
	MS без гормонов	MS (контроль)	MS с NH ₄ NO ₃ 1/2	B5	WPM	
ММ 106	0,6	3,0	2,8	2,2	2,8	2,28
54-118	1,1	2,3	3,1	2,8	3,7	2,6
Среднее, (фактор В) НСР 0,05 = 0,6	0,85	2,65	2,95	2,5	3,25	-
НСР 0,05 частных различий = 0,87						

Средняя высота побегов яблони, в отличии от силы размножения, зависела от обоих изучаемых факторов – и от генотипа подвоя, и от состава питательной среды (таб. 3.17). Их влияние оказалось достоверным. Сила влияния разнообразия биотипов составляла 42,1 %, а сила влияния питательной среды - 34,9 %. Влияние взаимодействия этих двух факторов на рост побегов в высоту не доказано.

Данные таблицы 3.18 демонстрируют существенную разницу между средними значениями показателей роста по питательным средам. Видно, что питательные среды MS и B5 существенно повышают среднюю высоту микропобегов изучаемых подвоев. На средах MS с ½ NH₄NO₃ и WPM фиксировалась отрицательная существенная разница по

отношению к контрольной среде. Достоверные отличия по влиянию на изучаемый фактор между средами MS и B5 не доказаны.

Таблица 3. 17. Дисперсионный анализ влияния минерального состава питательной среды на среднюю высоту побегов подвоев яблони

Источник варьирования	Сумма квадратов, SS	Степень свободы, df	Средний квадрат, ms	Доля влияния, H ² %	Достоверность, F	
					расчётная	табличная 0,05
Подвои	0,29	1	0,29	42,1	7,822	4,170
Среды	3,66	4	0,91	34,9	24,68	2,686
Взаимодействие Факторов	0,08	4	0,02	-	0,567	2,689
Случайные отклонения	1,11	30	0,03	23,0	-	-
Общее	5,15	39	-	100	-	-

Таблица 3. 18. Средние значения высоты микропобегов яблони и их достоверность на питательных средах с разным минеральным составом

Подвои (фактор А)	Питательные среды (фактор В)					Среднее по фактору А НСР 0,05 = 0,12
	MS без гормонов	MS - контроль	MS с NH ₄ NO ₃ 1/2	B5	WPM	
ММ 106	0,56	1,10	0,85	1,27	0,66	0,89
54-118	0,67	1,41	1,05	1,48	0,69	1,06
среднее по фактору В НСР 0,05 = 0,19	0,62	1,26	0,95	1,37	0,67	0,97

У подвоя груши Rugiam максимальный уровень пролиферации зафиксирован на оригинальной питательной среде MS (табл. 3.19). Однако достоверной разницы между изученными питательными составами не обнаружено - анализ данных показал, что статистически активность пролиферации в большинстве случаев сходна.

Sydo активно формировал дополнительные побеги на среде MS с пониженным содержанием аммонийного азота. У этого подвоя между этой средой и средой WPM доказано наличие существенной отрицательной разницы.

Между биотипами груши средняя высота побегов значительно отличается; у Sydo во многих вариантах она более чем в два раза превышает высоту микропобегов Rugiam. Существенная разница в биометрических показателях подвоев для груши выявлена между серией сред MS и WPM (НСР 0,75 и 1,03) - средняя и максимальная высота микропобегов возрастала по мере увеличения содержания азота в этих питательных составах.

Таблица 3.19. Влияние минерального состава питательных сред на коэффициент размножения подвоев 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, ½ 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	

Примечания: *- с добавлением БАП-1 мг/л; ИМК-0,5 мг/л.
(К) - контроль

Среди подвоев для груши уровень коэффициента размножения в значительной степени определялся биотипом подвоя - доля его влияния на скорость образования дополнительных побегов 57,29 %. Минеральный состав питательной среды влиял на этот показатель только на 9,44 % (табл. 3.20). Сила взаимодействия факторов в этом случае невелика и не доказана ($H_2 = 1,27$).

Таблица 3.20. Дисперсионный анализ влияния минерального состава питательной среды на коэффициент размножения подвоев груши

Источник вариации	Сумма квадратов, SS	Степень свободы, df	Средний квадрат, ms	Доля влияния, H ² %	Достоверность, F	
					расчетная	табличная 0,05
Подвои	8,09	1	8,09	57,29	7,5421	4,4138
Среда	6,72	2	3,36	9,44	3,1311	3,5545
Взаимодействие Факторов	1,79	2	0,89	1,27	0,8346	3,5545
Случайные отклонения	19,32	18	1,07	32,0	-	-
Общее	35,93	23	-	100	-	-

Сходным образом распределилась доля влияния подвоя на среднюю высоту микропобегов груши. Этот показатель на 84,68 % зависел от влияния биотипа и только на 2,69 % от концентрации солей в питательной среде. Взаимодействие этих двух факторов составило 6,6 % (табл. 3.21).

Таблица 3.21. Дисперсионный анализ влияния минерального состава питательной среды на среднюю высоту побегов подвоев груши

Источник вариации	Сумма квадратов SS	Степень свободы Df	Средний квадрат MS	Доля влияния, H ² %	F расчётная	F критическое
Подвои	16,26	1	16,26	84,68	61,5140	4,4138
Среды	4,74	2	2,37	2,69	8,9695	3,5545
Взаимодействие	2,84	2	1,42	6,60	5,3812	3,5545
Внутри	4,76	18	0,26	6,03	-	-
Итого	28,62	23	-	100	-	-

Известно, что спецификой растительных объектов является их разная восприимчивость к действию стимуляторов роста. Отклонение содержания этих веществ в питательной среде за пределы оптимального уровня отрицательно влияет на потенциал размножения и уровень развития микропобегов.

Оценивая продуктивность культивирования изучаемых подвоев на питательной среде, мы учитывали коэффициент размножения, уровень развития добавочных побегов, их высоту, визуально оценивали состояние растений (табл. 3.22). В одном из испытываемых вариантов ауксин ИМК заменили на НУК.

Микроразмножение подвоя ММ106 стабильно протекало в диапазоне концентраций БАП от 0,5 до 2 мг/л; ИМК от 0,5 до 1 мг/л. Максимальный коэффициент размножения в этих пределах достигал 1 : 4,5 при БАП 2 мг/л, ИМК 0,5 мг/л [50]. В этом варианте в большинстве случаев дополнительные образования представляли собой конгломерат укороченных побегов и почек, что допустимо на стадии наращивания объёмов растительного материала.

Сдерживающим фактором при использовании питательных сред с более высокими концентрациями регуляторов роста была тенденция к снижению коэффициента размножения и появление нежелательных эффектов у микропобегов, таких как оводнённость тканей и др. Замена ИМК на НУК не вызвала положительного эффекта у ММ106 - скорость размножения подвоя снизилась в 1,5 раза (табл. 3.22).

Потенциал размножения у подвоя яблони 54-118 выше, чем у ММ106. Интенсивная пролиферация наблюдалась в варианте с БАП 0,5 мг/л - коэффициент размножения в этом случае достиг 1 : 5 [50]. Однако было замечено, что при трёх и более последовательных культивированиях на таком питательном составе, наблюдалось плавное снижение активности пролиферации, которое можно было предотвратить одновременным

повышением концентрации цитокинина или введением ауксина (ИМК или НУК) в питательную среду. В состав питательной среды вводили НУК 0,5 мг/л, БАП поднимали до 1 мг/л. Было замечено что замена ИМК на НУК положительно влияла на пролиферацию микропобегов 54-118, повысив выход дополнительных побегов в 1,6 раза, по сравнению с аналогичной средой, в составе которой была ИМК. Наличие положительных достоверных отличий между вариантами и контролем при НСР 0,93 было отмечено при БАП : ИМК - 0,5 : 0,5; 0,5: 1; 2: 1. Добавление в среду БАП 3 мг/л ингибировало мультипликацию - в этом варианте зафиксировано максимальное отрицательное отклонение средней от контрольного варианта (табл. 3.22).

Таблица 3.22. Влияние стимуляторов роста на размножение микропобегов подвоев семечковых культур

Концентрация БАП:ИМК в питательной среде (мг/л) (фактор А)	Подвои - (фактор В)								Среднее по фактору А (Fp<Fк)
	MM106		54-118		Pyriam		Sydo		
	Коэффициент размножения	Отклонение от контроля							
0,5 : 0	1,7	-0,9	5,0*	+2,7	1,3	-1,1	3,0	-0,4	2,75
1 : 0	1,6	-1,0	2,4	+0,1	3,3*	+0,9	3,5	+0,1	2,70
3 : 0	2,0	-0,6	1,2	-1,1	2,5	+0,1	3,8*	+0,4	2,37
0,5 : 0,5	2,3	-0,3	3,4*	+1,04	1,9	-0,5	3,1	-0,3	2,67
1 : 0,5 контроль	2,6	-	2,3	-	2,4	-	3,4	-	2,67
1 : 0,5''	1,7	-0,9	3,7*	+1,4	2,8	+0,4	3,6*	+0,2	2,95
2 : 0,5	4,5*	+1,9	1,3	-1,0	2,6	+0,2	2,8	-0,6	2,80
3 : 0,5	1,5	-1,1	1,2	-1,1	3,0	+0,6	2,5	-0,9	2,05
0,5 : 1	2,5	-0,1	3,8*	+1,5	1,8	-0,6	2,2	-1,2	2,57
1 : 1	3,0	+0,4	3,1	+0,8	2,0	-0,4	2,5	-0,9	2,65
2 : 1	1,8	-0,8	3,5*	+1,2	2,9	+0,5	2,7	-0,7	2,72
3 : 1	1,9	-0,7	2,0	-0,3	3,1	+0,7	3,9*	+0,5	2,72
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 НУК

*-существенные отличия по НСР частных различий

Для подвоя груши ОН-11 (Pyram) оптимальной оказалась концентрация в питательной среде БАП - 1 мг/л при ИМК - 0 мг/л - коэффициент пролиферации достигал (1 : 3,3) (табл. 3.22), а высота растений 0,7 см. (табл. 3.24).

У подвоя Sydo стабильный уровень пролиферации при коэффициенте размножения от 3-х и выше наблюдали на 7-ми из 12-ти испытанных вариантов. Достоверных положительных отличий среди питательных сред по отношению к контролю (НСР 0,93) не установлено, однако доказаны существенные отличия средних значений по фактору А при сравнении вариантов друг с другом. Sydo активно пролиферировал при добавлении в среду БАП от 0,5 до 3 мг/л и ИМК 0 - 0,5 мг/л (табл. 3.22). Замена одного вида ауксина другим улучшала общее состояние микропобегов у подвоя: листья покрывались глянцем, приобретали более насыщенный цвет.

Математический анализ экспериментальных данных представлен в таблице (табл. 3.23). Если роль изучаемых факторов оценивать отдельно, то следует отметить, что сила влияния биотипов и концентрации ростовых веществ на коэффициент размножения в опыте невелика (12,53 % - 4,15 %) Доказано что основное влияние на уровень пролиферации побегов оказывало взаимодействия этих двух факторов - влияние в этом случае было достоверно и составило 50,62 % (табл. 3.23).

Таблица 3.23. Дисперсионный анализ влияния стимуляторов роста на пролиферацию подвоев семечковых культур

Источник вариации	Сумма квадратов SS	Степень свободы df	Средний квадрат MS	Доля влияния, Н²%	F расчётное	F критическое
Подвои	17,56	3	5,85	12,53	11,8030	2,6674
Среды	8,68	11	0,78	4,15	1,5922	1,8556
Взаимодействие факторов	117,80	33	3,56	50,62	7,1950	1,5174
Случайные отклонения	71,44	144	0,49	32,70	-	-
Итого	215,51	191	-	100	-	-

Кроме того, дисперсионный анализ данных показал, что на полученные в исследованиях результаты распространилось влияние случайных отклонений – дополнительных факторов, которые не были нами учтены. К таким отклонениям можно отнести, например изменения условий содержания растений: температурный, световой режим и т.д.

Культивируемые подвои отличались между собой по силе роста. Высота побегов подвоя Sydo, не зависимо от коэффициента размножения и гормональной нагрузки,

варьировала в пределах 0,9 - 2,9 см. (табл. 3.24). Среднее значение высоты побегов на 1,36 см превышал этот показатель у подвоев 54-118 и Pugián, и на 1,51 см у подвоя MM106. Средняя высота остальных подвоев варьировала в диапазоне от 0,3 до 1,3 см. Замена ИМК на НУК никак не отразилась на ростовых возможностях большинства подвоев.

Таблица 3.24. Влияние стимуляторов роста на высоту микропобегов подвоев семечковых культур

Концентрация БАП:ИМК в питательной среде (мг/л) (фактор А)	Подвои - (фактор В)								Среднее по фактору А НСР 0,05 = 0,24
	MM106		54-118		Old Home		Sydo		
	Средняя высота растений, см	Отклонение от контроля	Средняя высота растений, см	Отклонение от контроля	Средняя высота растений, см	Отклонение от контроля	Средняя высота растений, см	Отклонение от контроля	
0,5 : 0	0,8	+0,3	0,7	-0,1	1,0	0	2,8	-0,1	1,32
1 : 0	0,3	-0,2	0,4	-0,4	0,7	-0,3	2,7	-0,2	1,02
3 : 0	0,3	-0,2	0,5	-0,3	0,3	-0,7	1,6	-0,3	0,67
0,5 : 0,5	0,9	+0,4	1,3	+0,5	1,0	0	2,1	-0,8	1,32
1 : 0,5 контроль	0,5	-	0,8	-	1,0	-	2,9	-	1,30
1 : 0,5”	0,9	+0,4	0,7	-0,1	0,7	-0,3	2,8	-0,1	0,82
2 : 0,5	0,3	-0,2	0,2	-0,6	0,4	-0,6	2,4	-0,5	0,82
3 : 0,5	0,2	-0,3	0,3	-0,5	0,3	-0,7	1,0	-1,9	0,45
0,5 : 1	0,8	+0,3	0,7	-0,1	1,2	+0,2	2,2	-0,6	1,22
1 : 1	0,7	+0,2	0,6	-0,2	0,7	-0,3	1,8	-1,1	0,95
2 : 1	0,4	-0,1	1,1	+0,2	0,4	-0,6	1,5	-1,4	0,85
3 : 1	0,4	-0,1	1,0	+0,2	0,6	-0,4	0,9	-2,0	0,72
Среднее по фактору В НСР 0,05 = 0,10	0,54	-	0,69	-	0,69	-	2,05	-	-
НСР 0,05 частных различий = 0,35									

”- ИМК заменили НУК

Средняя высота размноженных микропобегов значительно коррелировала с сортовой принадлежностью подвоев (табл. 3.25). Влияние биотипа на высоту побегов высоко достоверно и составляло не менее 91 %. Следовательно, разнообразие этого признака в очень малой степени было обусловлено питательной средой.

Анализ данных, полученных в результате исследований, позволил разобраться и управлять закономерностями процессов размножения на этапе пролиферации и выстроить стратегию перехода из одного этапа к другому (рис. 3.3, 3.4). Культивирование изученных

подвоев на оптимизированных питательных средах поддерживало продуктивный темп мультипликации на этапе, когда главной целью являлось ускоренное наращивание объёма микропобегов, а высота побегов при этом имела второстепенное значение.



Рисунок 3.3. Микроразмножение подвоя Sydo в условиях *in vitro*
(архив лаборатории вирусологии НИИП)



Рисунок 3.4. Микроразмножение подвоя 54-118 в условиях *in vitro*
(архив лаборатории вирусологии НИИСВПТ)

Таблица 3.25. Дисперсионный анализ влияния концентрации стимуляторов роста на среднюю длину побегов

Источник вариации	Сумма квадратов SS	Степень свободы df	Средний квадрат MS	Доля влияния, H ² %	F расчетное	F критическое
Подвои	74,12	3	24,70	91,02	381,088	2,667
Среды	15,70	11	1,427	0,90	22,0206	1,855
Взаимодействие факторов	17,10	33	0,518	5,13	7,9922	1,517
Случайные отклонения	9,33	144	0,064	2,95	-	
Итого	116,26	191	-	100	-	-

Витамины и углеводы участвуют в метаболизме растительных клеток и являются необходимыми компонентами питательной среды. Углеводы оказывают воздействие на морфогенез растений, могут инициировать закладку дополнительных почек и рост растений [136; 157; 158; 218; 234]. Витамины группы В учувствуют в биохимических процессах в клетке, улучшают адаптационные свойства растительных тканей, стимулируют их рост [109; 120].

Нами в комплексе изучено влияние разных концентрации сахарозы и набора витаминов, распространённого для использования в культуре тканей, на качественные и количественные показатели изучаемых подвоев.

Исследования указывают на прямую зависимость побегообразовательной способности и роста микропобегов от содержания сахарозы в питательной среде. Данные, представленные в таблице 3.26 показывают, что у подвоя MM106 при содержании сахарозы в среде в количестве 10 г/л, интенсивность пролиферации снизилась в 2,2 раза по сравнению с контролем; у Sydo в 1,9 раз, а у подвоя Pygiam - в 1,7 раз.

Пропорционально снижению пролиферирующей активности наблюдали снижение высоты побегов. Повышение в питательной среде концентрации сахарозы до стандартной (30 г/л) положительно повлияло на все качественные показатели: размножение, высоту побегов и состояние растений, что также подтверждают выводы других исследователей [171].

Комплекс витаминов в составе питательной среды представлен более часто рекомендуемым для плодовых культур. Эксперимент был ограничен двумя вариантами, но даже в этом случае было заметно положительное влияние более высоких концентрации витаминов группы В и Р на выход дополнительных побегов.

Таблица 3.26. Влияние витаминов и концентрации сахарозы в питательной среде на размножение подвоев семечковых культур

Подвои:		Сахароза, г/л			
		10	20	30	30
		Витамины, мг/л			
		B1 - 0,5; B6 - 0,5; PP - 0,5; C - 2		B1- 0,4; B6- 0,2; PP- 0,2; C- 2	
MM106	Высажено побегов, шт.	27	27	27	27
	Дополнительные побеги, шт.	35	54	78	57
	Коэффициент Размножения	1,3	2,0	2,9	2,1
	Средняя высота побега, см.	0,69	0,73	1,0	0,7
Sydo	Высажено побегов, шт.	27	27	27	27
	Дополнительные побеги, шт.	51	75	100	65
	Коэффициент размножения	1,9	2,8	3,7	2,4
	Средняя высота побега, см.	1,5	2,0	2,3	2,4
Pyriam	Высажено побегов, шт.	27	27	27	27
	Дополнительные побеги, шт.	46	73	81	65
	Коэффициент Размножения	1,7	2,7	3,0	2,4
	Средняя высота побега, см.	0,88	1,16	1,08	0,99

Примечание: исследования проводили в период с 2019 по 2022 г.

В отдельных литературных источниках упоминается о возможности стимулировать размножение в условиях *in vitro* не только с помощью ФАВ, а используя простые технические приёмы для подавления апикального доминирования [120; 196]. Нами была изучена возможность использовать горизонтальное расположение побегов на поверхности питательной среды для повышения эффективности этапа микроразмножения (табл. 3.27).

Результаты, полученные нами в ходе исследований, подтвердили связь между побегообразовательной способностью подвоев и ориентацией микропобегов. Более выражено это проявлялось у подвоев яблони. В горизонтальном положении побеги MM106 с удалённой верхушкой и боковыми листьями формировали на 4,6 дополнительных побега больше в сравнении с вертикально расположенными побегами. У подвоя 54-118 этот показатель был больше контроля на 6,5 дополнительных побега. В

вариантах, в которых побег с удалённой апикальной частью подвергался дополнительному делению на сегменты, количество добавочных побегов также было больше чем в контроле, но не превышало показатели другого альтернативного варианта.

Средняя длина побегов у ММ106 в два и более раза превосходила контрольный показатель (1,0 - 1,2 см по отношению к 0,5см). У подвоя 54-118 этот показатель остался неизменным. По сравнению с яблоней, пролиферирующая способность подвоев для груши в меньшей степени зависела от ориентации побегов на питательной среде. Преимущество отмечено только при горизонтальной посадке побегов. По отношению к контролю оно варьировало в пределах 0,9 - 1,3 добавочных побега.

Таблица 3.27. Показатели коэффициента размножения подвоев семечковых культур в зависимости от расположения побега 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
Pygiam	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

(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 0,5 - 1 см

Среди стимуляторов роста, распространённых в культуре тканей, важная роль принадлежит гиббереллиновой кислоте. Использование её в микроразмножении *in vitro* преследует цель индуцировать деление и растяжение растительных клеток. При определённых обстоятельствах гиббереллиновая кислота способна вызвать сильное ветвление побегов, особенно у растений с удалённой верхушкой. Она повышает ростовые

характеристики микропобегов, что увеличивает количество пригодных к укоренению растений [89; 109].

Имея возможность заложить обширный опыт для подвоев ММ106 и 54-118, мы изучили действие разных концентрации гиббереллиновой кислоты на скорость размножения микропобегов и их качественные показатели – на выход пригодных к укоренению растений. Данные представлены в таблице 3.28, 3.29.

На безгормональной питательной среде микропобеги практически не размножались, была выражена измельчённость растений. При добавлении в состав среды ГК₃ в концентрации 0,5 мг/л наблюдали тенденцию к увеличению количества дополнительных побегов пропорционально повышению концентрации БАП (табл. 3.28).

На питательных средах дополненных ГК₃ 0,5 мг/л при БАП от 1 до 4 мг/л коэффициент размножения подвоя ММ106 увеличивался на 1,2 побега - от 1,9 до 3,1; у подвоя 54-118 на 0,8 побега от 2,7 до 3,5. Пролиферация ослабевала при дальнейшем повышении концентрации цитокинина на фоне ГК₃ 0,5 мг/л.

Схожая ситуация наблюдалась в серии проб, где концентрация ГК₃ составила 1 мг/л. Количество образовавшихся побегов возрастало при концентрации БАП с 1 до 4 мг/л и понижалось при превышении БАП более чем 4 мг/л. На питательных средах, где концентрация ГК₃ составляла 2 - 8 мг/л формировались чрезмерно загущённые букеты с вытянутыми истончёнными побегами, плохо развитыми листьями. Через две недели культивирования на таких средах проявлялись признаки угнетения.

Высокие концентрации цитокинина в питательной среде также оказывали токсическое воздействие на растения, что подтвердилось нашими наблюдениями за состоянием побегов. При БАП от 4 мг/л и выше отмечали некроз отдельных листьев, усыхание верхушек побегов, витрификацию.

Среднее значение коэффициента размножения у подвоя яблони ММ106 составило 2,7, а у 54-118 - 2,8. Положительное отклонение от средней изучаемого фактора наблюдалось во многих вариантах, но учитывая нежелательные эффекты на некоторых вариантах, оптимальными можно признать среды с БАП до 2 мг/л, ГК₃ - 0,5 - 1 мг/л.

Сравнивая результаты полученные на подвое ММ106 с данными на среде с БАП 2 мг/л, ИМК 0,5 мг/л и без ГК₃ (табл. 3.22), можно отметить что нет обоснования для постоянного присутствия гиббереллина в питательной среде для размножения этого подвоя. У ММ106 скорость размножения на среде с ГК₃ понизилась с 4,5 до 2,4 дополнительных побега. В тоже время у другого подвоя яблони (54-118) коэффициент размножения увеличился с 1,3 до 2,3. Таким образом сила взаимодействия трех

регуляторов роста на процессы пролиферации требует дополнительного подробного исследования.

Таблица 3.28. Влияние гиббереллиновой кислоты на формирование дополнительных побегов у подвоев яблони

Концентрация БАП : ГК ₃ в питательной среде, мг/л (фактор В)	Подвой ММ 106 (фактор А)			Подвой 54-118 (фактор А)		
	Коэффициент размножения	Отклонение от средней	Отклонение от контроля	Коэффициент размножения	Отклонение от средней	Отклонение от контроля
0 : 0 (контроль)	0,6	-2,1	-	1,1	-1,74	-
1 : 0,5	1,9	-0,9	+1,3	2,7	-0,14	+1,6
2 : 0,5	2,4	-0,3	+1,8	2,3	-0,54	+1,2
4 : 0,5	3,1	+0,4	+2,5	3,5	+0,66	+2,4
8 : 0,5	2,5	-0,2	+1,9	2,7	-0,14	+1,6
1 : 1	2,3	-0,4	+1,7	2,7	-0,14	+1,6
2 : 1	3,3	+0,6	+2,7	2,9	+0,60	+1,8
4 : 1	4,0	+1,3	+3,4	3,1	+0,26	+2,0
8 : 1	3,4	+0,7	+2,8	2,6	-0,24	+1,5
4 : 2	2,7	0	+2,1	2,5	-0,34	+1,4
4 : 4	3,5	+0,8	+2,9	2,7	-0,14	+1,6
4 : 8	2,8	+0,1	+2,2	5,3	+2,46	+4,2
Среднее значение	2,7	-	-	2,84	-	-
НСР 0,05	0,58	-	-	0,58	-	-

Таблица 3.29. Дисперсионный анализ влияния гиббереллиновой кислоты на размножение микропобегов яблони

Источник вариации	Сумма квадратов, SS	Степень свободы, df	Средний квадрат, ms	Доля влияния, Н ² %	Достоверность, F	
					расчетная	табличная 0,05
Среда	41,32	11	3,75	7,76	30,917	1,994
Подвой	0,275	1	0,27	36,96	2,2632	4,042
Взаимодействие Факторов	14,513	11	1,31	42,38	10,857	1,994
Случайные отклонения	5,832	48	0,12	12,90	-	-
Общее	61,94	71	-	100	-	-

Анализ полученных результатов показал, что потенциал размножения яблони больше всего зависел от взаимодействия изучаемых факторов. Сила влияния питательного состава и биотипа подвоя достоверно, с долей 42,3 %, воздействовала на результаты исследований (табл. 3.29). Доля влияния подвоя как отдельного фактора составляла 36,96 % от общего влияния всей суммы факторов.

Успех этапа ризогенеза и акклиматизации к нестерильным условиям во многом зависит от качества укореняемых регенерантов. Побеги должны быть хорошо развиты, длиной не менее 15 мм. Эти условия нужно было учесть на последних перед укоренением субкультивированиях и подобрать питательную среду, обеспечивающую получение развитых, качественных побегов с достаточной длиной.

На рисунке 3.5 представлено действие гиббереллиновой кислоты на силу роста размноженных растений. Полученные результаты могут быть использованы для повышения эффективности этапа укоренения, одним из условий которого является высота побега, пригодного для укоренения.



Рисунок 3.5. Влияние концентраций БАП и ГКз в питательной среде на выход растений высотой более 15 мм

При соблюдении единых условий у подвоя MM106 получено больше побегов высотой 1,5 см чем у 54-118. Направление действия ГК зависело от концентрации цитокинина в питательной среде и имело отрицательный эффект при значениях БАП 8 мг/л. Наибольшее количество побегов MM106 необходимой высоты получили при

добавлении в среду ГК₃ 0,5 мг/л на фоне БАП 1 - 4 мг/л. В этом случае 76 - 85 % растений превысило высоту 15 мм. У подвоя 54-118 положительный эффект достигнут при ГК₃ 0,5 - 1 мг/л с БАП 1 - 4 мг/л - от 50 до 66 % микропобегов были пригодны для посадки на укоренение.

Улучшить морфологические показатели побегов перед укоренением (толщину стебля, развитие листьев, высоту побега) возможно проведением промежуточного этапа элонгации. Включение его в схему размножения позволяет предотвратить избыточное накопление цитокининов в тканях растений что в дальнейшем увеличивает процент укоренения микропобегов и повышает их резистентность в период адаптационного стресса [212].

У некоторых исследователей подход к улучшению качественных показателей у растений *in vitro* отличается. Мы исключили высокие концентрации цитокинина и добавили в питательную среду гиббереллин. Питательные среды содержали БАП в пределах 1 - 0,3 мг/л, ИМК 0,5 - 0,3 мг/л, ГК₃ 0,1 - 1 мг/л (табл. 3.30). Достичь максимального удлинения побегов удалось только при одновременном снижении концентрации цитокинина и повышении гиббереллина в среде.

Таблица 3.30. Влияние пониженных концентрации стимуляторов роста на высоту побегов подвоев семечковых культур на этапе 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

Исследования проводились в период с 2019 по 2022 г.

ГК₃ 0,2 мг/л в комбинации с БАП 0,5 мг/л активизировала ростовые показатели побегов у 54-118 и Ругіам 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, каждый исходный побег ММ 106 сформировал по 2,2 дополнительных побега с средней высотой 1,6 см; подвой 54-118 - по 2,4 дополнительных побега высотой 1,8 см; Ругіам по 1,6 дополнительных побега высотой 2 см. При самых низких из испытанных концентраций регуляторов роста эффект удлинения был достигнут у всех подвоев кроме ММ106.

Таким образом, установив оптимальные пропорции ГК₃ и БАП в питательной среде, нам удалось контролировать процессы роста растений и получить от 66 до 85 % растений (рис. 3.5), качество которых соответствовало требованиям следующего этапа технологии.

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

Приступая к опытам по укоренению, мы руководствовались результатами других исследователей, которые свидетельствуют, что основным индуктором корнеобразования у плодовых пород является ИМК [265]. Ряд источников указывает на положительный эффект применения природного ауксина ИУК и его синтетического аналога НУК. Учитывая специфическую реакцию разных видов растений на воздействие стимуляторами, мы изучали действие 3-х основных видов ауксина на формирование корней (табл. 3.31).

Таблица 3.31. Укоренение подвоев семечковых культур в условиях *in vitro* в зависимости от вида ауксина

Подвой - (фактор А)	Процент укоренившихся растений на питательной среде MS с разным видом ауксина (фактор В)			Среднее по фактору А НСР 0,05 = 5,77
	ИМК – 0,5мг/л (контроль)	НУК – 0,5мг/л	ИУК – 0,5мг/л	
ММ106	55	50	35	46,6
54-118	80	60	20	53,3
Sydo	30	30	15	25
Ругіам	45	20	30	31,6
Среднее по фактору В НСР 0,05 = 5,0	52,5	40	25	-
НСР 0,05 частных различий = 10				

В ходе эксперимента были подтверждены литературные данные о наибольшей пригодности ИМК для стимуляции корнеобразования у плодовых растений [28; 53; 111]. У большинства изучаемых нами подвоев под влиянием этого ауксина активность ризогенеза была выше в 1,5 - 2 раза.

Подвой яблони ММ106 укоренился в присутствии ИМК на 55 %, что было достоверно выше, чем на среде с ИУК (35 %). У подвоя 54-118 на среде с ИМК процент укоренения достиг 80 %, а с НУК и ИУК этот показатель был достоверно ниже. У Sydo на питательных средах с ИМК и НУК процент укоренившихся побегов был одинаков, в то время как на среде ИУК в два раза ниже. Таким образом для укоренения всех изучаемых подвоев обоснованно было использование ИМК.

Дисперсионный анализ данных указывает на достоверность влияния биотипа подвоя и вида ауксина на укоренение микропобегов (табл. 3.32). У всех факторов расчетная достоверность превышает табличную, что опровергает гипотезу об отсутствии существенных отличий между фактическими значениями выборок. Сила влияния подвоя составляет 19,8 %, а ауксина 46,9 %. Зависимость ризогенеза от взаимодействия этих факторов составила 27,8 %. Сила влияния всех изученных факторов достоверна с вероятностью $\beta > 0,95$.

Таблица 3.32. Дисперсионный анализ влияния ауксина на укоренение микропобегов изучаемых подвоев

Источник вариации	Сумма квадратов, SS	Степень свободы, df	Средний квадрат, ms	Доля влияния H^2 %	Достоверность, F	
					расчетная	табличная 0,05
Подвои	4625	3	1541,66	19,8	43,5294	3,0087
Ауксин	4550	2	2275	46,9	64,2352	3,40282
Взаимодействие факторов	3100	6	516,66	27,8	14,5882	2,50818
Случайные отклонения	850	24	35,416	5,5	-	-
Общее	1312	35	-	100	-	-

На этапе ризогенеза образование корней стимулирует не только применение гормональных препаратов, но также “обеднение” состава питательной среды за счёт понижения концентрации минеральных солей, сахарозы. В наших исследованиях было изучено влияние макро - и микроэлементов в разных концентрациях и соотношениях на укоренение побегов 54-118 и ММ106 (табл. 3.33).

Результаты исследований демонстрируют целесообразность снижения концентрации минеральных солей MS на этапе укоренения, что также подтверждено литературными источниками [117]. На среде с полной концентрацией макро- и микроэлементов дополненной ИМК 3 мг/л у подвоев яблони наблюдалась пониженная активность процессов ризогенеза.

У подвоя ММ106 через 6 недель культивирования укоренилось 50 % побегов, а у 54-118 – 40 % (табл. 3.33). Снижение концентрации азотнокислого калия и аммония в два раза, способствовало повышению изучаемого показателя до 65 %, в то время как при четырёхкратном понижении процессы ризогенеза ослабевали.

Наиболее эффективной для индукции корней у подвоя ММ106 стала питательная среда с полной концентрацией микросолей MS и сниженной в два раза концентрацией макросолей - в этом варианте корневая система сформировалась у 85 % побегов. Максимальное значение (75 %) укоренившихся растений 54-118 получено при понижении концентрации всех минеральных компонентов среды в два раза. В этом варианте корнеобразовательные процессы протекали более динамично у обоих подвоев. Уже через 3 недели культивирования укоренилось 40 - 45 % микропобегов, что составляло более половины от итогового выхода укоренившихся побегов.

Таблица 3.33. Укоренение подвоев яблони в зависимости от изменений концентрации макро- и микросолей в питательной среде Мурасиге – Скуга*

Питательная среда*:				Количество побегов, шт	Укоренение побегов на питательных средах по срокам, %			
макросоли,			микро-соли, часть		ММ106		54-118	
NH ₄ NO ₃ , мг/л	KNO ₃ , мг/л	Mg, P, Ca, часть			через 3 недели	через 6 недель	через 3 недели	через 6 недель
1650	1900	полная	полная	21	20	50	20	40
825	950	полная	полная	21	35	65	35	65
825	950	1/2	полная	21	35	85	40	70
825	950	1/2	1/2	21	40	75	45	75
412	475	1/2	1/2	21	35	55	40	55

Примечания: *- с добавлением ИМК 3 мг/л.

Исследования проводили в период с 2019 - 2022 г.

Наличие сахарозы в питательной среде для укоренения обязательно. При её отсутствии, даже под воздействием ауксина, корнеобразование у плодовых пород очень слабое или корни не развиваются [183; 184; 218; 234].

Таблица 3.34. Укоренение микропобегов яблони в зависимости от концентрации углеводов в питательной среде

Питательная среда Мурасиге – Скуга с добавлением:		Количество побегов, шт.	Укоренение побегов на питательных средах по срокам, %			
			ММ106		54-118	
Сахароза, г/л	Ауксин, мг/л		через 3 недели	через 6 недель	через 3 недели	через 6 недель
0	ИМК - 3	21	0	10	0	10
10	ИМК - 3	21	30	65	25	55
20	ИМК - 3	21	25	75	30	65
30	ИМК - 3	21	10	50	20	50

Примечание: исследования проводили в период с 2019 по 2022 г.

В наших экспериментах ризогенез в условиях полного исключения углеводов из среды был минимальным; через 6 недель культивирования корни появились только у 10 % побегов (табл. 3.34).

При добавлении в питательную среду сахарозы в концентрации 10 г/л подвой яблони через 3 недели укоренились на 25 – 35 %, а через 6 недель уровень укоренения достиг 55 -65 %.

Оптимальные результаты получены при добавлении сахарозы 20 г/л среды - доля побегов с корнями составила 75 % у ММ106 и 65 % у 54-118. Присутствие сахарозы в питательной среде в концентрации 30 г/л на этапе укоренения было нецелесообразно.

Процесс ризогенеза у изучаемых подвоев демонстрировал сортовые отличия. Чтобы установить оптимальную схему укоренения для каждого биотипа индивидуально, был заложен опыт, предусматривающий стандартное укоренение на питательных средах с ауксином в разных концентрациях, а также насыщение микропобегов на питательной среде с ауксином и пересадка на безгормональную среду через 7 дней (табл. 3.35).

Подвой яблони можно отнести к легкоукореняемым в условиях *in vitro* по сравнению с подвоями для груши. Среднее значение показателей укоренения у них было выше во всех вариантах.

Таблица 3.35. Укоренение подвоев семечковых культур в зависимости от концентрации минеральных солей, стимуляторов корнеобразования 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	41	37	-
НСР 0,05 частных различий = 12,1						

к - контроль

Примечание: * - пересадка побегов на безгормональную питательную среду через 7 дней

У подвоя ММ106 лучший результат достигнут на питательной среде с ИМК 3 мг/л, где укоренилось 75 % побегов, а при ИМК 0,5 мг/л корни сформировало 70 % побегов. В остальных вариантах достигнутый результат был достоверно меньше по НСР частных различий и по НСР среднего по фактору. У подвоя 54-118 на среде с ИМК 0,5 мг/л укоренилось 80 % микропобегов. Для Pyriam максимальный уровень ризогенеза достигнут на среде с ИМК 3 мг/л - корни сформировались у 60 % побегов. У подвоя Sydo на среде с ИМК 1 мг/л получили 50 % укоренённых растений.

Сравнивая варианты сред, где ИМК заменили на НУК, можем отметить, что в этом случае у всех подвоев способность к укоренению была достоверно ниже.

В вариантах, где предусматривалась пересадка побегов после насыщения ауксином, для большинства подвоев укоренение подвоев протекало слабее. Если сравнивать результаты на средах с равной концентрацией ауксина, например с ИМК 3 мг/л, то для подвоя ММ106 пересадка побегов на безгормональную среду понизила количество укорененных растений на 15 %. Однако для подвоя Sydo сокращение продолжительности воздействия ИМК на микропобеги до 7 дней положительно повлияло на процент укоренения (65 %). У всех изученных подвоев активность ризогенеза затухала при понижении концентрации минеральных солей в среде до 1/4, 1/8. При введении в среду ИМК 4 - 5 мг/л повышения корнеобразования также не достигнуто.

В таблицах 3.36 - 3.37 представлен анализ данных по силе воздействия изученных факторов на эффективность процесса ризогенеза.

Таблица 3.36. Эффективность ризогенеза при разных концентрациях ауксина в питательной среде

Источник вариации	Сумма квадратов, SS	Степень свободы, df	Средний квадрат, ms	Доля влияния, Н ² %	Достоверность, F	
					расчетная	табличная 0,05
Подвои	7331,25	3	2443,75	59.10	55,8571	2,8387
Среда	4822,50	4	1205,62	20.10	27,5571	2,6059
Взаимодействие факторов	2137,50	12	178,12	10.53	4,07142	2,0034
Случайные отклонения	1750	40	43,75	10.27	-	-
Общее	16041.25	54	-	100	-	-

Таблица 3.37. Эффективность ризогенеза при пересадке укореняемых побегов на безгормональную среду после насыщения ауксином

Источник вариации	Сумма квадратов, SS	Степень свободы, df	Средний квадрат, ms	Доля влияния Н ² %	Достоверность, F	
					расчетная	табличная 0,05
Подвои	4097,91	3	1365,97	29,75	25,0254	2,8387
Среда	6127,50	4	1531,87	25,50	28,0648	2,6059
Взаимодействие Факторов	2345,83	12	195,48	32,30	3,5814	2,0034
Случайные отклонения	2183,33	40	54,583	12,45	-	-
Общее	14754.58	59	-	100	-	-

В обоих случаях достоверно подтверждено существенное влияние факторов на полученный результат - F расчетная превышает табличную. В вариантах с обычной посадкой побегов на среду для укоренения доля влияния подвоев на процент укоренившихся растений составила 59,10 %, а при пересадке растений на безгормональную среду - 29,75 %. Сила влияния компонентов питательной среды достигала от 20 до 25,5 %. Взаимодействие этих факторов оказывало меньше влияния при укоренении побегов по классической схеме (10,27 %) и больше при пересадке на среду без стимуляторов (32,3 %). Полученные результаты позволяют обоснованно подойти к выбору питательной среды для укоренения для каждого изучаемого подвоя.

Динамику процесса укоренения изучали на примере подвоя яблони ММ106 (табл. 3.38). Процесс роста и формирования корней у побегов проходил разными темпами. На питательных средах, где концентрация ауксина была повышена (ИМК 3 мг/л), начало корнеобразования зафиксировано раньше - через 10 дней у 12 – 18 % микропобегов. Через 30 дней на этих вариантах укоренились 47 - 49 % высаженных растений, а после 50-ти дней было достигнуто 67 % укоренённых микрорастений.

Таблица 3.38. Динамика процесса укоренения подвоя яблони ММ 106 на питательных средах с разной концентрацией ауксина

Концентрация ИМК в составе среды, мг/л	Укоренилось через 10 дней		Укоренилось через 30 дней		Укоренилось через 50 дней		Каллус, %
	%	отклонение от средней	%	отклонение от средней	%	отклонение от средней	
0	9	-	18	-19,5	20	-34,4	0
0,5	0	-9	45	+7,5	73	+18,6	0
1,0	10	+1	30	-7,5	42	-12,4	20
3,0	18	+9	49	+11,5	67	+12,6	45
3,0''	12	+3	47	+9,5	62	+7,6	20
4,0	5	-4	42	+4,5	63	+8,6	50
4,0''	12	+3	31	-6,5	52	-2,4	25
5,0	5	-4	32	-5,5	53	-1,4	60
5,0''	10	+1	44	+6,5	55	+0,6	40
Среднее значение	9	-	37,5	-	54,4	-	-

'' – пересадка растений со среды с ИМК на безгормональную среду через 7 дней

На питательной среде с ИМК 0,5 мг/л к этому периоду достигнут максимальный уровень ризогенеза - 73 %. Через 30 дней после посадки преобладающее положительное отклонение от среднего значения зафиксировано на питательной среде с ИМК 3 мг/л.

Через 50 дней этот показатель лидировал на среде с ИМК 0.5 мг/л. Повышенные концентрации ауксина - 3; 4; 5 мг/л стимулировали избыточное формирование каллусных масс у основания микропобегов. Каллусообразование усиливалось пропорционально росту концентрации ИМК; корни у таких растений были хрупкие, часто обрывались в процессе посадки в питательный субстрат.

Добавление к составу питательной среды активированного угля, как сорбента веществ, ингибирующих укоренение, не оказало стимулирующего эффекта на ризогенез. Эффект от затенения зоны корней в нашем эксперименте также не зафиксирован (табл.3.39). В наших исследованиях активированный уголь значительно задерживал начало появления корней и их дальнейшее развитие.

Таблица 3.39. Влияние активированного угля на укоренение подвоя ММ106

Концентрация в составе среды:		Количество побегов, шт.	Укоренение растений по периодам		
ИМК (мг/л)	Активированный уголь (мг/л)		через 10 дней	через 30 дней	через 50 дней
3 (К)	0	60	18	49	67
3	125	60	2	20	38
3	250	60	2	14	47
3	500	60	1	16	37
3	1000	60	0	9	45

(К) - контроль

В качестве альтернативного способа индукции корней *in vitro* мы изучили возможность укоренения микропобегов на жидких питательных средах. По полученным результатам видно, что на средах без агар-агара процесс ризогенеза стартовал значительно раньше (табл. 3.40).

В контрольном варианте на жидкой питательной среде даже без присутствия ауксина укоренилось в 2,5 - 3,6 раза больше растений, чем на агазированной питательной среде, однако такие растения проявляли признаки хлороза, часто у основания побега развивались одиночные корни.

Через 30 дней после посадки зафиксировано преимущество укоренения на жидкой питательной среде с ИМК 0.5 мг/л по сравнению со всеми вариантами опыта. На среде без агара отклонение от среднего значения укоренившихся растений было положительным и максимальным. Процент укоренившихся микропобегов достиг 73 %, в то время как на твердой питательной среде был в пределах 45 %. В присутствии более высоких концентраций ауксина темпы укоренения на жидкой среде снижались. При ИМК 3 мг/л

наблюдали гибель микропобегов. На жидких питательных средах доступность ауксина повышена за счёт более лёгкой адсорбции компонентов среды. Таким образом концентрация ауксина в пределах 3 мг/л на питательной среде без агар - агара оказалась критической для побегов яблони ММ106.

Таблица 3.40. Укоренение микропобегов яблони на питательных средах разной плотности

Консистенция среды	Концентрация ИМК в питательной среде, мг/л	Укоренившиеся побеги, %	Отклонение от среднего значения, %	Отклонение от контроля, %
Через 30 дней после посадки				
Питательная среда с агар-агаром, 6 г/л	0 (К)	18	- 17,5	-
	0,5	45	+ 9,5	+ 27
	1,0	30	- 5,5	+ 12
	3,0	49	+ 13,5	+ 31
	Среднее значение	35,5	-	-
Питательная среда без агар-агара	0	45	+ 6,5	+ 27
	0,5	73	+ 34,5	+ 55
	1,0	36	- 2,5	+ 18
	3,0	0	- 38,5	- 18
	Среднее значение	38,5	-	-
Через 50 дней после посадки				
Питательная среда с агар-агаром, 6 г/л	0 (К)	20	- 30,5	-
	0,5	73	+ 22,5	+ 22,5
	1,0	42	- 8,5	- 8,5
	3,0	67	+ 16,5	+ 16,5
	Среднее значение	50,5	-	-
Питательная среда без агар-агара	0	73	+ 7,8	+ 53
	0,5	79	+ 13,8	+ 59
	1,0	70	+ 4,8	+ 50
	3,0	39	- 26,2	+ 19
	Среднее значение	65,2	-	-

К - контроль

Через полтора месяца после посадки на укоренение на твердой среде в присутствии ИМК 0,5 мг/л укоренилось 73 % растений, а на жидкой 79 %. Преимущество в результатах на среде без агара сохранялось.

Таким образом укоренение растений на жидких питательных средах позволило практически вдвое сократить длительность этапа ризогенеза и обеспечить высокий процент укоренённых побегов, что является преимуществом и может быть использовано

на практике. Однако затруднения, возникающие при работе с жидкими средами, необходимость использования мостиков, подложки для фиксации растений, сдерживает применение этого метода при больших производственных объёмах.

Качество укоренившихся растений отличалось в зависимости от состава питательной среды, на которой было простимулировано развитие корней *in vitro* (табл. 3.41, 3.42).

Таблица 3.41. Показатели качества микропобегов яблони укоренившихся в условиях *in vitro*

Показатели качества	Концентрация ИМК в питательной среде, мг/л				Среднее значение
	0,5	1	3	3*	
Подвой ММ106					
Укоренившиеся побеги, %	73	42	67	62	61
Средняя высота укоренившихся побегов, см	3,5	3,0	3,0	2,08	3,07
Отклонения от среднего значения по высоте	+ 0,43	- 0,07	- 0,07	- 0,27	-
Среднее количество корней на побег, шт.	4,5	4	5	3,5	4,25
Отклонение от среднего количества корней	+ 0,25	- 0,25	+ 0,75	- 0,75	-
Средняя длина корней, см.	3,9	3,7	3,0	2,8	3,35
Отклонения от среднего значения по длине корней	+ 0,55	+ 0,35	- 0,35	- 0,55	-
Подвой 54-118					
Укоренившиеся побеги, %	80	60	75	65	70
Средняя высота укоренившихся побегов, см	4,0	4,5	3,5	3	3,75
Отклонения от среднего значения по высоте	+ 0,25	+ 0,75	- 0,25	- 0,75	-
Среднее количество корней на побег, шт.	7,5	8,0	6,0	6,5	7,0
Отклонение от среднего количества корней	+ 0,5	+ 1	- 1	- 0,5	-
Средняя длина корней, см.	4,0	4,2	2,8	3,5	3,6
Отклонения от среднего значения по длине корней	+ 0,4	+ 0,6	- 0,8	- 0,1	-

*- пересадка растений со среды с ИМК на безгормональную среду через 7 дней

Средняя высота побегов яблони после укоренения составила 3,07 см у подвоя ММ106 и 3,75 см у подвоя 54-118. Количество корней на побег варьировало от 4,25 до 3,5 у ММ106 и от 7,5 до 6,5 у 54-118 (табл. 3.41).

У подвоя 54-118 на 1 микропобег в среднем образовалось на 2,75 корня больше, чем у ММ 106. Между подвоями длина корней существенно не отличалась. Замечено что на питательных средах с пониженным содержанием ауксина по всем показателям есть положительное отклонение от средней по значению - таким образом на средах с ИМК 0,5 - 1 мг/л побеги выше ростом и с лучше развитой корневой системой.

Биометрические показатели подвоя Sydo отличались от других биотипов высотой побега и длиной корней (табл. 3.42). На один побег сформировалось в среднем 3,8 корня, средней длиной 4,1 см. Самые длинные корни сформировались на питательных средах с ИМК 0,5 - 1 мг/л. У груши Pyriam укоренённые побеги достигали 3,8 - 2,8 см. в высоту. Корни были укороченными, утолщёнными - в среднем развивалось по 3 - 4 корня на микропобег.

Таблица 3.42. Показатели качества микропобегов подвоев для груши, укоренившихся в условиях *in vitro*

Показатели качества	Концентрация ИМК в питательной среде, мг/л				Среднее значение
	0,5	1	3	3*	
Подвой Pyriam					
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
Отклонения 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
Отклонения от среднего значения по длине корней	- 0,2	+ 0,1	+ 0,3	- 0,1	-
Подвой Sydo					
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
Отклонения 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 количества корней	+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	-

*- пересадка растений со среды с ИМК на безгормональную среду через 7 дней

Минимальные показатели суммарной длины корней у подвоев MM106 (9,8 см), Sydo (11,7 см) и Pyriam (8,7 см) зафиксированы в варианте, предусматривающем пересадку на безгормональный питательный состав, а у подвоя 54-118 (16,8 см) на среде с ИМК 3 мг/л.

Самые высокие показатели суммарной длины у MM106 на среде с ИМК 0,5 мг/л- равны 17,5 см; у Pyriam на среде с ИМК 3 мг/л- 12 см; у Sydo и 54-118- на среде с ИМК 1 мг/л- 22 см и более 30 см у 54-118.

В результате укоренения изучаемых подвоев в условиях *in vitro* были получены крепкие, хорошо развитые растения необходимой высоты. Качество этих растений соответствовало параметрам, необходимым для дальнейшей успешной адаптации к нестерильным условиям.

Таблица 3.43. Результаты укоренения подвоев семячковых культур за весь период наблюдений

Подвой	Концентрация ИМК в питательной среде, мг/л.	Укоренение подвоев в разные годы исследований						Укоренилось в среднем %
		первый год		второй год		третий год		
		высажено побегов, шт.	укоренилось побегов, %	высажено побегов, шт.	укоренилось побегов, %	высажено побегов, шт.	укоренилось побегов, %	
MM106	0.5	60	73	20	55	20	70	66
	1	60	42	20	50	20	55	49
	3	60	67	20	80	20	75	74
	3*	60	62	20	55	20	61	59
54-118	0.5	20	65	20	80	20	80	75
	1	20	70	20	55	20	60	62
	3	20	70	20	70	20	75	71
	3*	20	50	20	65	20	65	60
Pyriam	0.5	20	50	20	55	20	45	50
	1	20	55	20	60	20	50	55
	3	20	75	20	45	20	60	60
	3*	20	45	20	50	20	55	50
Sydo	0.5	10	30	10	30	20	30	32
	1	10	40	10	60	20	50	49
	3	10	30	10	40	20	40	40
	3*	10	50	10	70	20	65	60

* - пересадка растений со среды с ИМК на безгормональную среду через 7 дней

Повторяя серии экспериментов по укоренению изучаемых подвоев в разные годы исследований, мы наблюдали определённые отклонения полученных результатов при соблюдении равных условий эксперимента. В среднем они были в пределах 5 - 20 %. Можем объяснить эти отличия разным содержанием эндогенных гормонов в растениях по годам; некоторым отклонением в условиях содержания культур и рядом других неизбежных факторов.

Для точности эксперимента данные основных схем опытов были собраны в таблице 3.43 для расчета среднего значения по всему периоду наблюдений.

Средний показатель укоренения подвоев по годам подтверждает выделенные нами оптимальные схемы для успешного ризогенеза по каждому изученному биотипу.

Активное формирование корней у подвоя яблони MM106 и груши Pygiam наблюдалось на средах с присутствием ИМК 3 мг/л. Подвой 54-118 быстро и эффективно укоренялся при невысоких концентрациях ауксина - ИМК 0,5 мг/л. А для подвоя Sydo предпочтительно проведение пересадки на безгормональную среду после насыщения на среде с ИМК 3 мг/л.

3.4. Адаптация растений в условиях *ex vitro*

Процесс адаптации микрорастений сопровождается трудностями из-за перестройки процессов транспирации листовой пластинки и резкого повышения уровня патогенной микрофлоры во время переноса растений из условий *in vitro* в условия *ex vitro* [153; 265]. На положительный результат при приживаемости растений в грунте влияют способы укоренения микропобегов в условиях *in vitro*, а также строгое соблюдение методики акклиматизации пробирочных растений в нестерильных условиях.

Ввиду преобладания количества укоренённых растений подвоя MM106, на нём были испытаны 6 разновидностей субстрата для высадки в теплицу (табл. 3.44).

Самой подходящей для развития растений оказалась двухслойная смесь: торф: перлит (1:1) в качестве основного слоя и мелкозернистый перлит в качестве верхнего слоя (3 - 4 см.) [143; 185]. Перлит - экологически чистый, нейтральный материал, не подвержен разложению под действием микроорганизмов и в тоже время хорошо аэрируем. Он обеспечивает растения необходимыми условиями в первые, самые сложные недели адаптации. В дальнейшем, в процессе роста, корни адаптированных растений достигают нижнего слоя субстрата и могут использовать его органические вещества. В этом варианте приживаемость растений была максимальной - 85 % [143]. Через полтора месяца после посадки средняя высота растений достигла почти 10 см (табл. 3.44).

Таблица 3.44. Приживаемость и развитие растений подвоя яблони MM106 на разных субстратах при адаптации в теплице

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	+ 21,9	9,8	+ 4,1
Перлит 1-3 мм	торф : перлит (1:1)	80	73	+ 9,9	7,3	+ 1,6
Перлит 3-5 мм	торф : перлит (1:1)	80	54	- 9,1	4,6	- 1,1
-	торф : перлит (1:1)	80	74	+ 10,9	6,6	+ 0,9
-	торф : песок (2:1)	80	59	- 4,1	3,7	- 2,0
Песок	торф : перлит (1:1)	80	34	- 29,1	2,4	- 3,3
Среднее по показателю		80	63,1	-	5,7	-
НСР 0,05		-	17,3	-	1,24	-

Хороший результат получен также на смеси торф : перлит (1:1) - приживаемость составила 74 % при средней высоте побегов 6,6 см. На субстрате торф: песок адаптировалось в среднем 59 % растений, но наблюдалась слабая динамика роста растений.

Таблица 3.45. Влияние субстрата на приживаемость и рост укоренённых микропобегов подвоя яблони

Дисперсия	Сумма квадратов, SS	Степень свободы, df	Средний квадрат, ms	Достоверность, F	
				расчетная	табличная 0,05
Приживаемость растений					
Субстрат	6696,87	5	1339,37	9,4776	2,7728
Вариантов	2543,75	18	141,31	-	-
Случайные отклонения	9240,62	23	-	-	-
Рост растений					
Субстрат	145,72	5	29,14	39,650	2,7728
Вариантов	13,23	18	0,735	-	-
Случайные отклонения	158,95	23	-	-	-

Данные таблицы 3.45 доказывают, что на приживаемость адаптируемых растений и их развитие с преобладающей долей влиял субстрат. Расчётная достоверность превышает табличную, что подчеркивает важность оптимизации питательной смеси.

На этапе акклиматизации необходимым фактором для хорошего дальнейшего развития растений является дополнительное минеральное питание [185].

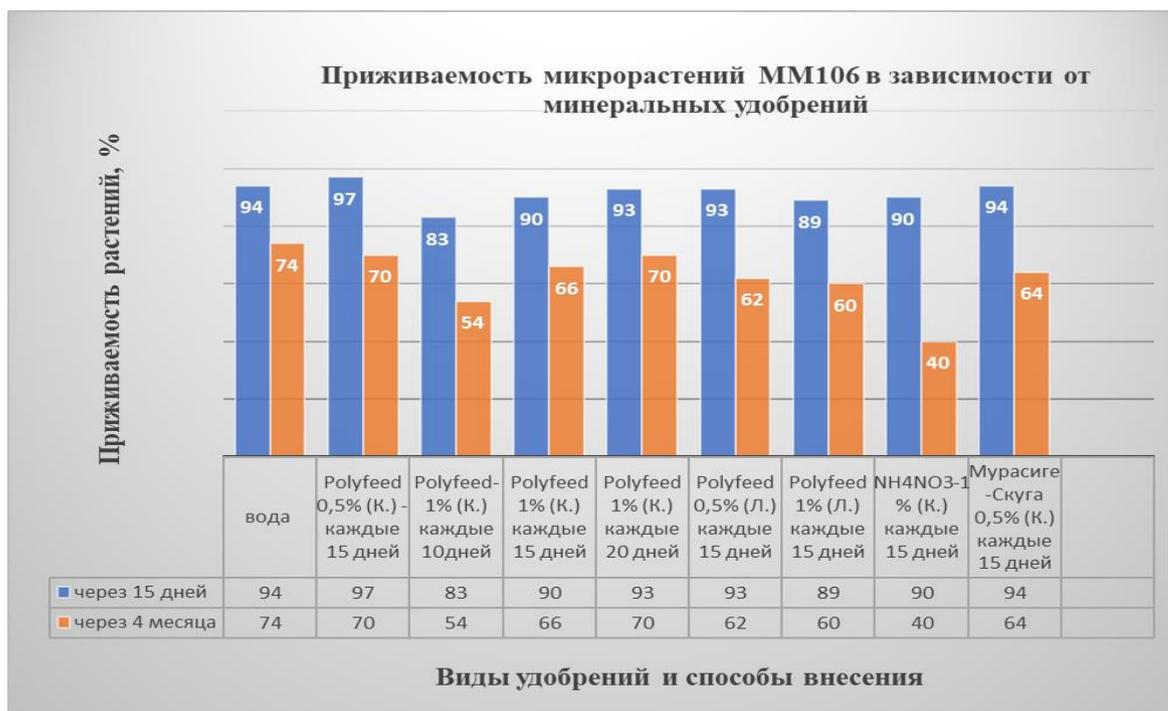


Рисунок 3.6. Приживаемость микрорастений ММ106 в зависимости от внесения минеральных удобрений

Примечания: (К)-корневая обработка, (Л)- листовая обработка



Рисунок 3.7. Развитие микрорастений ММ106 в зависимости от внесения минеральных удобрений

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

В наших исследованиях о дефиците питания свидетельствует сравнительно низкий рост в контрольном варианте, где растения поливали только водой (рис.3.6, 3.7). Лучшие результаты демонстрировали корневые подкормки водорастворимым минеральным удобрением Polyfeed 1 % с интервалом в 15 - 20 дней, которые поддерживали стабильную динамику роста растений [143].

Во всех вариантах наблюдалась тенденция к уменьшению численности растений - к выпадам. Проведение первой вегетационной подкормки с более низкой концентрацией минеральных элементов (Polyfeed - 0,5 %) позволило сократить потери растений. Варианты, предусматривающие проведение только листовых подкормок (Polyfeed 0,5 - 1 %), а также корневых аммиачной селитрой и набором минеральных солей по Мурасиге-Скугу, не обеспечили растения необходимым ресурсом для стабильного развития.

Таблица 3.46. Приживаемость микрорастений изучаемых подвоев на этапе акклиматизации

Концентрация ИМК в составе среды, мг/л	Высажено на укоренение, шт.	Побеги, укоренившиеся <i>in vitro</i> .		Приживаемость <i>ex vitro</i> от числа укоренившихся <i>in vitro</i> .	
		штук	%	штук	%
54-118					
0,5	20	16	80	13	81*
1	20	12	60	9	75*
3	20	15	75	8	53
3'	20	13	65	10	77*
Среднее значение	20	-	70	-	71
Pyriam					
0,5	20	9	45	4	44
1	20	10	50	5	50
3	20	12	60	7	58*
3'	20	11	55	5	45
Среднее значение	20	-	52	-	49
Sydo					
0,5	20	6	30	3	50
1	20	10	50	6	60
3	20	8	40	5	62
3'	20	13	65	9	69*
Среднее значение	20	-	46	-	60

* - положительные отклонения от среднего значения

' - пересадка на безгормональную среду через 7 дней

Успех процесса адаптации к нестерильным условиям напрямую зависит от способа укоренения растений в культуре тканей, уровня развития микропобегов, а также от их способности приспосабливаться к изменениям внешних факторов среды.

В наших исследованиях, установлено, что условия индукции ризогенеза оказывали значительное влияние на приживаемость растений изучаемых подвоев. В вариантах, где процесс укоренения *in vitro* сопровождался положительной реакцией на стимуляцию ауксином, растения в дальнейшем хорошо развивались, у них формировалась качественная корневая система (рис. 3.8, 3.9). Это обеспечивало им высокие адаптационные возможности и повышало количество прижившихся растений. Эта закономерность наблюдалась у всех укоренённых подвоев.

Подвой 54-118 на среде с ИМК 0,5 мг/л достиг наилучших показателей ризогенеза. Приживаемость в субстрате у растений из этого варианта тоже была на высоком уровне и составила 81 % (табл. 3.46).

Подвои для груши были более чувствительными к стрессовым условиям при переходе в условия *ex vitro*. У Sydo максимальный показатель адаптированных растений составил 69 %, а у Ругіам - 58 %. Потеря тургора, почернение листьев - перечень причин, из-за которых эффективность адаптации груши была менее успешной среди изучаемых подвоев.

Таблица 3.47. Приживаемость растений подвоя яблони ММ106 на этапе акклиматизации в зависимости от условий индукции ризогенеза *in vitro*

Концентрация ИМК в составе среды, мг/л	Высажено на укоренение, шт	Побеги, укоренившиеся <i>in vitro</i> .		Приживаемость <i>ex vitro</i> от числа укоренившихся <i>in vitro</i> .	
		штук	%	штук	%
0 (К)	60	12	20	6	50
0,5	60	44	73	27	61
1,0	60	25	42	10	41
3,0	60	40	67	29	72
3,0*	60	37	62	17	45
4,0	60	38	63	16	42
4,0*	60	31	52	10	31
5,0	60	32	53	11	34
5,0*	60	33	55	10	30
Среднее значение	-	-	54	-	45

К - контроль

* – пересадка на среду без ауксина через 7 дней

У подвоя ММ106 после укоренения на питательной среде с ИМК 0, 5 мг/л, в нестерильных условиях адаптировались 61 % растений с хорошо развитой корневой

системой. При укоренении на среде с ИМК 3 мг/л показатель приживаемости у ММ106 достиг 72 %.

Варианты, в которых побеги после насыщения ауксином пересаживали на безгормональную питательную среду, для ММ106 не были высокорезультативными ни в процессе укоренения, ни в процессе адаптации растений. В среднем прижилось 30 - 45 % растений, что ниже показателя контрольного варианта, в котором адаптировано 50 % подвоев.

При адаптации вегетативных подвоев яблони мы столкнулись с тем, что некоторая часть растений отставала в росте и требовала доращивания на второй год. Причины задержки роста объясняются отсутствием в условиях *in vitro* периода покоя, к чему более чувствительны семечковые культуры и что является важным условием для их активного развития. Такие растения культивировали в теплице, обеспечивая необходимый уход, защиту и внесение удобрений. Доращивание растений совместили с опытом по внесению минерального питания.

Таблица 3.48. Процент приживаемости растений ММ 106 при доращивании в теплице

Варианты	Повторность №1			Повторность №2			Повторность №3			Приживаемость в среднем, %
	Высажено растений, шт.	Прижилось растений		Высажено растений, шт.	Прижилось растений		Высажено растений, шт.	Прижилось растений		
		шт.	%		шт.	%		шт.	%	
1	94	86	91,5	171	163	95,3	103	101	98	94,9
2	83	82	98,8	77	74	96,1	154	154	100	98,3
3	76	77	98,7	103	82	79,6	117	115	98	92,1
4	84	84	100	88	87	98,8	113	113	100	99,6
5	95	94	99	93	91	97,8	111	109	98,2	98,3
6	92	92	100	108	106	98,2	108	106	98	98,7
К.	152	147	96,7	118	114	96,6	116	101	87	93,4

Опыт включал в себя 6 вариантов минерального питания:

- 1 - Корневая подкормка (полив) 1 % раствором аммиачной селитры,
- 2 - Корневая подкормка (полив) 1 % Polyfeed (NPK 19:19:19 + 6 микроэлементов)
- 3 - Внекорневая подкормка (листовая) 0,5 % Polyfeed
- 4 - Внекорневая подкормка удобрением Микроком (разработка Института Физиологии Академии Наук Молдовы)

5- Корневая подкормка (полив) 1 % раствором аммиачной селитры + внекорневая подкормка удобрением Микроком

6- Корневая подкормка (полив) 1 % Polyfeed + внекорневая подкормка удобрением Микроком

Контроль – полив водой (К.)

Учитывали приживаемость растений к концу вегетационного периода, их среднюю и максимальную высоту. Высаженные весной на доращивание растения (табл. 3.48) хорошо прижились. Не зафиксировано значительных отклонений в приживаемости по вариантам опыта. Активно росли и развивались минимум 92,1 % растений.

Таблица 3.49. Влияние минерального питания на прирост растений подвоя яблони ММ 106

Вариант	Повторность №1		Повторность №2		Повторность №3		Средняя высота, см	Разница с контролем, см.	Максимальная высота в варианте, см
	Кол-во учетных растений, шт.	Высота, см	Кол-во учетных растений, шт.	Высота, см.	Кол-во учетных растений, шт.	Высота, см.			
1	29	60,0	60	27,8	60	36,9	41,6	+11,7	105
2	30	60,0	45	51,9	75	46,2	52,7	+22,8	125
3	30	50,5	45	51,6	60	59,0	53,7	+23,8	115
4	30	38,0	45	26,5	60	65,8	43,4	+13,5	125
5	30	27,8	45	55,2	60	41,3	41,4	+11,5	106
6	30	31,3	45	27,3	60	46,3	34,9	+5,0	88
К.	40	32,0	60	33,9	56	23,8	29,9	-	104

К концу вегетации под влиянием минерального питания растения заметно отличались по высоте. Самые высокие результаты получены в вариантах 2 и 3, которые предусматривали проведение корневой подкормки Polyfeed 1 % и листовой подкормки Polyfeed 0,5 %. Средняя высота у этих растений составила 52 - 53 см., положительное отклонение от контроля было максимальным. На 10 - 11 см ниже были растения, которым проводили корневую подкормку 1 % аммиачной селитрой, листовую удобрением Микроком и серию чередований аммиачной селитры и Микроком. При поливе водой опытные растения достигли средней высоты 29, 9 см. Максимальная высота в опытных вариантах колебалась от 88 до 105 см.

Доращивание подвоя ММ106 с своевременным внесением минеральных удобрений позволило к концу вегетации получить материал пригодный к посадке в маточник.



Рисунок 3.8. Адаптированный в теплице подвой яблони MM106
(Архив лаборатории вирусологии НИИП)



Рисунок 3.9. Адаптированный в теплице подвой яблони 54-118
(Архив лаборатории вирусологии НИИП)

3.6. Выводы к главе

На этапе введения в культуру *in vitro* были изучены такие первостепенные вопросы как получение асептической культуры, способной к дальнейшему росту и развитию; выявлен оптимальный режим стерилизации; вид экспланта; нивелировано ингибирующее действие полифенолов на эксплант; подобран оптимальный состав питательной среды.

Исследования по изолированию растительного материала на разных стадиях развития подчеркнули значимость индивидуального подхода к выбору стерилизующего агента и типа эксплантов. Установлено что молодые верхушки искусственно пробудившихся растений обладали пониженным уровнем контаминации микроорганизмами, что позволяло с успехом использовать малотоксичные стерилизующие препараты. Преимущество введения эксплантов с искусственно пробужденных черенков продемонстрировано на примере подвоя яблони MM106, подвоя Sydo при стерилизации гипохлоритом Са 6 % в течение 10 минут. Доля жизнеспособных эксплантов составляла 71 - 80 %.

В случаях, когда в качестве первичного материала использовали активно растущие верхушки в период вегетации, эффективность применяемых препаратов варьировала в зависимости от подвоя. Высокий показатель жизнеспособных эксплантов для подвоя Ругам был достигнут при использовании Пергидроль 15 % в течение 15 минут. Он обеспечил 67 % стерильных регенерирующих верхушек. Для Sydo эффективным было применение гипохлорита Са 6 % и пергидроль 15 % - получено 70 – 79 % жизнеспособных эксплантов. После обработки в дезинфицирующем растворе Табидез 0,5 % у подвоя яблони 54- 118 получено 63 % способной к развитию культуры, а у MM106 - 70 %.

Эффект применения препаратов ртути был универсален и высок для всех биотипов, но с учетом рисков его применения мы отказались от дальнейшего использования в пользу менее токсичных препаратов.

Установлены генотипические отличия между подвоями в отношении устойчивости к повреждающему воздействию стерилизатора и дальнейшей способности эксплантов к восстановлению и развитию. Подвой яблони MM106, 54-118 и Sydo обладали более высоким потенциалом к регенерации по сравнению с подвоем груши Ругам.

Применение на этапе стерилизации протекторов ПВП 5 % м.м. 30000 и ПЭГ 5 % и 15 % с м.м. 20000 и 6000 положительно влияло на жизнеспособность эксплантов.

Для культивирования первичных эксплантов MM106 и Ругам рекомендуется использование питательной среды MS в полной концентрации; для эксплантов яблони 54-

118 и груши Sydo - среда MS с пониженной концентрацией макросолей. Положительный эффект от действия ауксина на развитие инициированных растительных тканей не доказан. Оптимальное соотношение БАП : ИМК в питательной среде при введении в культуру *in vitro* 1: 0 – 0,5 мг/л.

Добавление флороглюцинола в питательную среду для инициации оказалось нецелесообразным.

На этапе микроклонального размножения были изучены и оптимизированы основные факторы, оказывающие влияние на формирование новых побегов.

Индивидуально для каждого биотипа были испытаны наиболее распространённые составы питательных сред с целью выявления оптимальных композиций минеральных солей. Установлено что подвой яблони MM106 и подвой Rugiam активно развивались и пролиферировали на питательной среде MS с полным содержанием солей. Подвой Sydo лучше развивался на среде MS с пониженным содержанием неорганического азота, а для 54-118 подходящей оказалась питательная среда WPM или MS с $\frac{1}{2}$ NH_4NO_3 .

В процессе испытаний разных комбинации стимуляторов роста выяснилось, что MM106 целесообразно культивировать на питательных средах с БАП 2 мг/л и ИМК 0,5 мг/л - коэффициент размножения 4,5 дополнительных побега на каждый исходный. При размножении 54-118 на питательных средах с БАП 0,5 мг/л коэффициент размножения составил 1 : 5. Подвой Rugiam активно пролиферировал на среде с БАП 1 мг/л - коэффициент размножения достигал 3,3. У подвоя Sydo было получено 3,8 новых побега при БАП 3 мг/л и 3,6 побега при БАП : НУК - 1 : 0,5 мг/л.

Подтверждено влияние витаминов и сахарозы в питательной среде на темпы размножения изучаемых подвоев.

Испытаны дополнительные приёмы для стимуляции пролиферации. Горизонтальное расположение побегов на поверхности питательной среды позволило увеличить в 2 - 3 раза формирование дополнительных побегов у подвоев яблони и в 1,3 раза у подвоев для груши.

Изучено действие ГК₃ на размножение микрорастений и их высоту. Использование гиббереллина 0,5 - 1 мг/л для повышения ростовых показателей микропобегов оказывало положительный эффект в сочетании с БАП в концентрации от 1 до 4 мг/л. ГК₃ от 2 мг/л и выше провоцировала у микрорастений нежелательные эффекты и угнетение. Культивирование подвоев на среде с оптимизированной концентрацией ГК₃ позволило получить от 66 до 85 % побегов высотой больше 1,5 см.

На этапе ризогенеза были подобраны питательные среды и концентрации стимуляторов, обеспечивающие активное укоренение изучаемых подвоев.

Эффективной для индукции корней у подвоев семечковых культур показала себя ИМК, которая в два раза повысила количество укоренившихся микропобегов.

Необходимым условием для успешного укоренения подвоев было понижение концентрации макросолей в питательной среде в два раза. Концентрация микросолей не оказывала решающего влияния на эффективность процесса.

У подвоя MM106 и Ругам образование корней активно протекало при повышенном содержании ИМК в питательной среде (3 мг/л). Для укоренения 54-118 было достаточно концентрации ИМК 0,5 мг/л. Для подвоя Sydo оптимальной оказалась двухэтапная схема укоренения с пересадкой на безгормональную питательную среду после насыщения на среде с ИМК 3 мг/л.

В качестве альтернативы изучили возможность укоренения микропобегов на жидких питательных средах. Показана возможность сокращения продолжительности этапа укоренения почти вдвое.

На этапе адаптации были выделены субстраты, обеспечивающие растения необходимыми условиями для успешной адаптации и дальнейшего развития. Высадка микрорастений в двухслойный субстрат, основными компонентами которого являются торф : перлит и мелкозернистый перлит в качестве верхнего слоя, обеспечила приживаемость адаптантов на уровне 80 %.

Подобрана схема внесения минеральных удобрений, которая обеспечивает растения качественным сбалансированным питанием и стимулирует их хорошее развитие. Корневое внесение комплексного минерального удобрения Polyfeed 1 % с интервалом 15 - 20 дней способствовало стабильной динамике роста адаптированных растений и достижения ими средней высоты 22 см.

Установлена взаимосвязь между количеством прижившихся при адаптации растений с способом укоренения на этапе ризогенеза. Лучше преодолевали факторы стресса растения, продемонстрировавшие в условиях *in vitro* положительную реакцию на стимулирование корнеобразования. У таких растений формировалась качественная корневая система, что в дальнейшем обеспечивало им высокие адаптационные возможности. Следовательно, индивидуальный подход и подбор оптимальных для каждого биотипа условий для ризогенеза позволили повысить выживаемость адаптированных растений до уровня 70 – 80 % для подвоев яблони и до 60 – 70 % для подвоев для груши.

4. ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МАТОЧНИКА КЛОНОВОГО ПОДВОЯ ММ106

Микроклональное размножение растений является современным, перспективным способом массового тиражирования безвирусного посадочного материала, позволяющее значительно сократить сроки размножения, повысить биологический потенциал растений и как следствие, эффективность производственного процесса.

Включение технологии микроклонального размножения подвоев яблони и груши в процесс производства безвирусного посадочного материала способно значительно улучшить рентабельность плодовых питомников и следовательно, всей отрасли плодоводства. Высокий экономический эффект достигается за счёт высокого коэффициента размножения в условиях *in vitro* и сокращения сроков производства.

4.1. Расчет экономической эффективности эксплуатации маточника

Была рассчитана экономическая эффективность эксплуатации маточника подвоя яблони ММ106, посаженного в НПИСВПТ высококачественным материалом, размноженным в культуре *in vitro* с помощью разработанной нами технологии (табл. 3.50).

При составлении таблицы в основу были взяты учёт и наблюдения за маточником категории База и традиционно размножаемым маточником подвоя ММ106, а также данные на основании существующих технологических карт по эксплуатации плодовых маточников [33; 73; 201]. Расчет производился на 1 тыс. растений. В затраты на уход за маточником вошли стоимость основных агротехнических операций, оплата труда и сопутствующие расходы.

В маточнике, высаженном растениями категории Базисные, с второго года эксплуатации расходы увеличились, включив стоимость ежегодного вирусологического тестирования и расходы на отъём отводков. Уровень рентабельности рассчитывали, как отношение прибыли к затратам по эксплуатации, умноженное на 100 %.

Наш опыт наблюдения за маточниками, как и данные литературных источников [27; 40; 79; 97; 132; 135; 154; 186; 185; 246] подтвердили высокую продуктивность плантации, заложенной материалом после культуры *in vitro*. По данным таблицы 3.50 уже на второй год после посадки наблюдалось преимущество в эксплуатации безвирусного маточника, уровень рентабельности которого был выше на 36 %. На третий - четвёртый год эксплуатации рентабельность продолжала повышаться и более чем в три раза превышала показатели рядового маточника. Исследования показали, что высокие производственные затраты быстро окупались за счёт повышенной продуктивности

маточных насаждений, а также высокого качества отводков, которое в дальнейшем отражалось в стоимости материала данной категории.

Таблица 3.50. Экономическая эффективность маточника клонового подвоя 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

4.2. Выводы к главе

Сегодня одним из условий современного прибыльного питомниководства является использование безвирусного посадочного материала. Вирусные заболевания способны снижать общую продуктивность растений в маточнике до 35 % в зависимости от подвоя, а выход стандартных отводков до 27 % [185].

На основании полученных нами результатов можем сделать вывод что создание плантации маточника клоновых подвоев с помощью растений, размноженных в культуре *in vitro*, позволит повысить рентабельность маточных насаждений в 2 - 3 раза. Маточники биологической категории База дают возможность без риска потерь производить конкурентноспособную качественную продукцию, соответствующую нормам международной системы сертификации посадочного материала. Высокий биологический потенциал такого материала в дальнейшем 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 Pugiам и подвоев яблони 54 - 118 и ММ106, 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 ММ106 и Pugiам 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 Pugiам 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 Pugiам. 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. Для увеличения количества микрорастений, пригодных к дальнейшему укоренению, необходимо добавление в питательную среду ГК₃ 0,5 - 1 мг/л.

3. Условием для успешного укоренения микропобегов является снижение концентрации минеральных солей на основе среды MS и использовании стимуляторов ауксинового ряда. Для ММ106 и Pugiам 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.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. ANCU, S., DUȚU, I. et al. Vegetativ Rootstocks Recently Registered and Promising Selections of Stone Fruit Species. *Bulletin UASVM Horticulture*. 66 (1). Pitești – Mărăcineni, 2009, pp. 1-3. DOI:10.15835/BUASVMCN-HORT:3803.
2. ANDREIEȘ, N. Rezultate obținute în ameliorarea părului la SCDP Voinești – Dâmbovița. În: *Realizări și perspective în horticultură, viticultură, vinificație și silvicultură*. Vol. 15 (1). Chișinău, 2007, pp. 73-76. ISBN 978-9975-946-31-5.
3. ARSENE, M., SESTRĂȘ, R. Aspecte privind înrădăcinarea propagulelor în micromultiplicarea prunului. În: *Realizări și perspective în horticultură, viticultură, vinificație și silvicultură*. Vol. 15 (1). Chișinău, 2007, pp. 122-125. ISBN 978-9975-946-31-5.
4. BABUC, V. Arhitectonica plantației pomicole – factor determinativ al productivității. În: *Realizări și perspective în pomicultură: Mat. Confer. Șt. pract.* Chișinău, 2000, pp. 22-29. ISBN 978-9975-64-127-2.
5. BABUC, V., CROITOR A. Suprafața foliară și productivitatea pomilor de măr în funcție de modul formării coroanei fus zvelt. În: *Lucrări științifice UASM*. vol. 151(1). Chișinău, 2007, pp. 221-225. ISBN 978-9975-946-31-5.
6. BABUC, V., PEȘTEANU, A., GUDUMAC, E., CUMPANICI, A. Ghid privind producerea merelor în sistemul superintensiv de cultură. Chișinău, 2009, p. 187. ISBN 978-9975-4044- 1-9.
7. BABUC, V., CIMPOIEȘ, Gh., PEȘTEANU, A. Bazele științifice ale sporirii productivității mărului în sistemul superintensiv de cultură. În: *Revista de Știință, Inovare, Cultură și Artă „Akademos”*. nr. 2 (17). 2010, pp. 81-84. ISSN 1857-0461.
8. BABUC, V. *Pomicultura*. Chișinău: Tipografia Centrală. 2012, p. 664 ISBN 978-9975-53-067-5.
9. BABUC, V., PEȘTEANU, A., GUDUMAC, E., CUMPANICI, A. *Producerea Merelor. Manual Tehnologic*. Chișinău: Bons Offices. 2013, p. 240 ISBN 78-9975-80-590-2.
10. BAVIERA, J., GARCIA, J., IBARRA, M. Commercial in vitro micropropagation of Pear CV Conference. În: *Acta.Hortic*. 256. pp. 63 - 68, DOI:10.17660/ActaHortic.1989.256.5.
11. BABUC, V. Promovator al progresului tehnico-științific în pomicultura din Republica Moldova. In: *Realizări și perspective în horticultură, viticultură, vinificație și silvicultură*”. Vol. 15 (1). Chișinău, 2007, pp. 3-6. ISBN 978-9975-946-31-5.
12. BADEA, E., SĂNDULESCU, D. *Biotehnologii vegetale*. București, Fundația Biotech, 2001. 295 p. ISBN: 973-9334-70-9.
13. BALAN, V., CIMPOIEȘ, GH., BARBĂROȘIE, M. *Pomicultura*. Chișinău: Museum, 2001, p. 453. ISBN 9975-906-39-7.

14. BALAN, V., Lumina ca factor de producție în pomicultură. In: Horticultură, Viticultură și vinificație, Silvicultură și grădini publice, Protecția plantelor: Simp. Șt. Intern. Chișinău, 2010, Vol. 24 (1), pp. 13-19. ISBN 978-9975-64-191-3.
15. BALAN, V., ȘARBAN, V. Starea pomiculturii în Republica Moldova în ultimele două decenii. In: Horticultură, Viticultură și vinificație, Silvicultură și grădini publice, Protecția plantelor: Simp.Șt. Intern. Chișinău, 2018, Vol. 47, pp. 13-18. ISBN 978-9975-64-296-5.
16. BALAN, V. Sisteme de cultură în pomicultură. Randamentul producției de fructe. In: Revista de Știință, Inovare, Cultură și Artă „Akademos”, 2009, nr. 4(15), pp. 82-89. ISSN 1857-0461.
17. BALAN, V. Evoluția învățământului horticol și cercetărilor științifice în pomicultura națională. In: Realizări și perspective în horticultură, viticultură, vinificație și silvicultură”: Chișinău, 2007, Vol. 15 (1), pp. 6-12. ISBN 978-9975-946-31-5.
18. BALAN, V., MANZIUC, V., PEȘTEANU, A. Contribuția universității agrare de stat la dezvoltarea pomiculturii în Republica Moldova. In: Horticultură, Viticultură și vinificație, Silvicultură și grădini publice, Protecția plantelor: Simp. Șt. Intern. Chișinău, 2018, Vol. 47, pp. 3-9. ISBN 978-9975-64-296-5.
19. BEHZAD KAVIANI, Optimization of In Vitro Propagation of Pear (*Pyrus communis* L.) ‘Pyrodwarf®(S)’ Rootstock, În: *Agronomy*. 2023, 13(1), 268. [citat 12.03.24]. Disponibil: <https://doi.org/10.3390/agronomy13010268>.
20. BELL, R.L. In vitro tissue culture of pear: Advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation. R.L. Bell, B.M. Reed, Proc. 8th IS on Pear. 2002, pp. 412-418. DOI:10.17660/ActaHortic.2002.596.66.
21. BERTAZZA, G. Light effects on in vitro rooting of pear cultivars of different rhizogenic ability. În: *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1995, N 41, pp. 139-143. [citat 12.03.24]. Disponibil: <https://doi.org/10.1007/BF00051582>.
22. BENJONGLIBA, A. Micropropagation in some plum cultivars. În: *Fruit. sci.Repts*. 1990, 17, N 2, pp. 57-68.
23. BAHRI-SAHLOUL, R., AMMAR, S. Micropropagation of three *Pyrus* rootstocks. În: *Advances in Horticultural Science*. Vol. 19, No. 1 (2005), pp. 21-28. ISSN: 0394-6169.
24. BORKOWSKA, B. Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted in vitro or ex vitro. În: *Sci Hortic*. 89: 2001, pp.195–206. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00230-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00230-2).
25. BOTU, M. Pomicultura generală și specială. Rm. Vâlcea. 2004, pp. 406. ISBN 973-8488-61-3

26. BOUDABOUS, M. Micropropagation of apple (*Malus domestica* L.cultivar Douce de Djerba) through in vitro culture of axillary buds. În: *Acta Bot. Gallica*. 157 (3), 2010, pp. 513-524. [citată 15.03.24]. ISSN: 1253-8078 (Print). 2166-3408 (Online). Disponibil: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/12538078.2010.10516227>.
27. CALAȘEAN, I. et al. Pepinierit Pomicol doar în baza Materialului devirozat. În: *Pomicultura, Viticultura și Vinificația*. Chișinău, 2012, nr 2, pp. 9 -10. ISSN 1857-3142.
28. CASTILLO, A., Micropropagation of different pear rootstocks. DOI:10.17660/ActaHortic.2020.1285.23. [citată 15.03.24]. Disponibil: http://www.inia.uy/Documentos/P%C3%BAblicos/INIA%20Las%20Brujas/PROGRAMA%20FUTICOLA/Simposio%20Pera/Sesion_poster/P3%20-%20Castillo.pdf.
29. CIMPOIEȘ, Gh. *Cultura mărului*. Chișinău: Bons Offices, 2012, 382 p. ISBN 978-9975-80-547-6.
30. CIMPOIEȘ, Gh. *Pomicultura specială*. Chișinău: Golograf-com, 2018, pp. 13-95. ISBN 978-9975-56-572-1.
31. CIMPOIEȘ, Gh. *Soiuri de pomi*. Chișinău: Print-Caro, 2020, pp. 10 - 98. ISBN 978-9975-56-727-5.
32. CIORCHINĂ, N., CUTCOVSCHII-MUȘTUC, A., et al. Înmulțirea in vitro a unor noi specii de arbuști fructiferi de interes economic pentru R. Moldova. În: *Conf. naț. cu part. Intern. „Știința în Nordul Republicii Moldova: realizări, probleme și perspective”*. ed. 2, Bălți 29 - 30 septembrie 2016, pp. 56-58. ISBN 978-9975-89-029.
33. CHISILI, M., RAPCEA, M., MLADINOI, V. *Normative tehnologice privind înființarea plantațiilor de culturi perene*. Chișinău, 2004, p.128. ISBN: 9975-62-122-8.
34. CHEVREAU, E. etc. Micropropagation of Pear (*Pyrus communis* L.). *High-Tech and Micropropagation II. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. vol 18, 1992, pp.244 - 249. https://doi.org/10.1007/978-3-642-76422-6_13.
35. Conferenza internazionale i portinnesti degli alberi da frutto. În: *Internat. Confer. on fruit tree rootstocks*. Pisa, 2009, p.211. [citată 15.03.24]. Disponibil: <https://www.georgofili.it/download/701.pdf>.
36. CLAPA, D., FIRA, N. An Efficient ex Vitro Rooting and Acclimatization Method for Horticultural. În: *Hortscience*. 48: 2013, pp. 159 - 167. [citată 15.03.24]. Disponibil: DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.48.9.1159>.
37. CLAPA D., FIRA AL. Înmulțirea plantelor prin culturi in vitro. Publisher: Editura Risoprint. Cluj Napoca, 2018, pp. 2 - 20. ISBN 978-972-53-2239-7.

38. CRISTIAN, S., SABBATINI, G., MARANGELLI, F., Micropropagation and ex vitro rooting of Wolfberry. 2018. În: HortScience 53(10):1494-1499. [citat 16.03.24]. Disponibil: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13423-18>.
39. DADU, C., RAPCEA, M., Starea actuală și tendințele de dezvoltare a pomiculturii în Republica Moldova. În: Pomicultura, Viticultura și Vinificația. nr. 4 [76] 2018, pp. 2 - 6. ISSN 1857-3142.
40. DADU, C., PRODANIUK, L. et al Methods applied in the production system of virus free planting material of Apple in the Republic Moldova. În: Romanian Journal of Horticulture. V.2, Bucharest, 2021, pp. 23 - 33. on line ISSN 2734-8083.
41. DIMITROVA, N., NACHEVA, L. An optimized micropropagation protocol by ex vitro rooting of pear rootstock OHF333 (*Pyrus communis* L.). În: Acta Agrobotanica. 2021, V.74, art.744. DOI 10.5586/aa.744.
42. DOMBRANSKI, J. Micropropagation of apple -A review. Biotechnology advances. În: Biotechnol Adv. 2010 Jul-Aug, 28(4):462-88. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.02.008.
43. DI-GAUDIO, A., TUBERT, V. etc. A new and rapid micropropagation protocol for *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. În: Forest Systems. 29(1), 2020, p. 6 eSC04. ISSN-L:2171-5068 <https://doi.org/10.5424/fs/2020291-15965>.
44. DUNSTAN, D. et al Propagation in vitro of the apple rootstock M4: effect of phytohormones on shoot quality. În: Plant cell tissue and organ culture. 1985, V.4, p. 55 - 60.
45. DUMANOGLU, H. and GULSEN, Y. In vitro rooting of quince A. În: ActaHortic. 1994, p. 367, pp. 360 - 363. DOI: 10.17660/ActaHortic.1994.367.54.
46. EPPO certification scheme for fruit trees, including almond. In: Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 06/2008, vol. 27(4), pp. 571 - 579.
47. GAMBORG, O.L., EVELEIGHT, D.E. Cultture methoda and defection of glucanases incultures of wheat and barley. Canad. J. Biochem. 1968, V.46, N5, p. 417.
48. **GENDOV, N., CHERNETS, A., KOVALENKO, G.** Preliminary results of micropropagation of vegetative rootstock for plum and apricot Wavit. În: "Modern trends in the agricultural higher education". International Scientific Symposium. October 5-6, 2023, p. 48. UTM. ISBN 978-9975-64-360-3 (PDF).
49. **GENDOV, N., KALASHIAN, N., PRODANYUK, E., CHERNET, A.** Розмноження вегетативної підщепи Кримськ 6 в Республіці Молдова. În: Матеріали міжнародної наукової конференції « Селекційно-генетична наука і освіта». Україна. Умань, 2023, с 47 - 52.

50. **GENDOV, N., CHERNETS, A., KOVALENKO, G.**, Conservation of biodiversity of pome rootstocks in the Republic of Moldova. În: “Genetics, Physiology and Plant Breeding”. International Scientific Conference. October 7 – 8. 2024, pp. 355 – 358. USM. IGPPP. ISBN 978- 9975-62-766-5. (PDF).
51. **GEORGE, E., HALL, M., etc.** Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors. Plant Propagation by Tissue Culture. 2008. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_7. Print ISBN 978-1-4020-5004-6.
52. **GEORGE, E., HALL, M., KLERK, G.** Plant Tissue Culture Procedure - Background. Plant Propagation by Tissue Culture. Springer. Dordrecht. 2008. [citat 12.03.24]. Online ISBN 978-1-4020-5005-3. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_1.
53. **HASEEB UR REHMAN.** In vitro proration of Pear (*Pyrus spp.*)- a review. În: International Journal of Research in Agricultural Science & Technology. Vol. 2, Iss. 2, 2014, pp. 06-23. [citat 04.01.24]. DOA:13122014.
https://iaeme.com/MasterAdmin/Journal_uploads/IJAST/VOLUME 2 ISSUE 2/IJAST 02 02 002.pdf.
54. Hotărîrea Guvernului nr. 415 din 21.06.2013. Pentru aprobarea Normei privind producerea, controlul, certificarea și comercializarea materialului de înmulțire și de plantare fructifer. În: Monitorul Oficial al Republicii Moldova. 28.06.2013. nr. 136-139.
55. **ISTRATE, M.** Pomicultură generală. Iași. Editura „Ion Ionescu de la Brad”. 2007, p. 296. ISBN 978-973-7921-86-4.
56. **HAMZA, A., OMAIMA M.**, Direct micropropagation of English lavender (*Lavandula angustifolia* Munstead) plant. În: Journal of Plant Production. vol. 2(1):81-96, 2011, p. 81 - 96. DOI:10.21608/jpp.2011.85464.
57. **JAMES, D.** Mikropropagation of red raspberry and the influence of phloroglucinol. În: Sc. Hortic. 1980, N 12, p.313-319.
58. **JLANGLI, Shi, ZHIDAN DONG,** Establishment of an efficient micropropagation system in enhancing rooting efficiency via stem cuttings of apple rootstock M9T337. În: Horticultural Science (Prague). 48, 2021 (2): 63–72, DOI: 10.17221/106/2020-HORTSCI.
59. **JONES, O.** Propagation in vitro of five apple scion cultivars. În: Hort.Sci. 1979, V.54, N2, p.155.
60. **KERESA, S., MIHOVILOVIC BOSNJAK, A.** Efficient Axillary Shoot Proliferation and in Vitro Rooting of Apple cv. 'Topaz'. Notulae botanicae Horti Agrobotanici. Cluj Napoca, vol. 40, N. 1, 2012. Research Articles, DOI: <https://doi.org/10.15835/nbha4017211>.

61. KHALIL, Al MAARRI, In vitro micropropagation of quince (*Cydonia oblonga* Mill.). În: *Scientia Horticulturae*. Volume 28, Issue 4, May 1986, pp. 315 - 321. [citată 16.03.24]. Disponibil: [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(86\)90105-6](https://doi.org/10.1016/0304-4238(86)90105-6).
62. LAIMER, M. etc. In vitro conservation of centennial Austrian Cornelian cherry accessions. În: *Plant.Biotechnol Rep* 15. pp. 289 - 298. 2021.
63. Legea Republicii Moldova cu privire la pomicultură Nr.728-XIII din 06.02.96. În: *Monitorul Oficial al Republicii Moldova*. 21.03.1996, nr.17-18/188.
64. LEȘANU, M., LOZAN, A. *Biotehnologii clasice și modern*. Chisinau, 2010, p. 166. ISBN:978-9975-4126-4-3.
65. LICEA, MORENO J. et al Micropropagation of valuable walnut genotypes for timber production: new advances and insights. În: *Annals of Silvicultural Research*. 44(1), 2020, pp.1 - 8. DOI:10.12899/ASR-1932.
66. LLOYD, G. & MCCOWN. B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop.Soc.* 30. 1980. pp. 421-427.
67. MELEKBER, SÜLÜŞOĞLU DURUL. In vitro propagation of *Cydonia oblonga* cv. Esme. În: *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. V47 (4), 2023. DOI 10.55730/1300-011X.3110.
68. MIRI, MEHDI, S. Micropropagation, Callus Induction and Regeneration of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). În: *Open Agriculture*. vol. 5 (1), 2020, p. 75 - 84. <https://doi.org/10.1515/opag-2020-0008>.
69. MIRANCEA, I. Micropropagarea in vitro la mestecan (*Betula Pendula*). În: *Revista Pădurilor*. N 5 - 6, 2014, pp. 64 - 66. ISSN: 1583-7890.
70. MOHAN, JAIN S. *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. The Netherlands. 2007, p. 548. ISBN: 978-1-4020-6351-0.
71. MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. În: *Physiologia Plantamm*. 1962, V. 15, № 13, pp. 473-497.
72. NEMTH, G. Benyladenine stimulated rooting in fruit tree rootstocks cultured in vitro. În: *Pflanzen physiologia*. 1975, 95, N 5, pp. 389 - 396.
73. Normativele investițiilor de capital pentru înființarea plantațiilor, normativele de producție de producție și fișele tehnologice la culturile prun, cais, nuc și zmeură. Chisinau, 2023.
74. OLIYA, B., CHAND, K. etc. Assessment of genetic stability of micropropagated plants of *Rhynchostylis retusa* (L.) using RAPD markers. În: *Scientia Horticulturae*. Volume 281, 30 April 2021. 110008. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110008>.
75. PALII, A., COMAROVA, G. et al. *Biotehnologii modern în fitotehnie și biosecuritate*. Chișinău: Ministerul Ecologiei și Resurselor Naturale. UNEP. 2004, p. 232. ISBN 9975-78-351-1.

76. PATI, P., KAUR, N. etc. In vitro propagation of rose. În: *Biotechnol Adv.* 2006, Jan-Feb, 24(1):94 -114. Epub 2005 Oct 5. doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.07.001.
77. PODWYSZYNSKA, M., ORLIKOWSKA, T., Application and Improvement of In Vitro Culture Systems for Commercial Production of Ornamental, Fruit, and Industrial Plants in Poland. În: *Acta Societatis Botanicorum Poloniae.* 2022, Vol. 91, Art.914, p.1-29. DOI: 10.5586/asbp.914.
78. Pomi, arbuști fructiferi, căpșun: ghid tehnic și economic. Otopeni, 2014, p. - 284. ISBN 978-973-1886-82-4.
79. PRODANIUC, L., CALAȘEAN, I., **GHENDOV, N.**, et al. Majorarea sortimentului de clone devirozate a speciilor pomicole. În: *Realizări științifice în horticultură, oenologie și tehnologii alimentare.* Chișinău, 2020, pp. 266 - 279. ISBN 978-9975-56-808-1.
80. RAHIM, N., YADOLLAHI, A. Micropropagation of GF 677 Rootstock. În: *Journal of Agricultural Science.* Vol. 4, No. 5; 2012, pp. 131 - 138. ISSN 1916-9752. DOI:10.5539/JAS.V4N5P131 Corpus ID: 55143682.
81. REZAEI, A., GHARAGHANI, A., SHEKAFANDEH, A. etc. Developing a Promising Micropropagation Method for Several Drought Tolerant and Hard-to-Root Wild and Domesticated Almond Genotypes by Shoot Tips Culture. *Erwerbs - Obstbau* 65. 2023, pp. 1463 -1477. <https://doi.org/10.1007/s10341-023-00866-z>.
82. RAHIM, N., ABBAS, Y. In vitro Culture of Gisela 6 Semi - dwarf Rootstock. În: *J. BIOL.ENVIRON.SCI.* 2013, 7(20), pp.57 - 64. [citată 16.03.24]. Disponibil: <https://uludag.edu.tr/dosyalar/jbes/20/mak01.pdf> .
83. RAPCEA, M., DONICA, A., Starea actuală și evoluția dezvoltării pomiculturii în perioada de tranziție de economia de piață. În: *Horticultură, viticultură, silvicultură și protecția plantelor.* Simpoz. "Agricultura modernă - realizări și perspective". Chisinau, Vol. 16, 2008. pp.151-156, ISBN: 978-9975-64-127-2.
84. REGNI, L., FACCHIN, S. Optimization of the *In Vitro* Proliferation of an Ancient Pear Tree Cultivar ('Decana d'inverno') through the Use of Neem Oil, *Plants (Basel)*, 2023. Apr; 12(8): 1593. doi: 10.3390/plants12081593.
85. SAGAVA, Y. Clonal Propagation of Orchids. In: Lindsey. În: *Plant Tissue Culture Manual.* Springer, Dordrecht, 1991, pp. 1 - 7. [citată 19.03.24]. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0103-2_25. Online ISBN978-94-009-0103-2.
86. SESTRĂȘ, R., SESTRĂȘ, A., BĂRBOS, A. Soiuri noi de măr și păr obținute la Cluj-Napoca, România. In: *Realizări și perspective în horticultură, viticultură, vinificație și silvicultură*: Chișinău, 2007, Vol. 15 (1), pp. 65 - 68. ISBN 978-9975-946-31-5.

87. SIMARD, M. J., MICHELESI, C., MASSERON, A. Pear rootstock breeding in France. În: *Acta Horticulturae 658: I International Symposium on Rootstocks for Deciduous Fruit Tree Species*. 2004. ISHS 535-540.
88. SÎRBU, N. Organizarea bazei tehnico-materiale a pepinierilor pomicele. În: *Realizări și perspective în horticultură, viticultură, vinificație și silvicultură*". Chișinău, 2007, Vol. 15 (1), pp. 138 - 141. ISBN 978-9975-946-31-5.
89. SZEKELY-VARGA, Z., KENTELKY, E., CANTOR, M., Effect of gibberellic acid on the seed germination of *Lavandula angustifolia* Mill. În: *Romanian Journal of Horticulture*. V.2, 2021, Bucharest, pp.169 - 177. ISSN -L-2734-7656.
90. TABĂRĂ, M. Dezvoltarea și multiplicarea micriclonală a speciei *Lycium Barbarum* L. (Goji). Tz. de doct. în șt. biologice. Chisinau, 2020, p.156.
91. TANZIMAN, A., REZAUL, K., REZAUL, M., RAFIUL, I., MONZUR, H. Callus induction and shoot regeneration in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). În: *International Journal of Biosciences (IJB)*. Vol. 2, No. 10(1), 2012, pp. 93 – 100. ISSN: 2220-6655.
92. TOMA, R., DANIAL, G. In vitro morphogenetic response of apple (*Malus domestica*) and pear (*Pyrus communis* L) to the elevated levels of copper and mio- inositol. În: *Acta Agrobotanica*. Vol. 65(3). pp. 43 - 48, 2012. [citat 20.04.24]. Journal ISSN:2300-357X (online), 0065-0951 (print; ceased since 2016).
93. URSU, A. Problemele utilizării solurilor în pomicultură și viticultură. În: *Realizări și perspective în horticultură, viticultură, vinificație și silvicultură*. Chișinău, 2007, Vol. 15 (1), pp. 12 - 15. ISBN 978-9975-946-31-5.
94. VINTER, M, etc. Micropropagation of rootstocks of stone fruit cultures in vitro. *BIO Web of Conferences* 25. 05001 (2020). <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202505001>.
95. VENIG, A. Stabilirea densității optime de plantare în pepinieră la specia piersic la S.C.D.P. Bihor. În: *Realizări și perspective în horticultură, viticultură, vinificație și silvicultură*". Chișinău, 2007, Vol. 15 (1), pp. 148 - 151. ISBN 978-9975-946-31-5.
96. WEBSTER, A. Temperate fruit tree rootstock propagation. În: *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 23:4. pp. 355 - 372, 2010. DOI: 10.1080/01140671.1995.9513912.
97. ZEMCIC, E., RAPCEA, M., COLIBABA, N. et al. Producerea materialului săditor pomicol cu un potențial biologic sporit. În: *Cercetări în Pomicultura/Institut de Cercetări pentru Pomicultura*. Vol.3, Chisinau, 2004, pp. 181 - 185. ISBN 9975-62-111-2.
98. ZIV, M., *Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants*. În: *Micropropagation*, Kluwer Academic Publishers. 1991, pp. 45 - 69. [citat 16.03.24]. Disponibil: http://dx.doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_4.

99. АЛЕКСЕЕНКО, Л., ВЫСОЦКИЙ, В. Влияние спектрального состава света на процесс ризогенеза у эксплантов земляники нейтральнодневных и ремонтантных сортов. В: Плодоводство и ягодоводство России. Сб. науч. тр. Т. 7, Москва, 2000, с.73-81.
100. АЛЬШЕВЦЕВА, Л. Роль среды и регуляторов роста при микроклональном размножении черной смородины. В: Сб. тр. ВНИИ Мичурина. Мичуринск, 1989. с.25-31.
101. АНДРУСЕВИЧ, М. Развитие корневой системы деревьев яблони на клоновых подвоях в зависимости от почвенных условий: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. с.-х. наук. БелНИИ Плодоводства. Самохваловичи, 2001, с. 21.
102. АНДРУСЕЕВИЧ, М. Корневая система деревьев яблони на клоновом подвое ММ 106 в различных экологических точках. В: Известия Академии аграрных наук Р. Беларусь. N 3, 2000 г, с. 40 - 43. ISSN 0321-1657.
103. АСАДУЛАЕВ, З. Экологические и экономические основы интенсивной технологии выращивания клоновых подвоев и саженцев яблони, груши и айвы в условиях Дагестана.: автореф. док. биол. наук. Махачкала, 2003, с. 52. [citat 25.02.2024]. Disponibil: <https://www.dissercat.com/content/ekologicheskie-i-ekonomicheskie-osnovy-intensivnoi-tehnologii-vyrashchivaniya-klonovykh-pod/read>.
104. БАРТИШ, И. Микроклональное размножение груши (*Pyrus communis*) *in vitro*. В: Физиология и биохимия культурных растений. 1994, (1), с. 84 – 90.
105. БЕЛЯКОВА, Л. др. Влияние некоторых факторов культивирования на развитие эксплантов земляники в процессе клонального микроразмножения. В: Садоводство и виноградарство. 2010 (2), с. 23 - 27.
106. БЕСЕДИНА, Е., БУНЦЕВИЧ, Л. Усовершенствование технологии микроклонального размножения подвоев яблони на этапе введения в культуру. 2015. [citat 16.03.24]. Disponibil: <https://cyberleninka.ru/article/n/usovershenstvovaniya-tehnologii-klonalnogo-mikrorazmnozheniya-podvoev-yabloni-na-etape-vvedeniya-v-kulturu-in-vitro>.
107. БУНЦЕВИЧ, Л. и др. Разработка составов питательных сред для интродукции в культуру *in vitro* эксплантов сортов малины и крыжовника. В: Плодоводство и виноградарство России. 28(4), 2014, с. 46 - 55. eISSN: 2219-5335.
108. БРАТКОВА, Л. и др. Введение в культуру *in vitro* меристемных эксплантов яблони разного генетического происхождения. В: Сельскохозяйственный журнал. N1 (13), 2020, с. 12 - 17. ISSN 0372-3054.
109. 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.

110. БУТЕНКО, Р. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. Наука. Москва, 1964, с. 272.
111. ВЕРЗИЛИН, А. Оздоровление и клональное микроразмножение слаборослых подвоев яблони: монография. Мичуринск: МГПИ, 2007, с. 146. ISBN 5929803013, 9785929803017.
112. ВЕРЗИЛИН, А. Особенности клонального микроразмножения новых сортов земляники садовой. Роль сорта в современном садоводстве. Мичуринск, 2019, с. 45 - 50.
113. ВЕРЖУК, В. и др. Разработка методов криосохранения генетических ресурсов растений плодовых и ягодных культур. В: Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2009, Т.166, с. 353 - 357.
114. ВЕХОВ, Ю. Оптимизация технологии размножения клоновых и семенных подвоев и подбор сорто-подвойных комбинаций плодовых культур для интенсификации садоводства Центрального района России: автореф. дис. д-ра с.-х. наук. Мичуринск, 2005, с. 23 – 25. [citat 15.01.24]. Disponibil: <https://www.dissercat.com/content/optimizatsiya-tekhnologii-razmnozheniya-klonovykh-i-semennykh-podvov-i-podbor-sorto-podvoin>.
115. ГАДЖИЕВ, С. Клоновые подвои груши; Актуальные проблемы освоения достижений науки в промышленном плодоводстве: материалы Междунар. науч.-практ. конф. Самохваловичи, 21 - 22 авг, 2002 г, Минск, с. 69 - 71.
116. ДЕМИДЧИК, В. и др. Микрклональное размножение растений. В: Наука и инновации (6). 2019, с. 4 -11. [citat 19.03.24]. ISSN 1818-9857, ISSN 2412-9372 (on line).
117. ДЖИГАДЛО, Е., ДЖИГАДЛО, М. Микрклональное размножение сортов и подвоев вишни. Инстит. Плод. Наук. Самохваловичи, 2005, Т. 17, ч. 2, с. 200 - 204.
118. ДЖОНС, О. Размножение хозяйственно важных древесных растений *in vitro*. В: Биотехнология с/х растений. Москва, Агропромиздат, 1987, с. 301.
119. ДИТЧЕНКО, Т. Культуры растительных клеток. Уч.-метод. пособие. Минск. 2018. [citat 16.03.24]. Disponibil: <https://elib.bsu.by/bitstream/123456789/206838/1/ditchenko.pdf>.
120. ДИТЧЕНКО, Т. Культура клеток, тканей и органов растений: курс лекций. [citat 10.01.24]. Disponibil: http://www.bio.bsu.by/fbr/files/kurs_lectures_plant_cell_culture.pdf.
121. ДОЛМАТОВ, Е. и др. Предварительные результаты селекции груши с моногенной детерминированной карликовостью. В: Генетика, Селекция и Сортоизучение. N2, 2010. с.7-8. [citat 10.01.24]. Disponibil: http://base.dnsgb.com.ua/files/journal/sov_sad/2010_02/2010_02_007-008.pdf.
122. ДОЛМАТОВ, Е. Хозяйственно-биологические особенности форм айвы обыкновенной селекции ВНИИСПК в качестве подвоев для груши. В: Селекция и сорторазведение плодовых культур. Т.5, 2018, с. 20 – 25. ISSN 2500-0454.

123. ДОЛМАТОВ, Е. Оценка морозостойкости корневой системы айвы обыкновенной селекции ФГБНУ ВНИИСПК методом искусственного промораживания. В: Современное садоводство. N.1, 2016. ISSN: 2312-6701 (online).
124. ДОЛГИХ, С. Размножение и выращивание яблони в коренсобственной культуре. В: Садоводство и виноградарство. 2004(5), с.14 -17.
125. ДЕМЕНКО, В. Укоренение – ключевой этап размножения растений *in vitro*. В: Изв. ТСХА. 2010, Вып. 1, с. 73 - 84.
126. ДОСПЕХОВ, Б. Методика полевого опыта. Агропромиздат, Москва, 1985, с. 351.
127. ДРАБУДЬКО, Н. и др. Клоновые подвои - основа повышения продуктивности насаждений плодовых культур. В: Плодоводство. Т. 30, 2018, с. 247 - 257. ISSN 0134-9759 (Print).
128. ДУШУТИНА, К. Селекция груши. Кишинёв, 1979, с. 195.
129. ЕГОРОВ, Е. Экономика отрасли садоводства и отраслевые экономические исследования. В: Плодоводство и ягодоводство России. Москва, 2004, 16 с. ISSN 2073-4948 (Print).
130. ЗМУШКО, А. Адаптация методики окрашивания тканей яблони в целях цитологического изучения генетической изменчивости клоновых подвоев. В: Плодоводство. Т. 18, ч. 2, Самохваловичи, 2006, с. 138 - 145.
131. ИСАЕВ, Р. и др. Основные проблемы возделывания груши в ЦЧР. В: Достижения науки и техники АПК. 2009 (2), с. 29 - 31.
132. КАБЫЛБЕКОВА, Б. и др. Оптимизация клонирования *in vitro* различных генотипов яблони. В: Experimental Biology. N.3(80), 2019, с. 48 - 57. ISSN 1563-0218. eISSN 2617-7498.
133. КАЛИНИН, Ф., САРНАЦКАЯ, В., ПОЛИЩУК, В. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Ин-т физиологии растений. Киев: Наук. думка, 1980, 488 с.
134. КАЛИНИН, Ф., КУШНИР, Г., САРНАЦКАЯ, В. Технология микрклонального размножения растений. Киев: Наукова Думка, 1992, 232 с.
135. КАПЛИН, Е. Пути повышения продуктивности маточников клоновых подвоев яблони с использованием горизонтально ориентированных растений и органического субстрата: автореф. диссерт. на соиск. уч. ст.канд. с/х наук. Мичуринск, 2007, с. 23. [citat 10.01.24]. Disponibil:<https://www.dissercat.com/content/puti-povysheniya-produktivnosti-matochnikov-klonovykh-podvoev-yabloni-s-ispolzovaniem-gorizo/read>.

136. КАТАЕВА, Н., БУТЕНКО, Р. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983, 232 с.
137. Клональное микроразмножение растений, учебно-методическое пособие. Казанский федеральный университет. Казань, 2012, с. 56. [citat 05.01.2024]. Disponibil: <https://kpfu.ru/portal/docs/F842595683/KLONALNOE.MIKRORAZMNOZhENIE.pdf>.
138. КОВАЛЕНКО, Г. Размножение In Vitro интродуцированных сортов смородины. В: Realizări și perspective în horticultură, viticultură, vinificație și silvicultură”. Chișinău, 2007, Vol. 15 (1) pp. 135 - 138. ISBN 978-9975-946-31-5.
139. КОЛБАНОВА, Е. Подбор минерального и гормонального состава питательной среды для культивирования сортов крыжовника в культуре in vitro. В: Плодоводство: науч. тр.- Самохваловичи, 2013, Т. 25, с. 284 - 294, ISSN 0134-9759 (Print).
140. КОЛБАНОВА, Е., КУХАРЧИК, Н. Методика размножения смородины черной in vitro. В: Плодоводство. Сб.науч.ст. Инст-т плодов-ва нац. акад-ии наук Беларуси. Самохваловичи, т. 2, ч. 2, 2006. ISSN 0134-9759 (Print).
141. **КОЛИБАБА, Н.** Культивирование перспективного подвоя для груши и айвы на этапе введения в культуру in vitro. В: Cercetări în Pomicultura/ Institut de Cercetări pentru Pomicultura: Vol.5, Chisinău, 2006, pp. 243 – 246. ISBN 978-9975-62-138-0.
142. **КОЛИБАБА, Н., ЧЕРНЕЦ, А.** Зависимость между содержанием ауксина в питательной среде и процентом приживаемости микрорастений подвоя ММ 106 в нестерильных условиях. В: Lucrări șt. vol.15 (1), Mat. Simpoz. Șt. Intern. ”Realizări și perspective în horticultură, viticultură, vinificație și silvicultură”. UASM. Chișinău, 2007, pp. 132 – 134. ISBN 978-9975-946-31-5.
143. **КОЛИБАБА, Н., ЧЕРНЕЦ, А.** Микроразмножение безвирусного подвоя яблони ММ 106. В: Cercetări în Pomicultura/Institut de Cercetări pentru Pomicultura: Vol.3, pp.191 - 197, Chisinău, 2004, ISBN 9975-62-111-2.
144. **КОЛИБАБА, Н.** Предварительные результаты клонального микроразмножения подвоев семечковых культур на этапе пролиферации. В: Lucr. Șt./ UASM. Vol 14 „Realizări și perspective în horticultură, viticultură și silvicultură”. Chișinău, 2005, стр.58 - 61, ISBN 9975-64-061-3.
145. **КОЛИБАБА, Н.** Особенности введения в культуру in vitro клоновых подвоев яблони. В: Agricultura Moldovei. № 3, 2009, с. 15 – 17. ISSN 0582 5229.
146. **КОЛИБАБА, Н.** Размножение клонового подвоя Sydo на искусственных питательных средах. В: Agricultura Moldovei. № 4 - 5, 2009, с. 16 – 18. ISSN 0582 5229.

147. **КОЛИБАБА, Н.** Оптимизация этапов клонального размножения подвоя персика GF 677: UASM. Vol 24. В: Horticultura modernă - realizări și perspective. Chișinău, 2010, стр. 43 - 46. ISBN 978-9975-64-191-3.
148. **КОВАЛЕНКО, Г., ГЕНДОВ, Н.** Сохранение генофонда клоновых подвоев косточковых пород методами биотехнологии. В: Pomicultura, viticultura, vinificatia. 2016, № 3 (63), с. 10 – 11. ISSN 1857-3142.
149. **КОРБИНЕЦ, П.** Микрклональное размножение перспективных клоновых подвоев груши. В: Плодоводство. Т.29, 2017, с. 54 - 58. ISSN 0134-9759 (Print).
150. **КТУРОВСКАЯ, Н.** Регулирование процесса ризогенеза при микроразмножении яблони / Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и цветоводстве. Мичуринск, 1989, с. 8 - 13.
151. **КОРНАЦКИЙ, С.** Особенности клонального микроразмножения сливы в системе производства оздоровленного посадочного материала: автореферат дис. кандидата с/х наук. Москва, 1991, с. 24.
152. **КРАСИНСКАЯ, Т.** Стабилизация эксплантов сортов вишни в культуре *in vitro*. В: Плодоводство. Т.29, 2017, с. 88 - 92. ISSN 0134-9759 (Print).
153. **КРАСИНСКАЯ, Т., КУХАРЧИК, Н.** Адаптационный процесс растений-регенерантов, выращенных в культуре *in vitro* в условиях *ex vitro* и способы его улучшения. В: Плодоводство. Т. 22, 2010, с. 309 - 320. ISSN 0134-9759.
154. **КРИЦКАЯ, Т., КАШИН, А.** Использование методов культуры *In vitro* для сохранения некоторых редких и исчезающих кальцефитных видов растений саратовской области. В: Химия, Биология, Экология. Т.13 (4), 2013, с. 65 - 72. [citat 08.02.2024]. ISSN 1816-9775 (Print), ISSN 2541-8971 (Online).
155. **КРИЦКАЯ Т., КАШИН А.** Использование методов культуры *In vitro* для сохранения некоторых редких и исчезающих кальцефитных видов растений саратовской области. В: Химия, Биология, Экология., Т.13 (4), 2013, с. 65 - 72. [citat 25.03.2024]. ISSN 1816-9775 (Print), ISSN 2541-8971 (Online).
156. **КРУЖКОВ, А. и др.** Оценка силы роста генотипов груши и вишни. В: Современное садоводство. 2023 (4), с. 80 - 89. [citat 19.03.2024]. ISSN: 2312-6701 (online).
157. **КУРБАНИЯЗОВА, Г.** Особенности состава питательных сред для культивирования в условиях *in vitro* однодольных видов растений. В: Химия и биология 3(93), 2022. ISSN:2311-5459.
158. **Культуры эукариотических клеток.** Электронный учебно-методический комплекс по учебной дисциплине. 2016, с.75. [citat 08.03.24]. Disponibil:

<https://elib.bsu.by/bitstream/123456789/172028/1/%D0%A3%D0%9C%D0%9A%20%D0%9A%D1%83>.

159. ЛЕБЕДЕВ, А. Оптимизация условий клонального микроразмножения, В: Биотехнология растений. N 1(7), 2016. с. 61 - 64.

160. ЛЕБЕДЕВ, В. Адаптация растений, полученных *in vitro* к нестерильным условиям. В: Известия ТСХА (1). 2011, с. 60 - 70. [citat 12.02.2024]. ISSN 0021-342X (Print). Disponibil: <https://cyberleninka.ru/article/n/adaptatsiya-rasteniy-poluchennyh-in-vitro-k-nesterilnym-usloviyam/viewer>.

161. ЛЕОНТЬЕВ-ОРЛОВ, О. Разработка клонального микроразмножения яблони: автореф. дис. канд. с/х наук. Москва, 1988, с. 24.

162. ЛЕОНТЬЕВ-ОРЛОВ, О. Особенности культивирования изолированных апексов яблони, В: Плодоводство в Нечерноземной полосе: сб. науч. тр. НИЗИСНП. 1988, с. 21-30.

163. ЛОБОДИНА, Е., СУПРУН, И. Влияние компонентного состава питательных сред при введении в культуру *in vitro* эксплантов яблони сортов Прикубанское и Кубанское Багряное. В: Садоводство и виноградарство. N5, 2020. [citat 10.01.24]. ISSN 0235-2591 (Print). Disponibil: <https://doi.org/10.31676/0235-2591-2020-5-18-23>.

164. ЛОМОВСКАЯ, Л. Особенности размножения перспективных форм груши в культуре *in vitro*. В: Селекция и сортовая агротехника плодовых культур: сб. науч. тр. Орёл, 2004. с. 113. [citat 11.01.24]. ISSN 0235-2591 (Print). Disponibil: <https://doi.org/10.31676/0235-2591-2020-5-18-23>.

165. МАСЮКОВА, О., БУКАРЧУК, В. Методы исследования плодовых растений при изучении и выведении сортов. Кишинёв, 2005, 44 с. ISBN 9975-62-144-9.

166. МАТУШКИНА, О., ПРОНИНА, И. Технологические аспекты размножения земляники *in vitro*. В: Селекция и сорторазведение садовых культур. Т.6, N 1, 2016, с.74 - 77. ISSN 2500-0454.

167. МАТУШКИНА, О., ПРОНИНА, И. Размножение яблони и груши *in vitro*. В: Достижения науки и техники АПК. N 2, 2009, с. 15 - 17.

168. МАТУШКИНА, О. Витрификация побегов *in vitro*: анатомическое строение и возможные пути решения проблемы. В: Достижения науки и техники АПК. 2012 (9), с. 58 - 60. ISSN 0235-2451.

169. МАТУШКИНА, О. и др. Технология клонального микроразмножения яблони и груши на основе использования новых питательных сред. В: Сборник научных трудов ГНБС. Т. 144, 2017, Ч.2, с.77 - 81. ISSN 0201-7997.

170. МАТУШКИНА, О. Влияние комплексных минеральных веществ на морфогенез яблони и груши *in vitro*. В: Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ. Москва, 2014, т. 38, ч. 2, с. 13 - 19. ISSN 2073-4948 (Print).
171. МАТУШКИНА, О. Оптимизация процессов регенерации при размножении клоновых подвоев и сортов яблони и груши *in vitro*: автореф. кандид с/х наук. Мичуринск, 2008, с.23. [цитат 20.03.24]. Disponibil:<https://www.dissercat.com/content/optimizatsiya-protsessov-regeneratsii-pri-razmnozhenii-klonovykh-podvov-i-sortov-yabloni-i->
172. МАТУШКТНА, О. Технология клонального микроразмножения яблони и груши. Методические рекомендации. Мичуринск – наукоград РФ. 2008. 35 с.
173. МАТУШКТНА, О., ПРОНИНА, И. Технология беспересадочного культивирования яблони и груши *in vitro*. [цитат 12.02.2024]. Disponibil: <https://cyberleninka.ru/article/n/tehnologiya-besperesadochnogo-kultivirovaniya-yabloni-i-grushi-in-vitro/viewer>.
174. МИНАЕВ, В. Биологические особенности слаборослых клоновых подвоев яблони при клональном микроразмножении: автореф. соиск. уч. ст. кандид. с/х наук, Мичуринск, 2005. с.
175. МИНАЕВ, В. и др. Особенности клонального микроразмножения слаборослых клоновых подвоев яблони на этапе пролиферации. ВСТИСП. Москва, 2002, с. 72 - 75. ISBN 5-902178-03-7.
176. МИЦНЕВА, О., ТАШМАТОВА, Л. Клональное микроразмножение земляники – перспективный метод современного питомниководства (обзор). В: Современное садоводство. 2019 (4), с. 113 - 119. ISSN: 2312-6701 (online).
177. МЫНДРА, В., ЧЕРНЕЦ, А., КОЖОХАРЕНКО, В. Совершенствование подвоев черешни – путь интенсификации культуры. В: Horticultură, Viticultură și vinificație, Silvicultură și grădini publice, Protecția plantelor: Simp. Șt. Intern. 2010, Vol. 24 (1), pp. 31 - 34. ISBN 978-9975-64-191-3.
178. МЫНДРА, В., КУКУ, Г., КОЖОХАРЕНКО, В. Импеданс прикамбиальных тканей как индикатор адаптивности и аффинитета растений в плодовом питомнике. In: Genetica, fiziologia și ameliorarea plantelor: conferință științifică internațională. Chișinău, 2017, Ediția 6, pp. 320 - 323. ISBN 978-9975-56-463-2.
179. НИКИТИНА, А. Совершенствование технологий размножения подвоев яблони клональным микроразмножением и зелёным черенкованием в среднем Предуралье: автореф. дисс. на соис. уч. степ. канд. с/х наук. Махачкала, 2023, с 22. [цитат 12.02.24].

Disponibil: <https://www.dissercat.com/content/sovershenstvovanie-tehnologii-razmnozheniya-podvov-yabloni-klonalnym-mikrorazmnozheniem/read>.

180. ПЛАКСИНА, Т., ВОРОХОБОВА, Л. Особенности клоального микроразмножения малины красной (*Rubus Idaeus L.*). В: Садоводство и виноградарство (5). 2017, с. 39 - 43. DOI: 10.8454 NSTISP.2017.5.7589.

181. ПОЛУБЯТКО, И., КОЗЛОВСКАЯ, З. Роль подвоя в реализации потенциала сорта. В: Плодоводство. Белоруссия, 2016, 28(1), с. 404 - 424. ISSN 0134-9759.

182. ПОЛЯКОВА, Н. Выращивание в питомнике колоновидных форм яблони. В: Плодоводство и ягодоводство России. 2007, Т18, с. 286 - 291. ISSN 2073-4948 (Print).

183. ПРОНИНА, И. Клоальное микроразмножение в системе производства оздоровленного посадочного материала клоновых подвоев груши. В: Достижения науки и техники АПК. 2014(5), с. 27 - 29. ISSN: 0235-2451.

184. ПРОНИНА, И. Оптимизация процесса ризогенеза подвоев и сортов яблони и груши *in vitro*: автореф. канд. с/х. наук, Мичуринск. 2008, с. 23. [citat 13.02.24]. Disponibil: <https://www.dissercat.com/content/optimizatsiya-protsesta-rizogeneza-podvov-i-sortov-yabloni-i-grushi-vitro/read>.

185. ПРОДАНЮК, Л. Вирус ямчатости древесины яблони в системе сертификации посадочного материала плодовых культур. Кишинёв, 2021, с.144. ISBN 978-9975-56-886-9.

186. 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. В: Пром. произв-во оздоровл. посад. матер. плодовых, ягодных и цветочно-декор-х культур. Москва, 2001, с. 36 - 40.

187. РАПЧА, М., КОЛИБАБА, Н. Использование метода культуры тканей при размножении клонового подвоя ВВА -1. В: Cercetări în Pomicultură. /Institutul de Cercetări pentru Pomicultura. Volumul 6, Chişinău, 2007, с. 251 - 255. ISBN 978-975-62-198-4.

188. РЯГО, Н., ТАШМАТОВА, Л. Влияние состава питательных сред на приживаемость эксплантов смородины красной на этапе введения в культуру *in vitro*. В: Селекция и сорторазведение садовых культур. Т.9. N1, 2022, с. 90 - 95. ISSN 2500-0454.

189. САМУСЬ, В. и др. Методика микроразмножения подвоев яблони *in vitro*. В: Методическое обеспечение устойчивого развития современного плодоводства: материалы междунар. науч. конф. Самохваловичи, 2006. Т. 18, ч. 2. с. 147 – 157.

190. СЕРДЮК, О. Микроклональное размножение плодовых и ягодных культур как основа ведения современного прибыльного садоводства. [citat 10.03.24].

Disponibil:<http://asprus.ru/blog/mikroklonalnoe-razmnozhenie-plodovyh-i-yagodnyh-kultur-kak-osnova-vedeniya-sovremennogo-pribylnogo-sadovodstva/> .

191. СИБИРЯТКИН, С. Некоторые аспекты ввода в культуру *in vitro* новых клоновых подвоев для косточковых культур. В: Научн. ж. КубГАУ. [citat 08.03.2024]. Disponibil: <https://cyberleninka.ru/article/n/nekotorye-aspekty-vvoda-v-kulturu-in-vitro-novyh-klonovyh-podvoev-dlya-kostochkovyh-kultur/viewer> .

192. СКОВОРОДНИКОВ, Д. Совершенствование микроклонального размножения крыжовника. В: Вестник Орёл ГАУ №6 (12), с. 24 - 27. [citat 09.03.2024]. Disponibil: <https://cyberleninka.ru/article/n/sovershenstvovanie-klonalnogo-mikrorazmnozheniya-kryzhovnika/viewer> .

193. САМУСЬ, В., СЕМЕНАС, С., КОНОПЛЕВА, А., Предварительные результаты инициации культуры *in vitro* районированных подвоев яблони. В: Плодоводство. Т.14, 2002, с. 22 - 28. ISSN 0134-9759.

194. СЕМЕНАС, С., ЗМУШКО, А., КУХАРЧИК Н. Технология производства оздоровленных клоновых подвоев яблони. В: Плодоводство. Т. 26, 2014, с. 64-78. ISSN 0134-9759 (Print).

195. СОЛОВЫХ, Н. Влияние антиоксидантов на эффективность введения в культуру *In vitro* красной малины., В: International Journal of Humanities and Natural Sciences. vol. 8-2 (83), 2023, pp. 17 - 20. [citat 20.03.24]. Disponibil: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-antioksidantov-na-effektivnost-vvedeniya-v-kulturu-invitro-krasnoy-maliny/viewer>.

196. СУЛЕЙМАНОВА, С. Микроклональное размножение плодовых культур. В: East European Scientific Journal. N 11, 2016, pp. 48 - 53. [citat 22.03.24]. Disponibil: <https://cyberleninka.ru/article/n/mikroklonalnoe-razmnozhenie-plodovyh-kultur-obzor/viewer>.

197. ТАНКЕВИЧ, В., СОТНИК, А. Изучение клоновых подвоев для груши в отводочном маточнике в Крыму. В: Агрономия. 23 (186), 2020, с. 5 - 13. ISSN: 2413-1946.

198. ТАТАРИНОВ, А., ЗУЕВ, В. Питомник плодовых и ягодных культур. Москва, Россельхозиздат, 1984, с. 46 - 50.

199. ТАШМАТОВА, Л., МАЦНЕВА, О. Клональное микроразмножение сортов яблони геном VF. В: Садоводство. 2019, №4, с. 127 - 134, [citat 24.03.24]. ISSN: 2312-6701 (online). DOI:10.24411/2312-6701-2019-10413.

200. ТАШМАТОВА, Л. Укоренение и адаптация груши в условиях *in vitro*. В: Современное садоводство. электронный журнал. 1, 2013. [citat 29.03.24]. ISSN: 2312-6701 (online).

201. Типовые технологические карты возделывания плодовых культур в Молдавской ССР. Кишинёв, Картя молдовеняскэ, 1984, с. 250.
202. ТИХОМИРОВА, Л. Получение стерильной активно пролиферирующей культуры ириса в условиях *in vitro*. В: Достижения науки и техники АПК. N 8, 2010, с. 37 - 39.
203. ТОНКИХ, Д. Некоторые результаты селекции груши в РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева на генетически детерминированный карликовый тип роста. В: Современное садоводство. [citat 10.03.2024]. ISSN: 2312-6701 (online).
<https://journal-vniispk.ru/pdf/2013/2/41.pdf>.
204. ТУРОВСКАЯ, Н. Особенности регенерации апикальной меристемы клоновых подвоев яблони. В: Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и цветоводстве: сб. науч. тр. Мичуринск, 1989, с. 13 – 17.
205. УХАТОВА, Ю., ГАВРИЛЕНКО, Т. Методы криоконсервации вегетативно размножаемых культурных растений. В: Биотехнология и селекция растений. N 1(1), 2018, с. 52 - 63. [citat 09.04.24]. ISSN 2658-6266 (Print). ISSN 2658-6258 (Online).
206. ЧЕРНЕЦ, А. Получение и микроклональное размножение безвирусных сортов и подвоев косточковых пород в условиях Молдовы: автореф. дис. на соиск. уч. степени д-ра биол. наук. Кишинёв, 1993. с.16.
207. ЧЕРНЕЦ, А., КАЛАШАН, Ю., **ГЕНДОВ, Н.** Динамика производства и реализации черенков семечковых пород с безвирусного маточно- черенкового сада категории База. В: Pomicultura, viticultura si vinificatia. 2016, № 2 (62), pp. 6 - 9, ISSN 1857-3142.
208. ЧЕРНЕЦ, А., **КОЛИБАБА, Н.** Доращивание вегетативных подвоев яблони, полученных из культуры ткани. В: Cercetări în Pomicultura. V.4, 2005, pp. 221 – 227. ISBN 9975-62-146-5.
209. ЧЕРНЕЦ, А., КАЛАШЯН, Н., **ГЕНДОВ, Н.** Микроразмножение *in vitro* подвоя персика *Adaptabil* в Молдове. В: Генетика, селекція, в сучасному агрокомплексі. 2019 року, Умань, 2019, с. 141-143.
210. ЧИВИЛЕВА, В. Термо и фотопериод в микроразмножении косточковых культур: автореф.соиск.уч.степ. кандидат. с/х наук. 2003, Москва, с. 139. [citat 22.03.24]. Disponibil: <https://www.dissercat.com/content/termo-i-fotoperiod-v-mikrorazmnozhenii-kostochkovykh-kultur>.
211. <https://agrobiznes.md/patrimoniul-pomicol-al-moldovei-care-este-suprafata-totala-a-livezilor-si-cantitatea-de-fructe-produsa.html>. [citat 22.03.24].
212. <https://microklon.ru/page/mikroklonalnoe-razmnozhenie-rastenij-2> . [citat 04.01.24].

213. <https://kpfu.ru/portal/docs/F842595683/KLONALNOE.MIKRORAZMNOZHENIE.pdf>. [citat 28.01.24].
214. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=41426390>. [citat 04.01.24].
215. https://www.researchgate.net/publication/230370738_Orchid_micropropagation_the_path_from_laboratory_to_commercialization_and_an_account_of_several_unappreciated_investigators. [citat 28.01.24].
216. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423885901128>. [citat 22.03.24].
217. <https://journals.narfu.ru/index.php/fj/article/view/1254>. [citat 28.01.24].
218. <https://cyberleninka.ru/article/n/uglevody-pitatelnoy-sredy-i-ih-vliyanie-na-rost-i-nakoplenie-fenolnyh-soedineniy-v-kallusnoy-kulture-chaynogo-rasteniya-camellia-sinensis-l/viewer>. [citat 21.02.24].
219. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=37109224>. [citat 18.01.24].
220. https://www.researchgate.net/publication/341515461_Darkening_of_plant_tissues_during_in_vitro_cultivation_and_methods_for_its_prevention_Potemnenie_rastitelnyh_tkanej_pri_kultivirovaniy_in_vitro_i_sposoby_ego_predotvrasheniya. [citat 21.02.24].
221. [https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/4630/InVitro/1.%20Acta%20Hort%20596%20414-418%20\(2002\)%20Pear.pdf](https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/4630/InVitro/1.%20Acta%20Hort%20596%20414-418%20(2002)%20Pear.pdf). [citat 23.02.24].
222. https://www.actahort.org/books/131/131_7.htm. [citat 28.01.24].
223. <https://www.plodovodstvo.com/jour/article/view/406>. [citat 22.03.24].
224. <https://www.dissercat.com/content/mikroklonalnoe-razmnozhenie-seleksionnykh-form-remontantnoi-maliny-s-ispolzovaniem-novykh-r/read>. [citat 23.02.24].
225. <https://new-disser.ru/avtoreferats/01005087616.pdf>. [citat 18.01.24].
226. <https://www.dissercat.com/content/povyshenie-effektivnosti-klonalnogo-mikrorazmnozheniya-podvoev-in-vitro>. [citat 12.02.24].
227. <https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-dlitelnogo-deponirovaniya-kultury-in-vitro-nekotoryh-redkih-i-ischezayuschih-vidov-rasteniy-saratovskoy-oblasti/viewer>. [citat 18.01.24].
228. <https://colostate.pressbooks.pub/clonalcryopreservation/chapter/reduced-temperature-storage-of-temperate-crops-in-tissue-culture/>. [citat 22.03.24].
229. <https://fruit.belal.by/jour/article/view/179/179>. [citat 22.03.24].
230. <https://cyberleninka.ru/article/n/adaptatsiya-rasteniy-poluchennyh-in-vitro-k-nesterilnym-usloviyam/viewer>. [citat 23.02.24].
231. <https://www.horticultorul.ro/pomi-fructiferi/portaltoii-parului/>. [citat 20.03.24].
232. <https://statistica.gov.md/ru/statistic-indicator-details/15>. [citat 21.02.24].
233. <https://ro.scribd.com/doc/80818122/Portaltoii-Pomilor-Fructiferi>. [citat 24.02.24].

234. <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-razlichnyh-istochnikov-uglevodnogo-pitaniya-na-rizogenez-mikrocherenkov-yagodnyh-kulturv-usloviyah-in-vitro>. [citat 20.03 .24].
235. <https://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/vol47/iss4/13/>. [citat 12.01.24]
236. <https://microklon.ru/page/ukorenenie-kljuchevoj-etap-razmnozhenija-rastenij-in-vitro>. [citat 18.01.24].
237. <https://cyberleninka.ru/article/n/sorbenty-fenolov-kak-komponenty-pitatelnoy-sredy-v-mikroklonalnom-razmnozhenii-rasteniy>. [citat 28.01.24].
238. https://www.researchgate.net/publication/287844408_Phloroglucinol_BAP_and_NAA_enhance_axillary_shoot_proliferation_and_other_growth_indicators_in_vitro_culture_of_damask_rose_Rosa_damascena_Mill. [citat 12.02.24].
239. <https://cyberleninka.ru/article/n/razmnozhenie-invitro-kak-odin-iz-perspektivnyh-sposobov-sohraneniya-vida-cotoneastermelanocarpus-fisch-ex-blytt>. [citat 12.02.24].
240. <https://fruit.belal.by/jour/article/view/61>. [citat 04.01.24].
241. <http://asprus.ru/blog/klonalnoe-mikrorazmnozhenie-zhimolosti-v-proizvodstvennyx-usloviyax/>. [citat 12.01.24].
242. <https://cyberleninka.ru/article/n/adaptatsiya-mikrorasteniy-maliny-rubus-l-i-sireni-syringa-l-k-nesterilnym-usloviyam/viewer>. [citat 11.02.24].
243. https://op.vlsu.ru/fileadmin/Programmy/Bacalavr_academ/06.03.01/Metod_doc/Ucheb_posob_KIR_060301_2016.pdf.pdf. [citat 20.03 .24].
244. <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-sostava-substrata-na-prizhivaemost-mikrorasteniy-vitis-vinifera-l-in-vivo/viewer>. [citat 21.03.24].
245. <https://research-journal.org/archive/10-52-2016-october/texnologicheskie-podxody-k-ispolzovaniyu-metoda-in-vitro-dlya-massovogo-proizvodstva-rastenij-kostochkovyx-kultur>. [citat 04.01.24].
246. <https://www.dissercat.com/content/biotekhnologicheskie-metody-v-sisteme-proizvodstva-ozdorovlennogo-posadochnogo-materiala-i-s/read>. [citat 25.03.24].
247. <https://gov.md/sites/default/files/document/attachments/sub-16.pdf>. [citat 04.01.24].
248. [https://dissertatsiya-sotnik-a.i.-15.06-so-spravkoi%20\(1\).pdf](https://dissertatsiya-sotnik-a.i.-15.06-so-spravkoi%20(1).pdf). [citat 11.02.24].
249. https://www.ishs.org/ishs-article/596_54. [citat 11.02.24].
250. https://www.actahort.org/books/800/800_94.htm. [citat 12.01.24].
251. <https://www.dissercat.com/content/induktsiya-morfogeneza-v-kulture-somaticeskikh-tkanei-slivy-domashnei-prunus-domestica-l>. [citat 28.03.24].
252. <https://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-020-02480-7>. [citat 02.04.24].

253. <https://core.ac.uk/download/pdf/144827889.pdf>. [citat 20.03.24].
254. <https://www.researchgate.net/publication/261714918> Effect of coconut water and growth regulator supplements on in vitro propagation of Corylus avellana L [citat 25.03.24].
255. <https://cyberleninka.ru/article/n/metodicheskie-osnovy-klonalnogo-mikrorazmnozheniya-nekotoryh-dekorativnyh-kultur/viewer>. [citat 17.02.24].
256. <https://static4.apub.kr/journalsite/sites/kjpr/2022-035-06/N0820350606/N0820350606.pdf>. [citat 01.04.24].
257. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423817301814> [citat 01.04.24].
258. <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/12538078.2010.10516227>. [citat 01.04.24].
259. <https://www.researchgate.net/publication/346458013> Optimization of the methods of lavender cell selection for resistance to low temperature stress. [citat 02.04.24].
260. <https://cyberleninka.ru/article/n/adaptatsiya-rasteniy-poluchennyh-in-vitro-k-nesterilnym-usloviyam/viewer>. [citat 18.12.23].
261. <https://cyberleninka.ru/article/n/adaptatsiya-rasteniy-poluchennyh-in-vitro-k-nesterilnym-usloviyam/viewer>. [citat 08.01.23].
262. <https://east-fruit.com/wp-content/uploads/2020/08/5c07d2a861e3c.pdf>. [citat 17.02.24].
263. <https://www.ishs.org/ishs-article/596> 54. [citat 17.02.24].
264. <https://ru.scribd.com/document/623262637/Pear-rootstocks-in-Europe-PDF-Free-Download>. [citat 12.01.24].
265. <https://www.mgau.ru/upload/iblock/46f/46f40f04f7ea866ae222ba47363c5dca.pdf>. [citat 11.02.24].

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Динамика развития эксплантов подвоев семечковых культур по фазам развития

Таблица П1.1. Особенности развития первичных эксплантов подвоя яблони ММ106 в зависимости от концентрации стимуляторов роста в питательной среде

Варианты:	Концентрация БАП: ИМК, мг/л	Состояние эксплантов по фазам развития (%) через 6 недель после введения:				Всего развивающихся эксплантов, %
		Эксплант без развития	Линейный рост, развитие 2-3 листочков	Розетка с листьями и зачатками почек	Конгломерат почек и побегов	
		1 фаза	2 фаза	3 фаза	4 фаза	
1	0,5 : 0	13,3	33,3	33,3	20,0	53,0
2	0,5 : 0,1	27,0	20,0	40,0	13,0	53,0
3	0,5 : 0,5	13,8	46,6	33,0	6,6	39,6
4	1,0 : 0	6,7	26,7	40,0	26,0	66,0
5	1,0 : 0*	6,7	20,0	53,3	20,0	73,3
6	1,0 : 0,1	6,7	26,7	33,3	33,3	66,6
7	1,0 : 0,5 (К)	6,7	26,6	46,7	20,0	66,7
8	1: 1	13,3	40,0	34,0	13,0	47,0
Средние значения по фазам, %		11,7	29,9	39,2	18,9	58,1
*- полная концентрация минеральных солей по MS К - контроль						

Таблица П1.2. Особенности развития первичных эксплантов подвоя яблони 54-118 в зависимости от концентрации стимуляторов роста в питательной среде

Варианты	Концентрация БАП: ИМК, мг/л	Состояние эксплантов по фазам развития (%) через 6 недель после введения:				Всего развивающихся эксплантов, %
		Эксплант без развития	Линейный рост, развитие 2-3 листочков	Розетка с листьями и зачатками почек	Конгломерат почек и побегов	
		1 фаза	2 фаза	3 фаза	4 фаза	
1	0,5 : 0	6,7	46,7	33,3	13,3	46,6
2	0,5 : 0,1	6,7	40,0	46,6	6,7	53,3
3	0,5 : 0,5	26,7	33,3	33,3	6,7	40,0
4	1,0 : 0	6,7	13,3	53,0	27,0	80,0
5	1,0 : 0*	13,3	40,0	33,4	13,3	46,7
6	1,0 : 0,1	13,3	20,0	46,6	20,0	66,6
7	1,0 : 0,5 (К)	6,7	40,0	33,3	20,0	53,3
8	1: 1	13,3	40,0	33,4	13,3	46,7
Средние значения по фазам, %		11,7	34,1	39,1	15,0	54,1
*- полная концентрация минеральных солей по MS К – контроль						

Таблица П1.3. Особенности развития первичных эксплантов подвоя Sydo в зависимости от концентрации стимуляторов роста в питательной среде

Варианты	Концентрация БАП: ИМК, мг/л	Состояние эксплантов по фазам развития (%) через 6 недель после введения:				Всего развивающихся эксплантов, %
		Эксплант без развития	Линейный рост, развитие 2-3 листочков	Розетка с листьями и зачатками почек	Конгломерат почек и побегов	
		1 фаза	2 фаза	3 фаза	4 фаза	
1	0,5 : 0	40	40	20	0	20
2	0,5 : 0,1	20	60	20	0	20
3	0,5 : 0,5	20	30	30	20	50
4	1,0 : 0	0	30	60	10	70
5	1,0 : 0*	10	40	30	20	50
6	1,0 : 0,1	10	30	20	40	60
7	1,0 : 0,5 (К)	10	30	40	20	60
8	1: 1	30	20	40	10	50
Средние значения по фазам, %		17,5	35,0	32,5	15,0	47,5
*- полная концентрация минеральных солей по MS К - контроль						

Таблица П1.4. Особенности развития первичных эксплантов подвоя груши *Pyrus* в зависимости от концентрации стимуляторов роста в питательной среде

Варианты	Концентрация БАП: ИМК, мг/л	Состояние эксплантов по фазам развития (%) через 6 недель после введения:				Всего развивающихся эксплантов, %
		Эксплант без развития	Линейный рост, развитие 2-3 листочков	Розетка с листьями и зачатками почек	Конгломерат почек и побегов	
		1 фаза	2 фаза	3 фаза	4 фаза	
1	0,5 : 0	70	30	0	0	0
2	0,5 : 0,1	70	30	0	0	0
3	0,5 : 0,5	60	40	0	0	0
4	1,0 : 0	30	50	20	0	20
5	1,0 : 0*	10	50	40	0	40
6	1,0 : 0,1	40	40	20	0	20
7	1,0 : 0,5 (К)	20	50	30	0	30
8	1: 1	30	60	10	0	10
Средние значения по фазам, %		41,2	43,7	15,0	0	15,0
*- полная концентрация солей по MS К - контроль						

Приложение 2. Методика микроклонального размножения для подвоев яблони и груши

Схема П2.1. Методика размножения подвоя яблони ММ106 в культуре *in vitro*

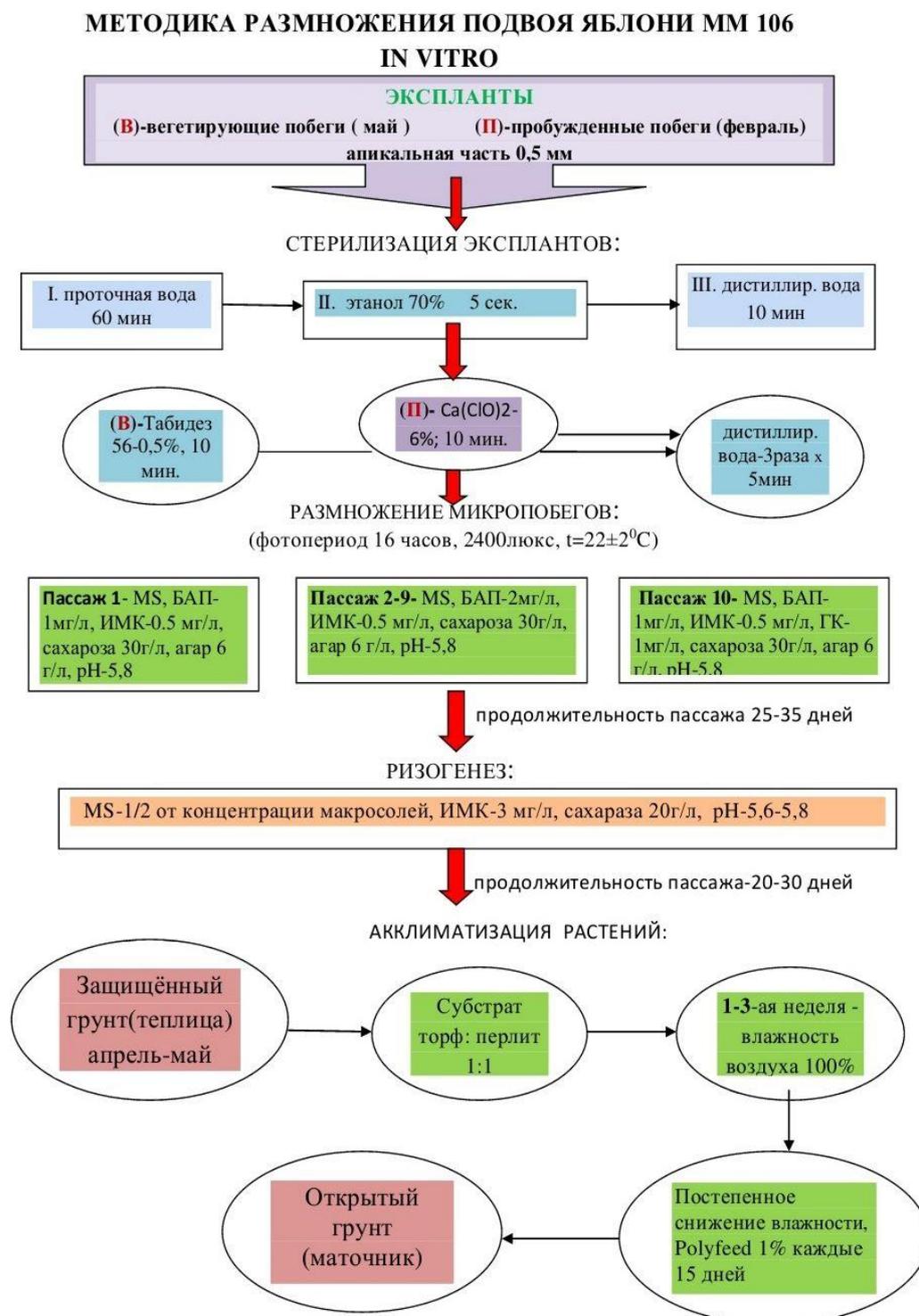


Схема П2.2. Методика размножения подвоя яблони 54-118 в культуре *in vitro*

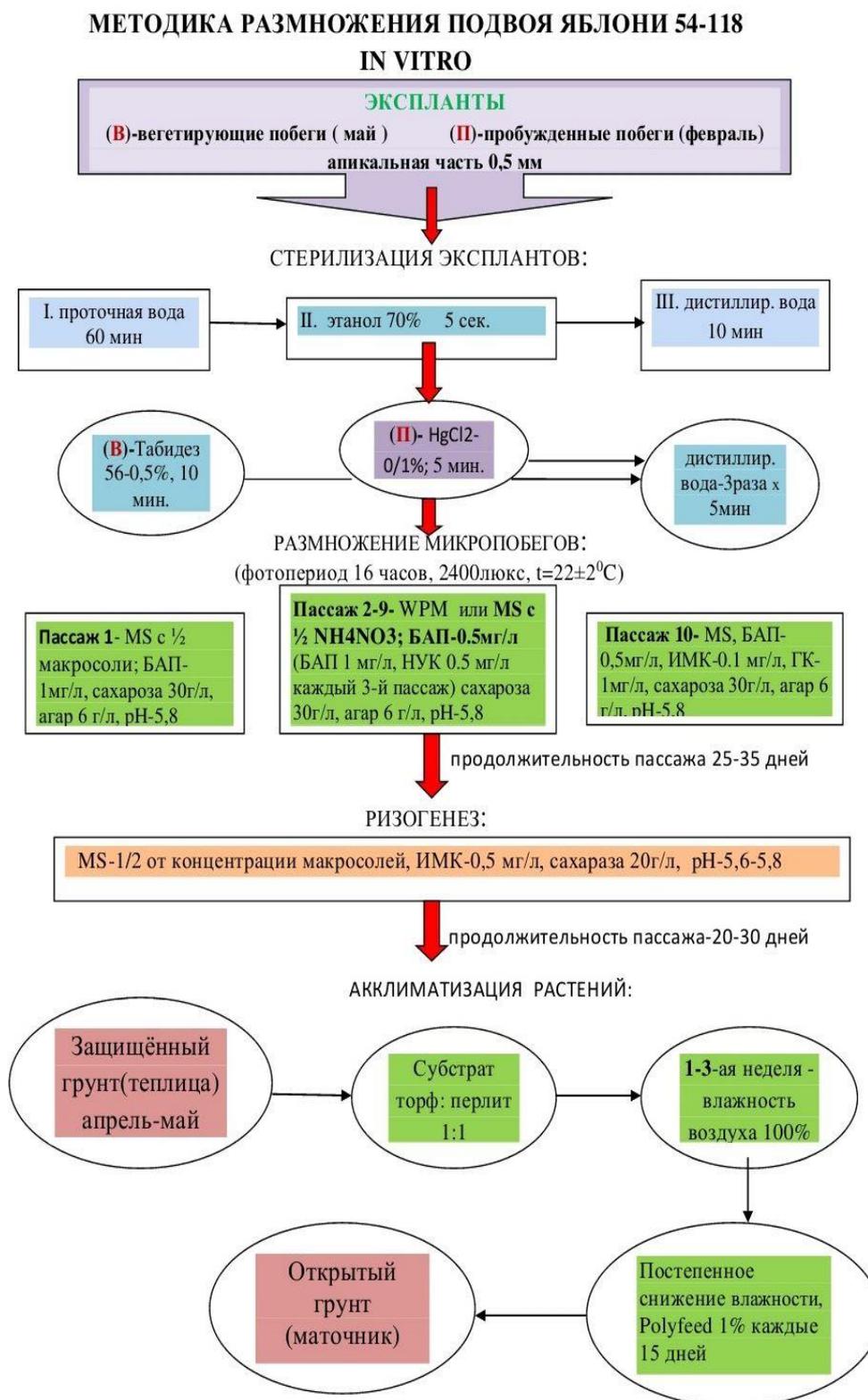


Схема П2.3. Методика размножения подвоя Sydo в культуре *in vitro*

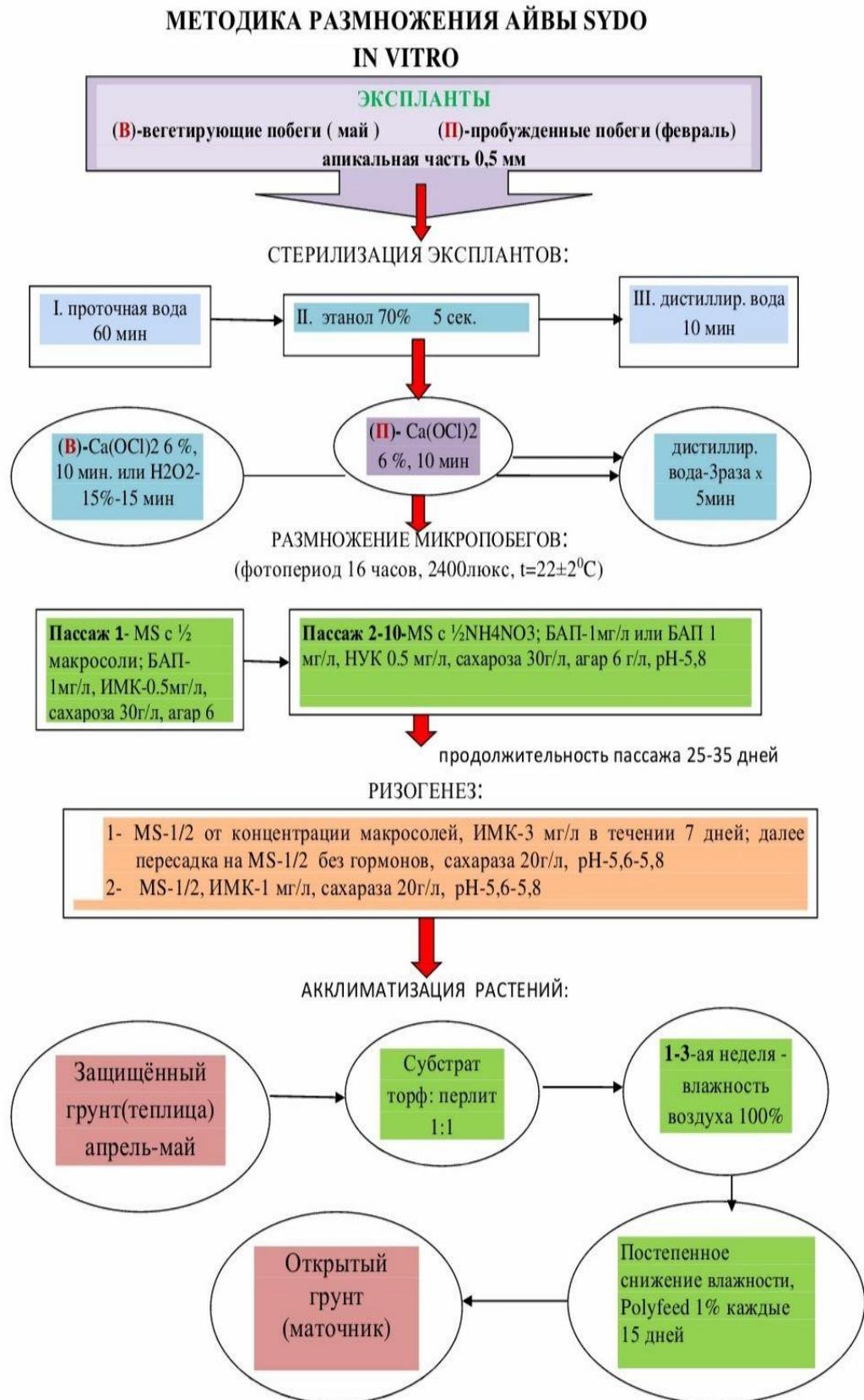
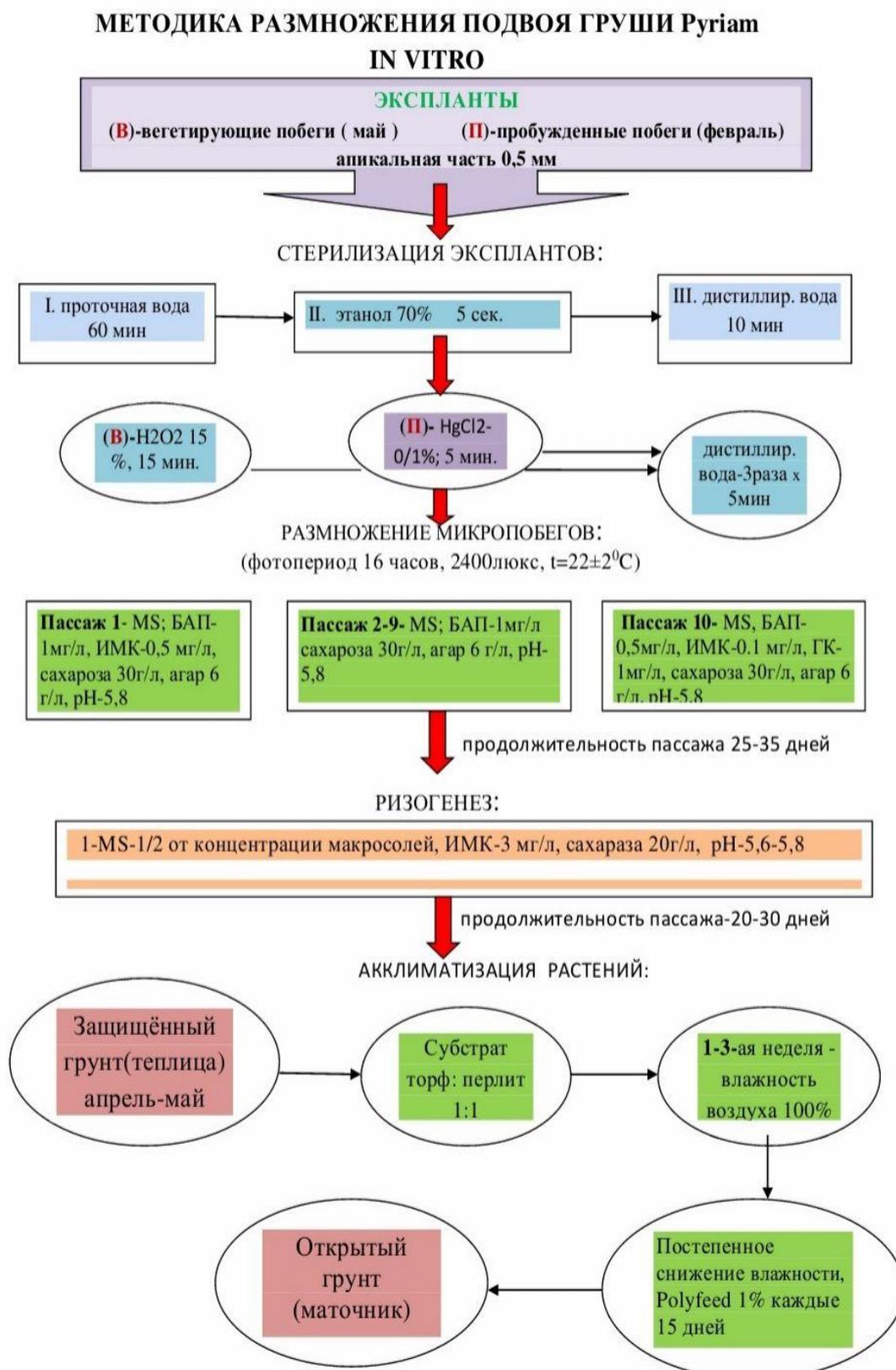
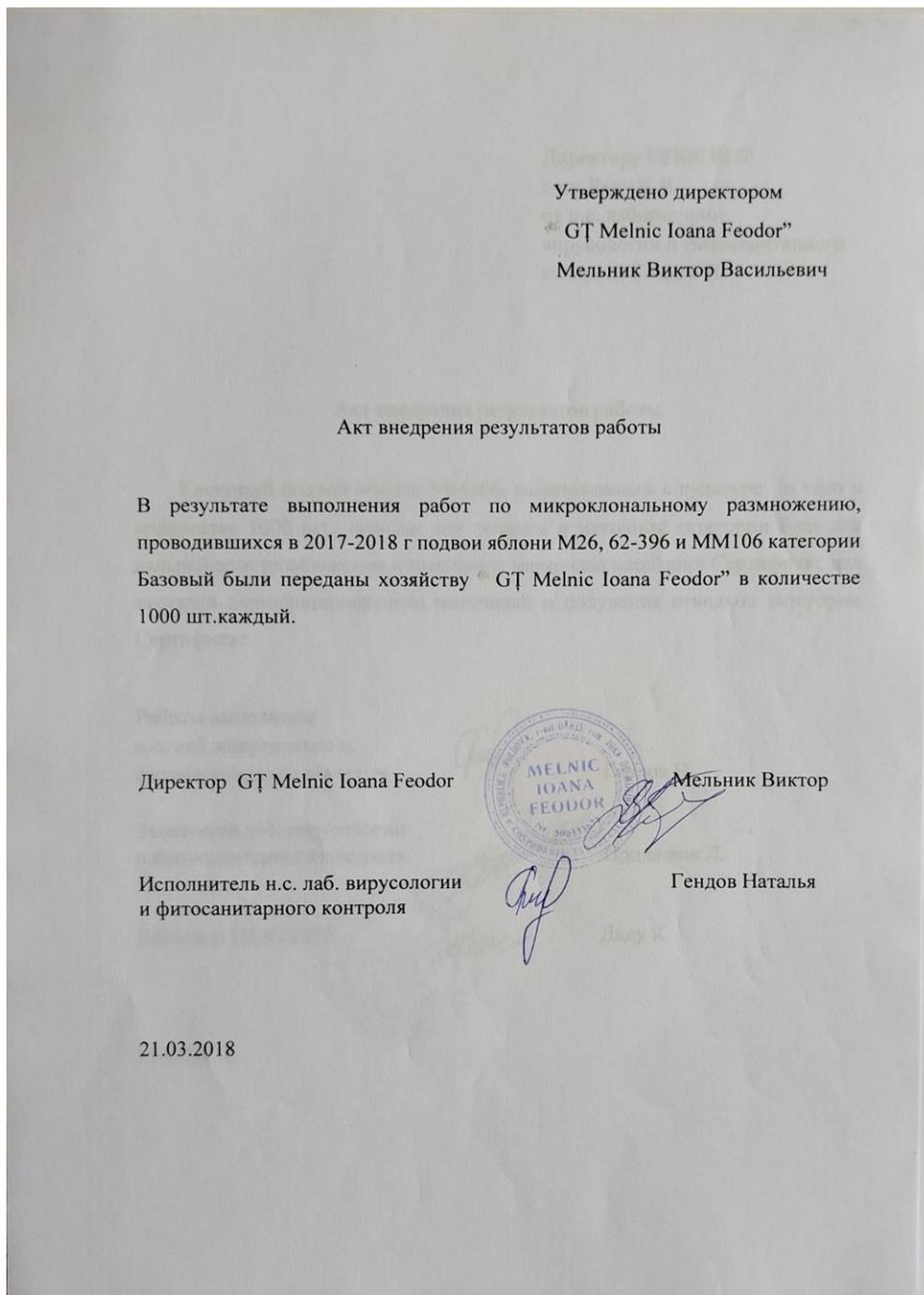


Схема П2.4. Методика размножения подвоя груши *Pyrus* в культуре *in vitro*



**Приложение 3. Акты внедрения результатов работы по разработке технологии
микроразмножения подвоев яблони**

**Акт ПЗ.1. Акт внедрения результатов работы по разработке технологии
микроразмножения подвоев яблони в хозяйство ГТ “Melnic Ioana Feodor”**



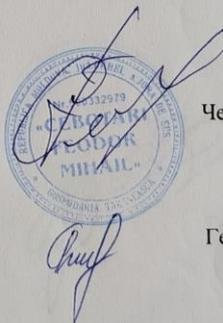
**Акт ПЗ.2. Акт внедрения результатов работы по разработке технологии
микроразмножения подвоев яблони в хозяйство ГТ “Себотари Феодор Михайл”**

Утверждено директором
“ ГТ Себотари Феодор Михайл”
Чеботарь Фёдор Михайловичем

Акт внедрения результатов работы

В результате выполнения работ по микроклональному размножению, проводившихся в 2017-2018 г подвой яблони ММ106 категории Базовый был передан хозяйству “ ГТ Себотари Феодор Михайл ” в количестве 500 шт.

Директор ГТ Себотари Феодор Михайл



Чеботарь Фёдор

Исполнитель: н.с. лаб. вирусологии
и фитосанитарного контроля

Гендов Наталья

19.03.2018

**Акт ПЗ.3. Акт внедрения результатов работы по разработке технологии
микроразмножения подвоев яблони в НПИСВПТ**

Директору НПИСВПТ
г-ну Даду К.Я.
от н.с. лаборатории
вирусологии и фитосанитарного
контроля Гендов Н.

Акт внедрения результатов работы

Клоновый подвой яблони ММ106, размноженный в культуре *in vitro* в количестве 1000 шт., передан для посадки в маточник категории База для дальнейшего размножения и получения материала категории Сертификат для закладки сертифицированного маточника и получения отводков категории Сертификат.

Работы выполнены
н.с. лаб .вирусологии и
фитосанитарного контроля

Гендов Н.

Заведущий лаб. вирусологии
и фитосанитарного контроля

Проданюк Л.

Директор НПИСВПТ



Даду К.

15.03.2018

Приложение П4. Сертификат участия в международной конференции “Modern Trends of Agricultural Higher Education”



Приложение П5. Диплом участника конкурса “Tânăr cercetător performant al anului 2004”



Приложение П6. Сертификат окончания программы ССАР



ДЕКЛАРАЦИЯ ОБ ОТВЕТСТВЕННОСТИ

Нижеподписавшаяся, заявляю под личную ответственность, что материалы, представленные в докторской диссертации, являются результатом личных научных исследований и разработок. Осознаю, что в противном случае, буду нести ответственность в соответствии с действующим законодательством.

Гендов Наталья

Подпись



09. 05. 2025

CURRICULUM VITAE

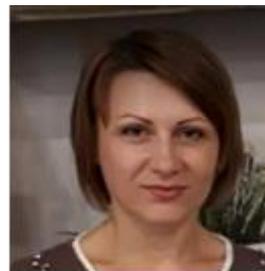
Гендов (Колибаба) Наталья

Республика Молдова, Кишинёв

+37368319398

colinda@mail.ru

Дата рождения: 14.06.1980г



Образование:

- 1.-Государственный Аграрный Университет Молдовы, специальность Horticultura (1997-2002)
- 2.-Государственный Аграрный Университет Молдовы, магистратура по специальности Pomicultura (2002-2003)
- 3.-Научно-Исследовательский Институт Плодоводства, аспирантура по специальности Pomicultura (2004-2007)

Область научных интересов:

Плодоводство, биотехнология, ботаника

Профессиональная карьера:

- 1.-Младший научный сотрудник НИИ Плодоводства, лаборатория Вирусологии (2002-2007)
- 2.-Научный сотрудник НПИСВПТ, лаборатория Вирусологии и Фитосанитарного контроля (2007-2024)
- 3.- Научный сотрудник НИПИСХВМ, лаборатория Вирусологии и Фитосанитарного контроля плодовых культур (2025 - н.в.)

Участие в национальных и билатеральных проектах:

- Институциональный проект «Tehnologii moderne, soiuri pomicole și bacifere orientate spre producție durabilă și securitatea alimentară» шифр: 15.817.05.02.A. (2012-2018).
- Институциональный проект «Utilizarea metodelor genetice și biotehnologiilor moderne în scopul creării, devirozării și implementării în producere a soiurilor culturilor pomicole, portaltoaelor și culturilor bacifere, cu potențial biologic sporit» шифр: 20.80009.5107.14 (2019-2023).
- Билатеральный проект с лабораторией биотехнологии Института Садоводства Минск. Республика Беларусь. «Оздоровление селекционно-ценных генотипов рода

Prunus domestica от известных и ранее не описанных в Молдове изолятов вируса шарки сливы (Plum pox virus) в культуре *in vitro* и *ex vitro*». Шифр: 13.820.14.06/BA. (2015-2016).

- Билатеральный проект с лабораторией биотехнологии Института Садоводства Минск. Республика Беларусь. «Разработка биотехнологических способов (*in vitro* и *ex vitro*) оздоровления от вируса кустистой карликовости малины с целью увеличения продуктивности промышленных насаждений малины». Шифр: 22.80013.5107.2BL. (2022-2023).

Участие в национальных и международных научных конференциях:

- 1.-Международная научная конференция „Realizări și perspective în horticultură, viticultură și silvicultură” UASM, Chișinău, 2005
- 2.-Международная научная конференция” Realizări și perspective în horticultură, viticultură, vinificație și silvicultură”, UASM, Chișinău, 2007
- 3.-Международная научная конференция „Horticultura modernă-realizări și perspective” Chișinău, 2010
- 4.-Международная научная конференция «Селекційно-генетична наука і освіта», Україна, Умань, 2023
- 5.-Международная научная конференция “Modern trends in the agricultural higher education”, Chisinau, UTM, 2023.
- 6.- Международная научная конференция “Genetics, Physiology and Plant Breeding”, Chisinau, USM, IGPPP, 2024.

Опубликованные научные работы:

22 научная работа (5 в моноавторстве): 13 статей в научных журналах и сборниках, 9 работ представлены на международных научных конференциях.

Диплом участника конкурса “ Tînăr cercetător performant al anului 2004”, 2005

Сертификат окончания программы CCAR, 2024

Знание языков: украинский- родной язык, русский- 10А, румынский-8С, английский-7С

Место работы: лаборатория вирусологии и фитосанитарного контроля плодовых культур, НИПИСХВМ, г.Кишинёв (Кодру), ул. Виеру 59, MD-2070, +37322285431

