

*На правах рукописи*

БЕСЕДИНА  
Екатерина Николаевна

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА КЛОНАЛЬНОГО  
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ IN VITRO

Специальность: 06.01.08 – плодоводство, виноградарство

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата сельскохозяйственных наук

Краснодар — 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства» (ФГБНУ СКЗНИИСиВ)

Научный руководитель: кандидат биологических наук  
**Бунцевич Леонид Леонтьевич**

Официальные оппоненты: **Верзилин Александр Васильевич**, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Мичуринский государственный аграрный университет», профессор кафедры биологии и методики ее преподавания  
**Маляровская Валентина Ивановна**, кандидат биологических наук, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур», заведующая лабораторией биотехнологии, физиологии, биохимии растений

Ведущая организация: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт садоводства имени И.В. Мичурина»

Защита состоится «18» декабря 2015 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 006.056.01 в ФГБНУ «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства» по адресу: 350901, г. Краснодар, ул. им. 40-летия Победы, 39

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства» <http://www.kubansad.ru>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью организации, с указанием почтового адреса, телефона, электронной почты и сайта организации, фамилии, имени, отчества, должности лица, подготовившего отзыв, просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 350901, г. Краснодар, ул. имени 40-летия Победы, 39; тел./факс.8(861)257-57-02, e-mail: kubansad@kubannet.ru

Учёный секретарь  
диссертационного совета Д 006.056.01,  
кандидат с.-х. наук

В.В.Соколова

## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Метод клонального микроразмножения растений является на данный момент времени наиболее перспективным методом размножения растений, позволяющим улучшить качество посадочного материала: повысить генетическую однородность растений, урожайность; освободить посадочный материал от вирусов путём использования меристемной культуры, а также от бактериальных, грибных болезней и вредителей; получать в сжатые сроки достаточное количество посадочного материала (Высоцкий В.А., 1983, Джигадло Е.Н., 2005, Корнацкий С.А., 1991, Бунцевич Л.Л., 2010).

Разработке и совершенствованию технологии клонального микроразмножения плодовых растений уделяли большое внимание многие учёные: Бутенко Р.Г., Высоцкий В.А., Катаева Н.В., Джигадло Е.Н., Леонтьев-Орлов О.А., Упадышев М.Т., Соловых Н.В., Туровская Н.И., Верзилин А.В., Корнацкий С.А., Шорников Д.Г., Фардзинова И.М., Пронина И.Н., Матушкина О.В., Маляровская В.И. и мн. другие.

Однако существует ряд проблем в данной технологии, в частности недостаточно высокий выход конечного продукта – посадочного материала - по причине высокого уровня некроза микропобегов от инфекции, низкой адаптивности микрорастений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям среды и др. причин; большие затраты на стимуляторы роста, структурообразующие компоненты и др. соединения, соответственно, высокая себестоимость конечного продукта. Известно, что для каждого нового сорта требуется индивидуальная проработка всех аспектов методики клонального микроразмножения и оздоровления *in vitro* (Высоцкий В.А. 1976, 1998, Леонтьев-Орлов О.А. 1986, Туровская Н.И., 1994). Для подвоев серии СК данная технология не была адаптирована.

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

**Цель работы** — усовершенствовать биотехнологический метод клонального микроразмножения подвоев яблони серии СК меристемным способом *in vitro* и снизить потери адаптированных мериклонов.

### **Задачи исследований:**

1. Установить эффективность ранее не использовавшихся в культуре *in vitro* стимуляторов роста нового поколения (производные и композиции органических кислот и препараты, синтезированные на основе фурфурола), сравнить их со стандартно используемыми в клональном микроразмножении ростовыми веществами.
2. Исследовать экономичные структурообразующие вещества для питательных сред.
3. Выявить влияние антибиотиков последних поколений на эффективность оздоровления эксплантов семечковых культур *in vitro* от бактериальных и др. инфекций.

4. Определить влияние новых стерилизаторов на результативность санации эксплантов семечковых культур *in vitro*, установить режимы стерилизации
5. Установить благоприятные сроки введения в культуру *in vitro* эксплантов подвоев яблони.
6. Определить оптимальные составы субстратов, режимы влажности и др. условия для повышения выхода адаптированных мериклонов *ex vitro*.

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

**Теоретическая значимость полученных результатов.** Получены новые знания о закономерностях влияния ранее не применявшихся в клональном микроразмножении ростовых веществ, а также структурообразователей питательных сред на ростовые реакции микропобегов подвоев яблони, выявлено saniрующее действие и влияние на уровень регенерации и развитие эксплантов подвоев яблони *in vitro* бактерицидных и фунгиостатических антибиотиков различных групп.

**Практическая значимость работы.** Использование стимуляторов роста и структурообразователей питательных сред, аналогичных по действию традиционно используемым фитогормонам и агар-агару, но более экономичных, позволит снизить затраты на производство безвирусного посадочного материала на 235,5 руб./шт. и повысить рентабельность производства на 108,6 %.

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

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

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

**Основные положения, выносимые на защиту:**

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

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

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

**Степень достоверности и апробация результатов исследований.** Достоверность и обоснованность полученных результатов подтверждены 5-летними исследованиями, проведенными лично автором или при его участии, и большим объемом экспериментального материала, статистически проанализированного. Результаты исследований доложены на научно-практических конференциях IV, V Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных «Научное обеспечение агропромышленного комплекса», Краснодар, 2010, 2011 гг., ежегодных отчётных сессиях, заседаниях методического совета отдела садоводства ФГБНУ СКЗНИИСиВ в 2010-2013 гг. Получены патенты «Способ микроразмножения подвоев яблони» № 2523305, «Способ клонального микроразмножения и оздоровления подвоев яблони *in vitro* с использованием антибиотика гризеофульвин» № 2557387. Разработка «Производство оздоровленного посадочного материала яблони и др. плодовых культур меристемным способом в культуре *in vitro*» отмечена дипломом XI Всероссийской выставки научно-технического творчества молодёжи НТТМ-2011 (Москва, ВВЦ, 2011 г.).

**Публикации.** Всего по материалам диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 4 в изданиях, определенных ВАК при Министерстве образования и науки России, 2 патента на изобретения, 1 монография в составе авторов, общий объём публикаций 6,4 п.л., в том числе доля участия автора – 3,3 п.л.

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

## 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**2.1 Объекты исследований.** Исследования выполнены в лаборатории биотехнологии СКЗНИИСиВ в 2010-2015 гг. Объекты исследований - различные химические соединения – компоненты питательных сред, а также приёмы культивирования *in vitro* подвоев яблони СК 2, СК 3, СК 4, СК 7 (селекции СКЗНИИСиВ), ММ 106. На этапе введения эксплантов в культуру *in vitro* использовали среду Мурасиге-Скуга с половинным содержанием минеральных солей, дополненную 6-БАП 0,4 мг/л. В состав сред отдельно вносили 400-500 мг/л антибиотиков. Использовали фунгицидные и бактерицидные антибиотики, в том числе новых поколений: аугментин (комбинированный пенициллин); ксенаквин (фторхинолон); макропен (макролидный антибиотик); цефепим (цефалоспорины IV поколения); гризеофульвин (антибиотик, эффективный в отношении грибов рода *Trichophyton*,

*Microsporum*); нистатин (антибиотик из группы полиенов, обладает фунгистатическим действием); цефотаксим (цефалоспорины III поколения); тетрациклин (антибиотик группы тетрациклинов). Все регуляторы роста, смеси витаминов добавляли в среды после автоклавирования. В качестве основного желирующего агента применяли агар-агар бактериологический. Основным источником углеводного питания на этапе микроразмножения являлась сахароза (20-30 г/л). Питательные среды дополняли витаминами по Мурасиге-Скугу (1962). Для поддержания нормального роста на этапе регенерации и мультипликации микропобегов *in vitro* в среду МС с полным составом солей, вносили регуляторы роста: 6-бензиламинопурин (1,0 мг/л), гибберелловую кислоту (0,5 мг/л), индолилмасляную кислоту (0,1 мг/л), препараты с шифром I-1 II-2, Л-1, кротонолактон, янтарную кислоту, сукцинаты калия и натрия, препараты «Кавказ», «Универсальный», «Фуролан» (0,4 –40 мг/л, см. табл.1). Выбор в пользу именно этих обладающих ростовой активностью, но ранее не испытанных в технологии клонального микроразмножения препаратов был сделан потому, что они являются малотоксичными, экологически чистыми, экономичными регуляторами роста нового поколения, используемыми в микродозах.

Таблица 1 – Характеристика химических соединений

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

**2.2 Методы исследований.** При работе с культурой тканей мы пользовались общепринятыми методиками В.А. Высоцкого 1998 г., Джигадло Е.Н. 2005 г. и др. Опыты по укоренению размноженных сортов проводили на средах Мурасиге-Скуга с половинным составом солей. В качестве индуктора ризогенеза применяли ИМК, которую добавляли непосредственно в среду укоренения в концентрации 1 – 2,5 мг/л, после чего растения переводили в условия полной освещенности

и стандартного фотопериода. Укорененные микрорастения переносили в поликарбонатные теплицы для прохождения этапа адаптации и дальнейшего культивирования. При оценке результативности микроклонирования учитывали: уровень регенерации эксплантов (отношение числа регенерировавших эксплантов к числу высаженных), образование раневого каллуса, длину и число побегов, сформированных каждым эксплантом, коэффициент размножения (отношение суммы всех сформированных побегов в каждом варианте к числу исходных эксплантов), число листьев у экспланта, интенсивность окраски листьев (хлороз или здоровая интенсивно зелёная окраска листьев), наличие стебля, общее состояние мериклонов по 5-балльной шкале. На этапе ризогенеза фиксировали число укорененных и неукоренившихся микропобегов и по этим данным рассчитывали частоту укоренения в процентах, отмечали количество побегов с каллусом.

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

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

Традиционно в технологии клонального микроразмножения используют природные регуляторы роста – фитогормоны (метаболиты самих растений) и их синтетические аналоги. Они участвуют в регуляции процессов жизнедеятельности, в значительной мере определяя характер и темпы роста и развития эксплантов (Гудвин Т, 1986, Кефели В.Л., 1984, Кулаева О.Н., 1984, Муромцев Г.С., 1984, Рункова Л.В., 1988 и др.). Однако, стандартно используемые стимуляторы роста являются дорогостоящими препаратами: 1 г 6-БАП– 3390,5 руб., 1 г ГК – 7773,8 руб. (по данным сайта Sigma-Aldrich в августе 2015 г.), а также опасными веществами (ГК умеренно опасна, 6-БАП токсичен). В современных условиях происходит постоянное быстрое обновление препаратов, также синтезируются новые соединения, обладающие рострегулирующими свойствами, ещё не испытанные при микроразмножении растений. В связи с этим актуальным является испытание и подбор новых, менее опасных, более экономичных препаратов ростовых веществ с эффективностью на уровне контроля (6-БАП, ГК, ИМК) и выше. Поэтому нами был проведён ряд экспериментов по испытанию ростовой активности ранее не использовавшихся в клональном микроразмножении малотоксичных, экологически чистых, экономичных препаратов нового поколения.

В первой серии опытов испытано 4 компонента: Л-1, I-1, II-2, фуrolан в концентрации 4 мг/л. Все вещества добавлялись в среду перед автоклавированием. В качестве контроля использована среда без ростовых веществ, стандарта - композиция стимуляторов роста: 1 мг/л БАП, 0,5 мг/л ГК, 0,1 мг/л ИМК. Результаты эксперимента приведены на рисунке 1.

Росторегулирующую активность исследуемых веществ оценивали по следующим показателям: уровень регенерации микропобегов из эксплантов, число листьев у экспланта, интенсивность окраски листьев (хлороз или здоровая интенсивно зелёная окраска листьев), наличие стебля, коэффициент размножения),

наличие каллуса, интенсивность ризогенеза, общее состояние мериклонов по 5-балльной шкале.

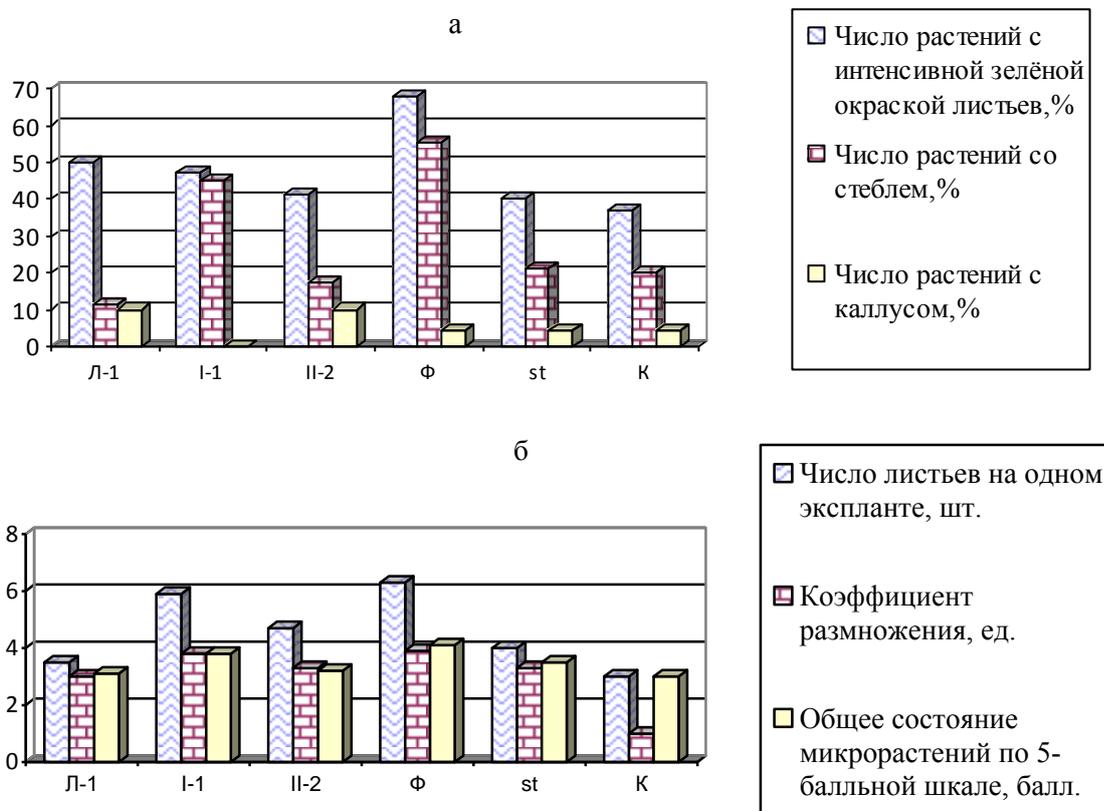


Рисунок 1 а, б – Качественные показатели эксплантов при культивировании их с использованием ростовых веществ нового поколения в концентрации 4 мг/л: Ф – фурулан, st – стандарт 1 мг/л БАП и 0,5 мг/л ГК, 0,1 мг/л ИМК, К – контроль – среда без ростовых веществ.

По всем показателям качества эксплантов выделился фурулан. На каждом микрорастении, выращенном с применением этого компонента к третьему пассажу, в среднем, развивается на 2,3 листа больше, чем в стандартном варианте, коэффициент размножения на 0,6 единиц выше, а общее состояние на 0,6 баллов лучше, чем контроль. На среде с данным стимулятором на 28% больше растений с интенсивной зелёной окраской листьев, на 24,6% больше микропобегов со стеблем. Каллус на средах с фуруланом образуется незначительно (4,3%, в контроле 4,5%). Данные результаты исследований отражены в публикациях Бунцевича Л.Л., 2011, Палецкой Е.Н., 2011, Бесединой Е.Н. 2015.

Испытание выделившегося препарата фурулан в различных концентрациях (0,4 мг/л, 4 мг/л, 8 мг/л, 40 мг/л) показало, что оптимальной является концентрация 4 мг/л. При концентрации препарата 40 мг/л происходит угнетение микропобегов (рис.2). Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л., 2015

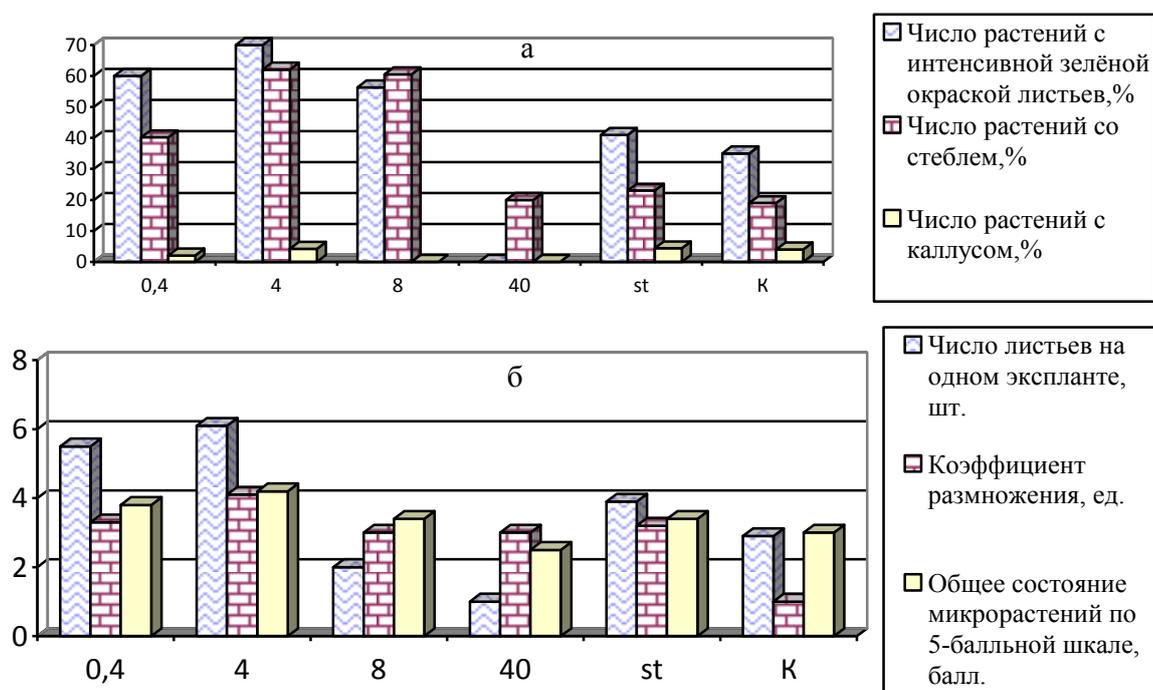


Рисунок 2 а, б – Качественные показатели эксплантов (подвои серии СК и ММ 106) на средах с фуранолом в различных концентрациях, мг/л

Далее в ходе экспериментов были испытаны 8 вариантов среды Мурасиге-Скуга с добавлением ростовых веществ: препарат «Кавказ» (кротонолактон 35%), кротонолактон чистый, сукцинат калия, сукцинат натрия, янтарная кислота, препарат «Универсальный», 1 мг/л БАП, 0,5 мг/л ГК, 0,1 мг/л ИМК (стандарт). На первом этапе опыта, при сравнении препаратов между собой и с контролем все компоненты добавляли в среду в концентрации 4 мг/л. Ко второму passages отбирали стандартные микропобеги, способные к укоренению с 5 и более нормально развитыми листьями, длиной побегов не менее 20 мм, без признаков хлороза, витрификации, фасциации, заражения грибной или бактериальной инфекцией согласно ГОСТ 54051-2010 (рис.3).

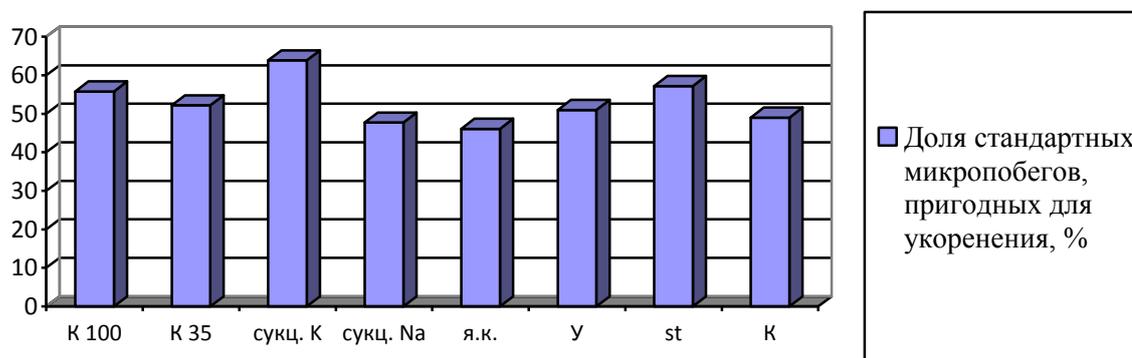


Рисунок 3 – Выход стандартных микропобегов, способных к укоренению, подвоев серии СК и ММ 106 после 1 пассажа,  $НСР_{05} = 4,9$ ; К 100 – среда МС с кротонолактоном чистым 4 мг/л, К 35 - среда МС с кротонолактоном 35 % 4 мг/л, сукц. К - среда МС с сукцинатом калия 4 мг/л, сукц. Na - среда МС с сукцинатом натрия 4 мг/л, я.к. - среда МС с янтарной кислотой 4 мг/л, У - среда МС с препаратом «Универсальный» 4 мг/л, st – стандарт среда МС с 1 мг/л БАП и 0,5 мг/л ГК, 0,1 мг/л ИМК, К – контроль, среда МС без ростовых веществ

В итоге выявили, что из протестированных стимуляторов роста все препараты оказались безопасными для эксплантов подвоев яблони, максимальную эффективность в регенерации микропобегов проявил сукцинат калия в концентрации 4 мг/л (на 6,7 % выше стандарта). На уровне стандарта выделился кротонолактон 100%.

Как показал опыт по выявлению оптимальной концентрации (сравнивали 3 концентрации: 0,4 мг/л, 4 мг/л, 8 мг/л) сукцината калия в среде оптимальной концентрацией оказалась 4 мг/л (рис.4). Полученные результаты отражены в статье Бесединой Е.Н. и др., 2014.

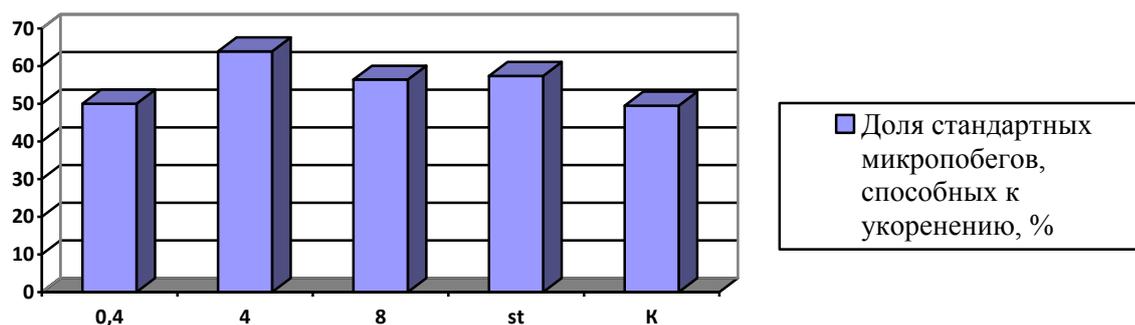


Рисунок 4 – Выход стандартных микропобегов, способных к укоренению подвоев серии СК и ММ 106 после 1 пассажа на средах с сукцинатом калия в различных концентрациях, мг/л; st – стандарт среда МС с 1 мг/л БАП и 0,5 мг/л ГК, 0,1 мг/л ИМК, К – контроль, среда МС без ростовых веществ

При сравнении между собой двух выделившихся препаратов - фуролана и сукцината калия выявили, что существенно больший выход стандартных микропобегов, пригодных для укоренения (согласно ГОСТ 54051-2010) отмечен в варианте фуролан 4 мг/л (на 4,2% выше, чем при использовании сукцината калия и на 10,2 % больше, чем в контрольном варианте, рис.5). На способ клонального микроразмножения подвоев яблони с использованием в качестве стимулятора роста препарата фуролан получен патент РФ 2523305.

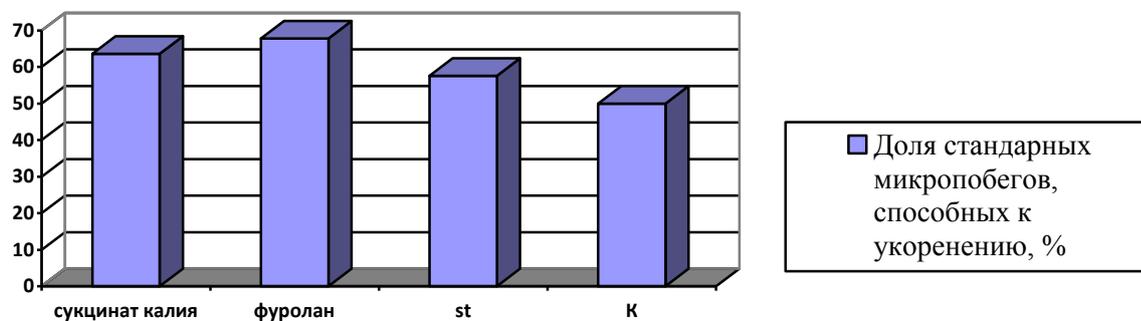


Рисунок 5 – Выход стандартных микропобегов, способных к укоренению подвоев серии СК и ММ 106 после 1 пассажа на средах с фуроланом и сукцинатом калия в концентрации 4 мг/л, st – 6-БАП 1,0 мг/л, ИМК 0,1 мг/л и ГК 0,5 мг/л, К – контроль, среда МС без ростовых веществ, НСР<sub>05</sub> = 9,1

На этапе ризогенеза была исследована способность к укоренению *in vitro* подвоев яблони при различных концентрациях индолилмасляной кислоты (табл.2). Изучили 4 концентрации ИМК: 1,0 мг/л (стандарт), 1,5 мг/л, 2,0 мг/л, 2,5 мг/л. В каждом варианте опыта 100 микропобегов. Оценивали процентную долю укоренившихся микропобегов.

Таблица 2 – Способность к укоренению *in vitro* (%) подвоев яблони при различных концентрациях ИМК

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

Наиболее интенсивно экспланты образуют корни при концентрации ИМК в среде 2,0 мг/л. Степень укоренения при этом достигает 65-90% в зависимости от типа подвоя. С помощью статистической обработки выявили, что для вариантов концентрации ИМК 1,0-2,0 мг/л коэффициент корреляции по всем типам подвоев равен 1, что означает, что с повышением концентрации ИМК от 1,0 мг/л до 2,0 мг/л способность к укоренению микрорастений подвоев возрастает. Дальнейшее повышение концентрации до 2,5 мг/л ведёт к снижению способности к укоренению. Таким образом, оптимальной концентрацией ИМК в среде для укоренения подвоев СК 2, СК 3, СК 7, ММ 106 является 2,0 мг/л. Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л., 2015.

Можно заключить, что при испытании ранее не применявшихся в клональном микроразмножении малотоксичных, экологически чистых, экономичных стимуляторов роста (производных и композиций органических кислот и препаратов, синтезированных на основе фурфурола) по основным показателям качества эксплантов выделился препарат фуrolан в концентрации 4 мг/л. При сравнении этих препаратов между собой максимальную эффективность проявил фуrolан. Сравнивая приведённые характеристики стандартных стимуляторов роста, пришли к выводу, что действие сукцината калия и фуrolана близко по своим результатам (регенерация микропобегов, развитие листьев) к комплексному влиянию 6-БАП 1 мг/л, ИМК 0,1 мг/л и гиббереллиновой кислоты 0,5 мг/л. В связи с этим возможно использование препаратов фуrolан и сукцинат калия как менее опасных, более экономичных аналогов традиционно используемым ростовым веществам (комплекс 6-БАП, ИМК, ГК) с эффективностью на том же уровне и выше, что значительно снизит себестоимость оздоровленного посадочного материала и повысит безопасность технологии клонального микроразмножения подвоев яблони.

При анализе укоренения микропобегов *in vitro* выявили, что на всех подвоях (СК 2, СК 3, СК 7, ММ 106) прослеживается тенденция: при концентрации ИМК 2,0 мг/л лучше происходит укоренение у всех подвоев.

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

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

В опыте 3 варианта: среда МС + агар-агар бактериологический 8 г/л среды; среда МС + пищевой картофельный крахмал 40 г/л; среда МС + агар-агар бактериологический 4 г/л среды и пищевой картофельный крахмал 20 г/л. Состояние микропобегов оценивали по показателям количества здоровых развитых листьев на микрорастении и интенсивности окраски листьев и стеблей через 30-40 дней культивирования на испытываемых средах (табл. 3).

Таблица 3 — Результаты изучения картофельного крахмала как структурообразователя питательных сред

Изучаемые показатели	Пассажи	М-С + агар-агар (стандарт)			М-С + крахмал			М-С + агар + крахмал		
		СК 2	СК 3	СК 4	СК 2	СК 3	СК 4	СК 2	СК 3	СК 4
Количество листьев, шт.	1	5	4	5	8	9	11	9	4	6
	2	9	7	6	7	5	12	5	7	5
	3	6	10	6	4	10	7	6	8	4
	в среднем	7	7	6	6	8	10	7	6	5
НСР <sub>05</sub>					1,8	2,5	2,8	1,8	2,3	0,8
Общее состояние микропобегов, баллы	1	4	4	4	5	5	5	4	4	4
	2	5	4	4	5	5	5	4	4	4
	3	4	4	4	5	4	5	4	4	5
	в среднем	4	4	4	5	5	5	4	4	4
НСР <sub>05</sub>					0,5	0,5	0,5	0,4	0	0,4

Согласно результатам эксперимента (табл.3), при культивировании на среде, содержащей в качестве структурообразователя крахмал, микрорастения подвоев яблони развивают большее количество листьев (6-10 шт.) и имеют лучшее общее состояние (5 баллов), чем в контроле на агаризованной питательной среде (6-7 шт. листьев и 4 балла общее состояние). Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л., 2015.

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

Питательные среды и мериклоны являются благоприятным субстратом для развития грибной и бактериальной микрофлоры (Высоцкий В.А, 1998, Кашин В.И., 2001). Для повышения эффективности санации, помимо мероприятий по поддержанию стерильности, используют антибиотики (Высоцкий В.А, 1998, Кухарчик Н.В., 2006).

На этапе работы с антибиотиками в целях совершенствования стратегии санации питательных сред и мериклонов *in vitro* из контаминированных объектов (мериклоны вегетативно-размножаемых подвоев серии СК) при содействии сотрудников кафедры микробиологии и защиты растений КубГАУ Горьковенко В.С. и Коростелёвой Л.А. выделены чистые культуры микроорганизмов, определена их родовая и видовая принадлежность (рис.6).

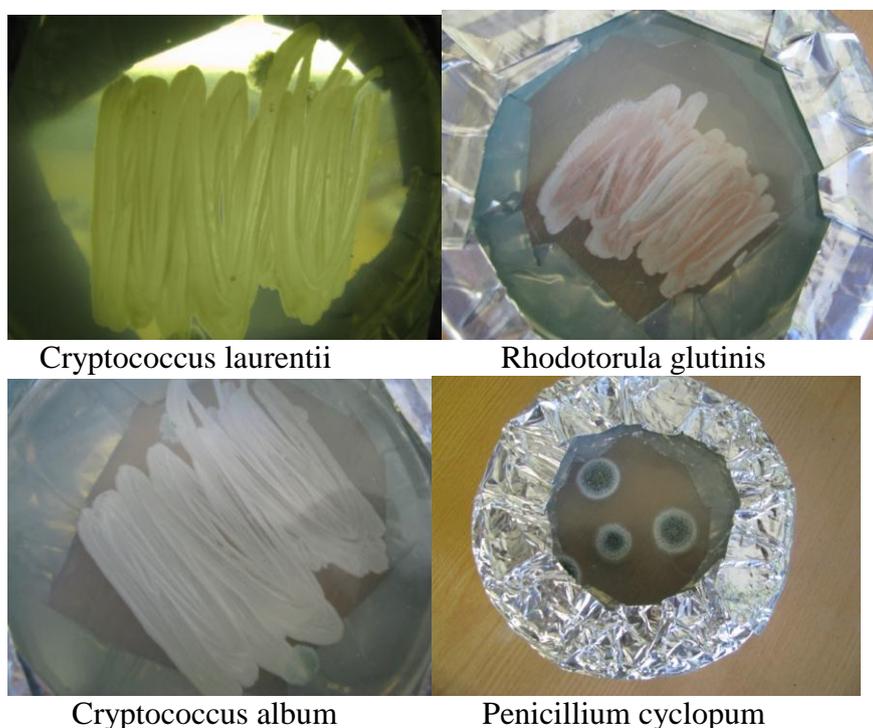


Рисунок 6 - Колонии эпифитных дрожжей и грибов, выделенные в контаминированных питательных средах и мериклонах

Установлено, что засоряют сосуды с питательными средами и контаминировуют мериклоны колонии эпифитных дрожжей и грибов *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus album*, *Cryptococcus laurentii* (дрожжи), *Penicillium cyclosum* (грибы), а также ряд не идентифицированных объектов (рис.6). Результаты данных исследований отражены в публикациях Бунцевича Л.Л. 2011, 2012.

В целях борьбы с контаминирующими мериклоны микроорганизмами проведён анализ эффективности группы антибиотиков: цефотаксим, тетрациклин, нистатин. В первую очередь изучено влияние антибиотиков на средовую инфекцию.

Использовали среду Мурасиге-Скуга с 0,5 мг/л 6-БАП. Антибиотики растворяли в стерильной воде и добавляли в питательную среду непосредственно перед автоклавированием. Препараты использовали в рекомендуемых концентрациях: цефотаксим 200 мг/л, тетрациклин 100 мг/л, нистатин 200 мг/л. В качестве контроля использовали среду без антибиотиков. Ревизия питательной среды проходила в течение 30-35 дней культивирования. Эффективность данных антибиотиков для различных типов подвоев приведена на рисунке 7.

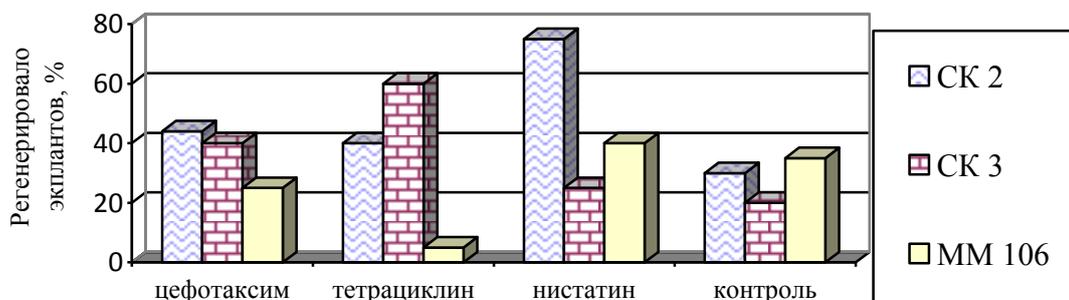


Рисунок 7 – Выход нормально развитых микропобегов подвоев СК и ММ 106 in vitro при введении в среду различных антибиотиков

Как видно из рисунка 7, питательные среды с содержанием антибиотика нистатин в концентрации 200 мг/л оказались благоприятны для подвоев СК 2 (75% здоровых эксплантов) и ММ 106 (60% здоровых эксплантов), для подвоев СК 3 максимальный выход нормально развитых микропобегов наблюдается на средах с антибиотиками тетрациклин 100 мг/л и цефотаксим 200 мг/л (60% здоровых эксплантов в обоих вариантах). Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л., 2015.

Важным аспектом применения антибиотиков является определение порядка ввода их в среду: до или после автоклавирования (рис. 8).

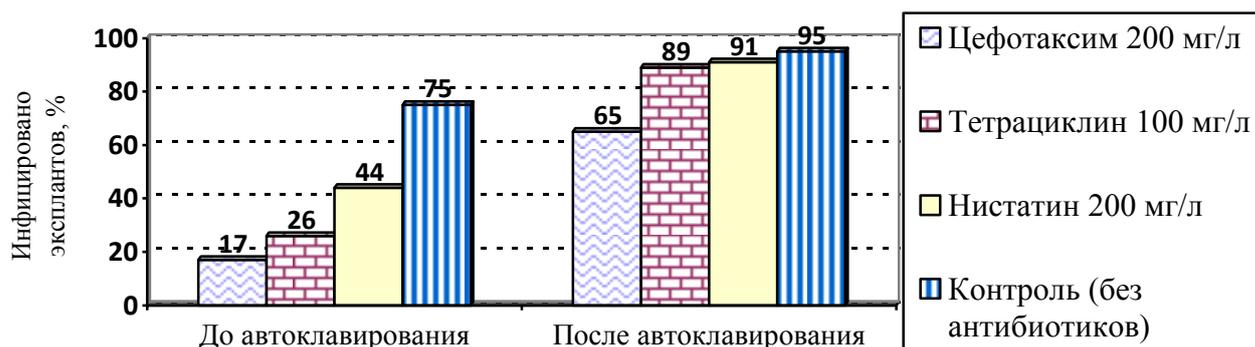


Рисунок 8 – Доля инфицированных эксплантов подвоев СК и ММ 106 при введении антибиотиков до и после автоклавирования, НСР<sub>05</sub>=26

Как видно из рисунка 8, меньшая инфицированность эксплантов наблюдается при добавлении в среду антибиотиков до автоклавирования. Различие между вариантами «до» и «после» автоклавирования существенно по каждому виду антибиотиков. Проанализировав полученные данные при добавлении антибиотиков,

можно сделать вывод о том, что метод «после автоклавирования» является нерациональным в использовании. Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л., 2015.

В связи с постоянным обновлением штаммового состава микроорганизмов, обновлением препаратов были испытаны антибиотики нового поколения: аугментин, ксенаквин, макропен, цефепим, а также гризеофульвин, в качестве стандарта использовали нистатин.

Антибиотики вводились в среду Мурасиге-Скуга перед автоклавированием в рекомендуемых производителем концентрациях 400-500 мг/л действующего вещества. Ростовые вещества не добавляли. Культивировали верхушечные почки. Время введения в культуру – третья декада марта. В каждом варианте высажено на питательные среды 60 шт. эксплантов. Уровень регенерации здоровых эксплантов к моменту первого пассажа различных видов подвоев на средах с испытываемыми антибиотиками указан на рисунке 9.

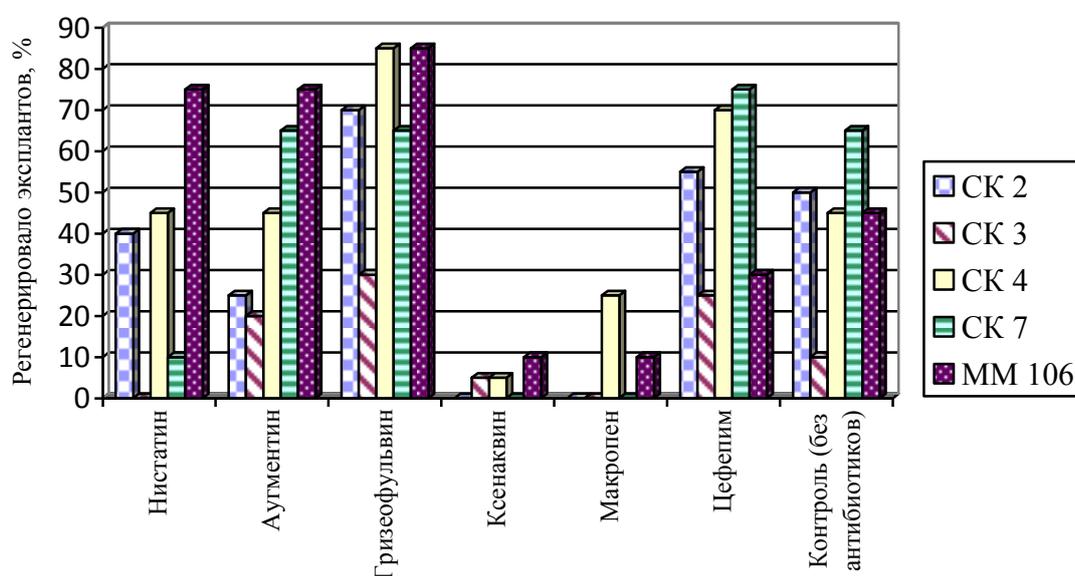


Рисунок 9 – Уровень регенерации здоровых эксплантов экспериментальных подвоев на средах с различными антибиотиками (%)

Установлено, что максимальный saniрующий эффект на подвоях СК 2, СК 3, СК 4, ММ 106 проявил антибиотик гризеофульвин, на подвое СК 7 – цефепим в концентрации 500 мг/л (регенерация на 10 % выше, чем в контрольном варианте). Стоит отметить, что экспланты подвоя СК 7 на средах с добавлением антибиотика гризеофульвин регенерировали на 65 %. Таким образом, антибиотик гризеофульвин в концентрации 500 мг/л обладает наиболее стабильным saniрующим эффектом (рис. 9). На способ клонального микроразмножения и оздоровления подвоев яблони *in vitro* с использованием антибиотика гризеофульвин получен патент РФ 2557387.

Таким образом, по оздоравливающему влиянию на средовую и посадочную инфекцию и на рост и развитие мериклонов выделен антибиотик нистатин в концентрации 200 мг/л: он обладает saniрующим эффектом 60-75 % (выход здоровых эксплантов) для подвоев СК 2 и ММ 106. Однако, наиболее стабильным са-

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

### 3.4 Подбор эффективных и безопасных стерилизаторов для санации эксплантов подвоев яблони

На этапе введения эксплантов в культуру *in vitro* протестирован ряд не применявшихся ранее в клональном микроразмножении препаратов для стерилизации эксплантов (фосфопаг, скор, эупарен, делан) наравне с уже известными в данной технологии стерилизаторами, была испытана их эффективность для подвоев яблони серии СК и ММ 106. Выбор в пользу данных веществ был сделан потому, что они являются умеренно опасными и малоопасными: скор, эупарен, делан относятся к третьему классу опасности, фосфопаг – к четвёртому. В качестве контроля высажены не стерилизованные меристемы, а в качестве стандарта взят йодид ртути, широко применявшийся в клональном микроразмножении стерилизатор, который относится к первому классу опасности - чрезвычайно опасные вещества (таблица 4).

Таблица 4 - Анализ эффективности стерилизующих препаратов при обработке эксплантов перед посадкой

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

Установлено, что максимальный выход стерильных эксплантов обеспечивает препарат фосфопаг 0,5 г/100 мл (65%, различие среднего значения по двум повторностям со стандартом существенно, таблица 4). Другие экспериментальные препараты, как видно из таблицы 4, оказались неэффективными стерилизаторами эксплантов подвоев яблони. Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л., 2015.

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

Результаты исследований изложены в таблице 5.

Таблица 5 – Результативность стерилизации эксплантов при введении в культуру *in vitro* эксплантов подвоев яблони серии СК

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

Анализ полученных данных (таблица 5) показывает, что максимально сильнодействующим стерилизатором является бытовой препарат «Белизна» в разведении 1:1. Инфицированных эксплантов в этом варианте опыта не было. Однако, действие реагента на меристемы было довольно жестким (некроз составил 32,6% в среднем). Действие препарата «Белизна» в разведении 1:2 было более мягким. Выход живых эксплантов составил 77,6 % у СК 2 (различие существенно) и 69,3 % у СК 3. Значительно ниже было количество погибших эксплантов: СК 2 - 14,3 и СК 3 - 23,0 %. У образца СК 4 эти показатели составили 79,6 и 13,6 %. Самый низкий эффект стерилизации отмечен в варианте опыта с использованием препарата «Белизна» в разведении 1:4 (выход жизнеспособных эксплантов 52,5%; в среднем). В стандартном варианте с использованием 0,1 % раствора йодида ртути также отмечен выпад эксплантов от токсичного действия препарата (24,5%). Средний выход жизнеспособных эксплантов при этом составил 71,8%. Таким образом, оптимальным вариантом оказался препарат «Белизна» в разведении 1:2. Полученные результаты отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л., 2015.

В ходе исследований были подобраны эффективные и безопасные препараты для санации эксплантов подвоев яблони от инфекции, такие как бытовой препарат «Белизна» (гипохлорит натрия) в разведении 1:2, малоопасное вещество четвертого класса опасности (доля жизнеспособных эксплантов 75,5% от изна-

чально высаженных), а также фосфопаг, препарат четвёртого класса опасности (доля жизнеспособных эксплантов 65% от изначально высаженных).

### 3.5 Оптимизация сроков введения в культуру *in vitro* эксплантов подвоев яблони

Важным аспектом микроклонального размножения являются сроки изоляции исходного материала с маточных растений и сроки введения в культуру *in vitro* эксплантов. Результаты эксперимента по введению эксплантов подвоев яблони в различные сроки в течение гола приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Уровень регенерации эксплантов серии СК и ММ 106, введённых в культуру *in vitro* в разные месяцы, %

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

Благоприятными сроками изоляции и культивирования меристем подвоев яблони оказались март-июнь с некоторым снижением в апреле. Уровень регенерации меристем, высаженных *in vitro* в период март-июнь через месяц после введения в культуру в среднем составляет 47,7-67,6%. Полученные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л., 2015. Таким образом, благоприятными сроками введения в культуру *in vitro* подвоев яблони серии СК оказались фазы распускания почек и интенсивного роста побегов (март, май-июнь).

### 3.6 Адаптация микрорастений к нестерильным условиям среды

С целью уменьшения доли погибших оздоровленных растений нами были заложены три серии опытов по улучшению условий адаптации.

Задачей первой серии опытов являлась оценка эффективности различных почвенных субстратов для приживаемости микрорастений подвоев яблони серии СК и ММ 106.

В 1-ом варианте растения высажены в торфяные контейнеры, заполненные торфяной смесью. Во 2-ом варианте использовался модифицированный чернозем - стабилизированный в течение суток при температуре 100 ° С выщелоченный чернозем с добавлением половинного раствора солей по прописи Мурасиге-Скуга. В контрольном варианте использовался субстрат, приготовленный

из 1/3 песка; 1/3 чернозёма; 1/3 торфа. Во всех вариантах высажено по 200 растений (таблица 7).

Таблица 7 - Приживаемость адаптантов (микрорастения подвоев серии СК и ММ106) на различных субстратах

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

В результате опыта установили, что лучше всего развились и хорошо прижились растения, высаженные на модифицированном черноземе: 180 шт. адаптированных из 200 высаженных (90%). В 1-ом варианте прижилось 51 шт. адаптантов из 200 шт. высаженных (25,5%), в контроле 96 шт. (48%) за тот же период времени (таблица 7).

На основе проделанной работы можно заключить, что для адаптации мериклонов вегетативно-размножаемых подвоев яблони лучше применять в качестве субстрата модифицированный чернозём.

Задачей второй серии опытов был подбор оптимального объёма контейнеров для пересадочной культуры мериклонов. Объекты исследований - микрорастения подвоев СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106. Адаптанты были высажены в сосуды разного объёма (1 вариант – 1500 л, 2 вариант 800 мл, 3 вариант - 400 мл, 4 вариант - 200 мл), заполненные модифицированным чернозёмом. На каждый вариант высаживалось по 50 мериклонов (таблица 8).

Таблица 8 - Приживаемость адаптантов (микрорастения подвоев серии СК и ММ106) в контейнерах различного объёма

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

По данным опыта видно, что максимальная приживаемость микрорастений (80 %) на этапе адаптации отмечена в сосудах 800 мл. При уменьшении объёма сосуда, снижается приживаемость адаптантов (при объёме 400 мл – приживаемость 66 %), а сосуды объёмом 200 мл показали отрицательный результат с полной гибелью микрорастений (таблица 8). Это связано с быстрым иссушением субстрата в контейнерах малого объёма. В сосудах объёмом 1500 мл приживаемость

микрорастений на том же уровне, что и при объёме 800 мл (78 %), однако развитие адаптантов происходит медленно. Это, предположительно, связано с тем, что корневая система медленно нарастает, и пока не заполнит весь объём, не происходит развития надземной части растений.

Задачей третьей серии опытов по адаптации явилось определение оптимальной степени развития микрорастений вегетативно-размножаемых подвоев яблони для пересадки их в почвенный субстрат в нестерильные условия (начало адаптации). Опыт призван обеспечить высокий выход адаптируемых растений.

В схеме опыта два варианта. Первый вариант составили растения, достигшие размера 5-10 см, с развитой корневой системой (4-5 корешка длиной 2-5 см.). Второй вариант – это растения средней и небольшой величины (3-4 см), со слабо развитой корневой системой. В каждом варианте растения были высажены в количестве 80 шт. В качестве посадочной тары применялись пластиковые контейнеры, в качестве субстрата использовался модифицированный чернозём. Результаты опыта приведены в таблице 9.

Таблица 9 - Приживаемость адаптантов (микрорастения подвоев серии СК и ММ106) с различной степенью развития стебля и корневой системы

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

В результате наблюдения за состоянием объектов установили, что лучше всего развились и хорошо прижились растения первого варианта (размер 5-10 см, 4-5 корешка длиной 2-5 см). Растения второго варианта, размером 3-4 см, подверглись большому подвяданию, тургор некоторых листьев не восстановился. В период адаптации в первом варианте погибло 8 растений из 80, а во втором - 36 растений из 80 шт. (таблица 9). При этом необходимо отметить, что растения первого варианта значительно опережали в росте и развитии второй вариант.

По результатам серии опытов на этапе адаптации микрорастений подвоев яблони к нестерильным условиям среды пришли к заключению, что адаптацию следует начинать с момента, когда растения достигнут размера 5-10 см, а их корневая система будет состоять из нескольких развитых корешков, длиной 2-5 см в 800 мл сосудах на субстрате стабилизированный в течение суток при температуре 100 ° С выщелоченный чернозём с добавлением половинного раствора солей по прописи Мурасиге-Скуга. Полученные экспериментальные результаты исследований отражены в статье Бесединой Е.Н., Бунцевича Л.Л., 2015.

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

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

Так, в стандартной технологии на 1 л питательной среды на этапе регенерации и мультипликации микропобегов уходит 7,5 руб. на ростовые вещества. В разработанной технологии возможно применение вместо стандартной композиции стимуляторов роста (БАП, ГК, ИМК) 4 мг препарата фуролан (0,4 руб.) поочередно со стандартными ростовыми веществами (через пассаж). Таким образом, происходит двукратное удешевление технологии. За счёт использования крахмала в качестве структурообразователя поочередно с агар-агаром также происходит двукратное удешевление технологии.

Также проведён ряд модификаций технологии, повышающих эффективность различных этапов клонального микроразмножения. Например, при добавлении в среду антибиотика гризеофульвин происходит повышение выхода жизнеспособных микропобегов из эксплантов на этапе введения в культуру *in vitro* относительно контроля (среда без антибиотиков) на 26 %. Применение препарата фуролан на этапе регенерации микропобегов приводит к повышению выхода стандартных микропобегов (1мг/л БАП, 0,5 мг/л ГК, 0,1 мг/л ИМК) на 10 %.

Расчёт экономической эффективности производства посадочного материала подвоев яблони с использованием разработанной технологии клонального микроразмножения приводим в таблице 10.

Таблица 10 - Экономическая эффективность производства микрорастений подвоев яблони

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

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

## ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

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

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

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

9. Адаптацию микрорастений подвоев яблони следует начинать с момента, когда растения достигнут размера 5-10 см, а их корневая система будет состоять из

нескольких хорошо развитых корешков, длиной 2-5 см в 800 мл сосудах на субстрате стабилизированный в течение суток при температуре 100 ° С выщелоченный чернозём с добавлением половинного раствора солей по прописи Мурасиге-Скуга.

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

## **РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ**

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

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

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации:**

#### **Научные статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России**

1. Бунцевич, Л.Л. Оптимизация питательных сред при клональном микроразмножении подвоев яблони серии СК / Л.Л. Бунцевич, А.Т.Киян, Е.Н. Беседина, М.А. Костюк // Плодоводство и ягодоводство России. - 2013. - XXXVII том. - С.46-51.
2. Бъядовский, И.А. Влияние спектрального состава света на развитие клоновых подвоев семечковых культур при микроразмножении / И.А. Бъядовский, М.Т. Упадышев, Е.Н. Беседина // Плодоводство и ягодоводство России. – 2013. - XXXVIII том. – С.47-54
3. Беседина, Е.Н. Изучение эффективности новых стимуляторов роста различной природы при клональном микроразмножении подвоев яблони серии СК / Е.Н. Беседина, Л.Л. Бунцевич, М.А. Костюк // Плодоводство и ягодоводство России. - 2014.- Т. XXXIX. - С. 29-32.
4. Беседина, Е.Н. Усовершенствования технологии клонального микроразмножения подвоев яблони на этапе введения в культуру *in vitro* [Электронный ресурс] / Беседина Е.Н., Бунцевич Л.Л. // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал

КубГАУ). – Краснодар: КубГАУ, 2015. – №07(111). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2015/07/pdf/113.pdf>

### **Монография**

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

### **Патенты**

6. Патент 2523305. Российская Федерация. МПК А01Н4/00. Способ микроклонального размножения подвоев яблони / Л.Л. Бунцевич, Е.Н. Палецкая (Беседина), М.А. Костюк, М.В. Макаркина, Н.И. Ненько; заявители и патентообладатели Государственное научное учреждение Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства Россельхозакадемии, Общество с ограниченной ответственностью Малое инновационное предприятие «Здоровый сад». - № 2013107907/10; заявл. 21.02.2013; опубл. 20.07.2014, Бюл. № 20. – 5 с.

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

### **Статьи в других изданиях**

8. Палецкая (Беседина), Е.Н. Оценка эффективности новых ростовых веществ при культивировании семечковых культур *in vitro* / Е.Н. Палецкая (Беседина), Л.Л. Бунцевич // Материалы V Всероссийской науч.-практ. конф. молод. учёных «Научное обеспечение агропромышленного комплекса». – Краснодар: КубГАУ, 2011 – С.51-53 с.

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

10. Беседина, Е.Н. Стимуляторы роста нового поколения и альтернативные структурообразователи питательных сред. Эффективность адаптации микрорастений подвоев яблони *ex vitro* [Электронный ресурс] / Е.Н. Беседина, Л.Л. Бунцевич, // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2015. - №35. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/15/05/17.pdf>