

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
САДОВОДСТВА, ВИНОГРАДАРСТВА, ВИНODEЛИЯ»

На правах рукописи

ВИНТЕР

Марина Александровна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПРИЕМОВ ОЗДОРОВЛЕНИЯ И
КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ СЛИВЫ ДОМАШНЕЙ НА
ОСНОВЕ ОЦЕНКИ АДАПТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА СОРТОВ**

Специальность: 06.01.08 – Плодоводство, виноградарство

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Научный руководитель –
кандидат биологических наук
Л.Л. Бунцевич

Краснодар, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 СОСТОЯНИЕ ИЗУЧЕННОСТИ ВОПРОСА.....	9
1.1 Культура сливы, ее значение.....	9
1.2 Вирус шарки сливы (<i>PPV</i>), современные методы идентификации вируса.....	11
1.3 Методы борьбы с вирусом шарки сливы.....	24
1.4 Клональное микроразмножение в системе безвирусного питомниководства.....	28
1.4.1 Сущность клонального микроразмножения, преимущества, этапы.....	28
1.4.2 Введение эксплантов в культуру <i>in vitro</i> , подготовка растительного материала, сроки интродукции.....	30
1.4.3 Оптимальный состав питательной среды для микроразмножения сливы домашней.....	37
2 ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	47
2.1 Объекты исследований.....	47
2.2 Условия проведения исследований.....	53
2.3 Методы исследований.....	56
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	64
3.1 Особенности распространения вируса шарки сливы (<i>Plum pox potyvirus</i>) в условиях Прикубанской зоны Краснодарского края.....	64
3.2 Штаммовый состав вируса шарки сливы.....	69
3.3 Определение сроков тестирования и проявления симптомов вируса шарки сливы на растениях в условиях Прикубанской зоны садоводства Краснодарского края.....	72
3.4 Адаптационные особенности сортов сливы домашней при инфицировании вирусом шарки.....	76
3.4.1 Оценка сортов сливы домашней по восприимчивости к вирусу шарки сливы в условиях Прикубанской зоны Краснодарского края.....	76
3.4.2 Изменение физиологических и биохимических показателей растений сливы в связи с инфицированием вирусом шарки.....	79
3.4.3 Влияние вируса шарки на качество плодов сливы.....	85
3.4.4 Влияние вируса шарки на урожайность сливы домашней.....	88
3.5 Оптимизация этапов клонального микроразмножения сливы домашней.....	90
3.5.1 Подбор эффективных и безопасных стерилизаторов для санации эксплантов сливы домашней при введении в культуру.....	90
3.5.2 Оптимизация сроков введения эксплантов сливы домашней в культуру <i>in vitro</i>	94
3.5.3 Подбор оптимального состава среды для микроразмножения сортов сливы <i>in vitro</i>	99

3.5.4 Ростовые реакции растений на препараты группы янтарной кислоты на этапе мультипликации эксплантов сливы в культуре <i>in vitro</i>	104
3.5.5 Раздельное применение БАВ на основе янтарной кислоты и стандартных ростовых веществ.....	107
3.5.6 Применение БАВ группы янтарной кислоты совместно со стандартными ростовыми веществами.....	116
3.5.7 Эффективность использования препаратов группы янтарной кислоты в на этапе ризогенеза микропобегов сливы домашней <i>in vitro</i>	118
3.6 Экономическая эффективность усовершенствованного приёма клонального микроразмножения сливы домашней <i>in vitro</i> с использованием янтарной кислоты, сукцинатов калия и натрия.....	123
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	127
РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ.....	129
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	130
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	161

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ФГБНУ СКФНЦСВВ	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия
ФГБНУ ВСТИСП	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства
<i>PPV</i>	<i>Plum pox potyvirus</i>
<i>PDV</i>	<i>Prune dwarf ilarvirus</i>
<i>PNRSP</i>	<i>Prunus necrotic ring spot ilarvirus</i>
ЕОКЗР	Европейская и Средиземноморская организация по карантину и защите растений
РНК	рибонуклеиновая кислота
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА	иммуноферментный анализ
ELISA-ТССТ	энзимосвязанный иммуносорбентный тест
ПЦР	полимеразная цепная реакция
МС	питательная среда по прописи Мурасиге-Скуга (1962)
QL	среда Quoirin-Leroivre
DKW	среда Driver-Kuniyuki
WPM	среда Woody plant medium
B5	среда Гамборга
БАВ	биологически активные вещества
6-БАП	6-бензиламинопурин
6-БА	6-бензиладенин
2ip	2-изопентиладенин
TDZ	тидiazурон
4-PU	N-4-пиридил-N-фенилмочевина
CPPU	N-(2 хлор-4-пиридил)-N-фенилмочевина
ГК	гибберелловая кислота
ИМК	индолилмасляная кислота
α -НУК	α -нафтил-уксусная кислота
ИУК	индолил-3-уксусная кислота
B ₁	тиамин
B ₂	рибофлавин
B ₆	пиридоксин
P _p	никотиновая кислота
C	аскорбиновая кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Краснодарский край – один из основных регионов РФ, где возделываются плодовые культуры, среди которых особое место занимает слива, обладающая комплексом положительных признаков - засухоустойчивость, зимостойкость, стабильность плодоношения и продуктивность (Ерёмин; Заремук; Витковский). Однако в условиях изменения погодно-климатических условий, учащения воздействия абиотических стрессов, усиливается вредоносность вирусных, фитоплазменных, грибных и бактериальных патогенов, что приводит к снижению урожайности и качества плодовой продукции, в т.ч. сливы. В последние десятилетия, наряду с грибными и бактериальными заболеваниями, усилилась вредоносность вирусных заболеваний на косточковых культурах, прежде всего шарки сливы (*PPV*) (Atanasoff; Jordovich; Приходько и др.; Митрофанова и др.). В связи с чем, возникла необходимость оценки сортов сливы различного происхождения по устойчивости к вирусу шарки в изменяющихся условиях среды, а также получение безвирусного посадочного материала на основе оптимизации способа клонального микроразмножения. На сегодняшний день существует целый ряд методик, приемов микроразмножения плодовых культур, в т.ч. сливы домашней, с использованием различных ростовых веществ (Корнацкий; Муратова; Коваленко, Медведева). Вместе с тем, соли янтарной кислоты в культуре *in vitro* при клональном микроразмножении сливы не изучались. В связи с этим оценка сортов сливы различного происхождения по устойчивости к вирусу шарки и оптимизация способа клонального микроразмножения на основе солей янтарной кислоты являются актуальными.

Современная селекционная работа направлена на создание сортов с комплексом хозяйственно-ценных признаков, в т.ч. устойчивость к вирусу шарки, а также высокой адаптивностью, в изменяющихся условиях среды. В южном регионе селекция сливы домашней связана с именами таких ученых, как Г.В. Ерёмин, С.И. Забродина, М.А. Колесников, П.П. Костык, Р.Ш. Заремук, Е.М. Алехина, Л.А. Туровская, С.В. Богатырева и др. Совершенствование методов

клонального микроразмножения плодовых и ягодных культур отражено в работах Р.Г. Бутенко, Н.В. Катаева, О.А. Леонтьев-Орлова, В.А. Высоцкого, Е.Н. Джигадло, Н.В. Соловых, С.А. Корнацкого, М.Т. Упадышева, О.В. Матушкиной, Н.Н. Коваленко и других ученых. Разработанные ими методики размножения плодовых культур используются, как общепринятые стандарты. Вместе с тем, для каждого сорта требуется индивидуальный подход по подбору наиболее эффективных композиций питательных сред.

Цель исследований – усовершенствовать приемы оздоровления и клонального микроразмножения сортов сливы домашней на основе оценки их адаптивного потенциала в условиях Краснодарского края.

Задачи исследований:

1. Провести оценку сортов сливы домашней различного эколого-географического происхождения по восприимчивости к вирусу шарки;
2. Выявить особенности распространения вируса шарки сливы в условиях Краснодарского края; определить штаммовый состав вируса и оптимальные сроки тестирования растений;
3. Подобрать состав питательной среды для размножения в культуре *in vitro* перспективных сортов сливы домашней, режим санации и сроки изолирования эксплантов;
4. Изучить особенности влияния биологически активных веществ группы янтарной кислоты на микрорастения разных сортов сливы домашней, позволяющих получить более качественные клоны;
5. Установить эффективность использования янтарной кислоты, сукцинатов калия и натрия в культуре *in vitro* на этапе мультипликации и ризогенеза.

Научная новизна исследований. Впервые в условиях южного садоводства разработан метод картограмм для оценки распространения вируса шарки сливы (PPV) в границах определенного участка сада. Выявлены 3 штамма вируса шарки сливы: PPV-D, PPV-M, PPV-W, проявляющие различную патогенность в условиях южного садоводства. Выделены отечественные сорта сливы домашней, проявляющие полевую устойчивость (Балкарская, Предгорная) и толерантность

(Кабардинская ранняя, Чернослив адыгейский и др.) к вирусу шарки сливы в условиях Краснодарского края. Впервые при микроразмножении сливы в культуре *in vitro* использованы соли янтарной кислоты. Усовершенствован способ клонального микроразмножения разных сортов сливы, на основе использовавшихся в культуре *in vitro* янтарной кислоты и ее солей (сукцинаты калия и натрия), позволяющих повысить выход качественных растений до 83 %.

Практическая значимость полученных результатов. Выделены сорта сливы домашней с полевой устойчивостью и толерантные к вирусу шарки сливы в условиях южного садоводства. Разработан метод картограмм для изучения распространения вируса шарки в насаждении, позволяющий оценить динамику распространения и выделить очаги инфекции. Разработан прием клонального микроразмножения сливы домашней на основе использования янтарной кислоты и ее солей, рекомендуемый для получения более качественных микрорастений сливы, позволяющий снизить себестоимость микрорастений на 80 руб. (142,1 руб.) и повысить рентабельность производства до 75,9 %. Практическая новизна подтверждена свидетельствами о регистрации баз данных №2017620325 «Физиолого-биохимические параметры органов и тканей сливы домашней...» и №2018620111 «Качественные показатели микрорастений сливы домашней...».

Методология исследований. Теоретической и методологической основой работы явились научные труды отечественных и иностранных исследователей. Использованы общепринятые и оригинальные полевые, лабораторные и статистические методы. Для достижения поставленной цели использован метод клонального микроразмножения.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования восприимчивости сортов сливы домашней к вирусу шарки, позволившие выделить сорта сливы с полевой устойчивостью, толерантные и восприимчивые к вирусу шарки сливы.
2. Разработанный метод картограмм на основе особенностей распространения вируса шарки сливы в границах определенного участка, позволяет выделить основные очаги инфекции, динамику распространения вируса.
3. Оценка эффективности использования янтарной кислоты и ее солей на различных этапах размножения сливы домашней в культуре *in vitro*.

4. Оптимизированный способ клонального микроразмножения сортов сливы домашней на основе установленных особенностей применения янтарной кислоты, сукцинатов калия и натрия позволяет повысить эффективность и безопасность (экологичность) размножения сортов сливы домашней.

Степень достоверности и апробация результатов исследований. Основные положения диссертационной работы доложены на заседаниях Учёного совета ФГБНУ СКФНЦСВВ (2010-2015 гг.) и научно-практических конференциях молодых учёных «Научное обеспечение агропромышленного комплекса» (Краснодар, 2011, 2012, 2014 гг.); международной дистанционной научно-практической конференции молодых ученых «Параметры адаптивности многолетних культур в современных условиях развития садоводства и виноградарства» (Краснодар, 2012 г.).

Личное участие автора. Диссертационная работа является обобщением научных исследований, проведенных в 2010–2017 гг. при личном участии автора. Соискателем проведены полевые исследования по изучению вируса шарки на культурной сливе, осуществлен сбор и обработка полученной в ходе выполнения работы исходной информации, а также проведены исследования по применению янтарной кислоты и ее солей в ходе клонального микроразмножения сливы.

Публикации результатов исследований. Основные материалы исследований опубликованы в 18 печатных работах, в т.ч. 5 статей в изданиях рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 статья опубликованная в зарубежном журнале, включенном в международную базу цитирования Scopus, получены свидетельства на две базы данных.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, рекомендаций производству, приложений. Работа изложена на 160 страницах основного текста, содержит 33 таблицы, 14 рисунков. Список использованной литературы включает 285 источников, в том числе 113 на иностранных языках.

1 СОСТОЯНИЕ ИЗУЧЕННОСТИ ВОПРОСА

1.1 Культура сливы, ее значение

Слива принадлежит к роду слива (*Prunus L.*), входящему в подсемейство сливовые (*Prunoideae Focke*), семейство розовые (розоцветные) (*Rosaceae Juss.*), порядок розовые (розанные) (*Rosales Lindl.*) (Витковский, 2003; Воробьев, 2001; Заремук, 2006, 2007; Журавель и др., 2007; Potter et al., 2007).

Слива домашняя – культивируемый вид, имеющий сложное происхождение от сортов алычи, которые передавали гены в результате интенсивной гибридизации (Заремук, 2006, 2007).

Из этого разнообразия видов только два имеют коммерческое значение – это Европейская слива (*Prunus domestica*), слива японская и их гибриды (Ерёмин, Витковский, 1980; Воробьев, 2001; Ерёмин, 2003; Тоор, 2012).

Самая ценная группа венгерки – сливы с овальными фиолетовыми плодами, большая часть которых характеризуется высоким содержанием сахара в плодах, особенно востребована при производстве чернослива (Венгерка домашняя, Стенлей, Сентябрьская, Венгерка итальянская и др.).

Также ценятся сорта группы ренклодов – сливы с округлыми плодами, основная окраска желто-зеленая или золотистая, способны накапливать значительное количество сахаров и обладают высокими десертными и технологическими качествами (Ренклод Альтана, Ренклод зеленый, Персиковая и пр.) (Журавель и др., 2007; Щербаков, Дерибизов, 2012).

Слива домашняя известна только в культуре. По данным Витковского В.Л. (2003) культивируют сливу преимущественно в умеренной зоне северного и южного полушарий в более семидесяти странах мира. Среди плодовых косточковых культур, по ежегодному объему производства плодов, слива занимает второе место в мире, уступая персику и нектарину (Витковский, 2003; Vitanova et al., 2006; Заремук, 2006, 2007).

По сведениям Всемирной продовольственной организации ООН (FAO) в настоящее время мировая площадь насаждений сливы составляет более 2,661 млн. га, а мировое производство сливы составляет – более 11,5 млн. тонн в год. Основными производителями считаются страны Европы и Азии. Россия производит около 142,0 тыс. тонн. Важнейшие возделываемые сорта в Европе – Тулеу Грас, Стенлей, Калифорния Блю, Бурбанк, Анна Шпет, Ренклод Альтана и др. (<http://www.faostat.fao.org>).

Крупными производителями сливы среди стран Южной Америки считаются Аргентина и Чили (Витковский, 2003). Чили принадлежит 18 % мирового производства слив, не считая чернослива (<http://www.chile.ru/fruits/plums>).

По данным Кальченко Е.Ю. (2014), в Российской Федерации, производственные насаждения сливы составляют менее 5 % от общей площади садовых насаждений.

Распространение культуры сливы связано с благоприятными природно-климатическими условиями. В Российской Федерации сливу возделывают в Нижнем Поволжье, Ростовской области, Краснодарском крае, Кабардино-Балкарии, Республике Дагестан (Заремук, 2006; Дубровская, 2015).

Основные сорта, выращиваемые на Северном Кавказе – Стенлей, Кабардинская ранняя, Кубанская легенда, Балкарская, Ренклод Альтана, Кубанский карлик, Венгерка кубанская, Чернослив адыгейский, Президент, Анна Шпет и др. При оптимальных условиях возделывания урожайность сортов достигает 20-25 т/га и более (Заремук, 2006).

Помимо этого сортимента кубанские селекционеры рекомендуют для промышленного выращивания ряд перспективных сортов сливы селекции СКФНЦСВВ: Подруга, Милена, Краснодарская, Герцог и ряд гибридов, а также интродуцированных сортов Чачакская улучшенная, Чачакская поздняя, Мелитопольская, Балкарская, Предгорная, обладающих комплексом хозяйственноценных признаков (Заремук, Богатырева, 2010; Заремук, 2006).

Плоды сливы имеют большое значение в питании человека, т.к содержат необходимые для нормального функционирования организма сахара, витамины С,

В₂, Р-активные вещества, органические кислоты, БАВ, минеральные, пектиновые, фенольные соединения и микроэлементы (Витковский, 2003; Савельев, 2004; Заремук, 2006).

Востребованность и широкое распространение сливы объясняется, прежде всего, ее скороплодностью, высокой и стабильной продуктивностью, высокими вкусовыми качествами и хорошей адаптационной способностью к различным почвенно-климатическим условиям (Ерёмин, 2000; Заремук, 2006).

1.2 Вирус шарки сливы (PPV), современные методы диагностики

Вирус шарки сливы (*Plum pox potyvirus*) является самым вредоносным вирусным заболеванием косточковых культур (Бунцевич, 2004; Scorza et al., 2006; Dzhuvinov et al., 2007; Glasa, Candresse, 2008; Кулешова, Рынза, 2010; Приходько и др. 2011; Чирков и др., 2012; Jevremović, Raunović, 2014). Возбудитель заболевания включен в списки ограниченно распространенных карантинных объектов Перечней ЕОКЗР (Европейская и Средиземноморская организация по карантину и защите растений) и Российской Федерации (Кулешова, Рынза, 2010; Приходько и др., 2011, 2013). Экономический ущерб от вируса шарки сливы в РФ оценивается более чем в 1 млрд. рублей (Магамедов и др., 2013).

По причине эпифитотийного развития вируса в XX веке, были раскорчеваны сотни тысяч деревьев в Болгарии и Югославии, произошло сокращения сортового разнообразия сливы в Европе, особенно сортимента старых, местных форм (Упадышев и др., 2009; Govorčín et al., 2012).

Первые симптомы вируса шарки сливы можно обнаружить на первых молодых листьях сливы, при достижении их нормального размера (Вердеревская, 1981; Бунцевич, 2004). Четкие признаки вирусного заболевания можно увидеть через 20-30 дней после цветения. Симптомы проявления вируса шарки очень разнообразны. Это могут быть и широкие расплывающиеся полосы и кольца до 1,5-2 см. Сначала рисунок имеет светло-зеленую окраску, далее становится

более желтым, хорошо просматривается на свету. Симптомы болезни в естественных условиях проявляются на листьях и плодах через 9-10 месяцев с момента заражения (Поспелов и др., 1978; Вердеревская, 1981; Bünter et al., 2006). У некоторых восприимчивых сортов сливы может вызывать сильный некроз листьев (Rosenbaum et al., 2006).

На Ренклодах, которые считается более устойчивыми к вирусу, при наступлении высоких температур признаки заболевания почти исчезают (Власов, Ларина, 1982)

Вредоносность шарки сливы, определяется такими факторами, как восприимчивость сортов, агрессивность и патогенность циркулирующих штаммов, климатическими условиями, уровнем агротехники сада (Stone Fruits, 1996; Бунцевич, 2004; Bünter et al., 2006; Sochor et al., 2012).

На плодах симптомы появляются летом, тогда на них можно обнаружить темно-фиолетовые кольца, пятна, полосы. У восприимчивых сортов на местах рисунка прекращается развитие плода, и на его поверхности появляются вдавленности, которые могут переходить на косточку. Вся ткань плода до косточки приобретает ржавый цвет, может частично отмирать и заполняться камедью. Поэтому плоды на зараженном дереве становятся окрашенными, как созревшие, но за 1-1,5 месяца до типичного для сорта срока созревания, плоды осыпаются. Под такими деревьями скапливается падалица (Инструкция..., 1968; Поспелов и др., 1978; Власов, Ларина, 1982; Вердеревская, 1981).

У сортов сливы, которые относят к практически устойчивым, симптомы проявляются на коже плодов узором по типу мозаики, в виде отдельных колец красноватого цвета и изгибов, или имеют пеструю мозаичную окраску без некротических вдавленностей и заметной деформации плодов, которая может замаскироваться общей окраской плода к моменту созревания и практически не влиять на внешний вид и качество плодов (Вердеревская, 1981).

Впервые симптомы вируса шарки были описаны Д. Атанасовым в Болгарии в 1932 году на пораженных листьях и плодах растений семейства *Prunus*. По данным Д. Атанасова, первые зараженные вирус шарки растения были

обнаружены в 1915-1916 гг. на границе Болгарии, Югославии и Македонии. Первая публикация об этом заболевании появилась в Болгарии в 1932 г. (Atanasoff, 1932).

Вирус – возбудитель оспы сливы, распространяется с зараженным прививочным и посадочным материалом, с больной корневой порослью и насекомыми переносчиками. Через семена и почву вирус не передается (Инструкция..., 1968; Sochor et al., 2012).

В настоящее время вирус шарки широко распространился на территории многих европейских стран: Норвегии, Польши, Нидерландов, Великобритании, Франции, Германии, Италии, Австрии, Болгарии, Венгрии, Греции, Румынии, Чехии и Словакии, Швейцарии, Югославии, Белоруссии и др. (Polak, 2002; Rebenstorf, Büttner, 2004; Cambra et al., 2006; Blystad et al., 2010; Kukharchik, Kovaleva, 2010; Fini et al., 2012).

В Северную Америку вирус шарки сливы добрался спустя почти 90 лет после первых сообщений об этой болезни в Европе (Polak, 2002; Cambra et al., 2006; Snover-Clift et al., 2007). В южной Америке вирус шарки сливы распространен в Чили и Аргентине (Fiore et al., 2010).

На территории РФ в 90-е годы вирус шарки сливы был обнаружен в Краснодарском крае (Бунцевич, 1997), позже в Ставропольском крае, в Республике Кабардино-Балкария и Волгоградской области (Добржанская и др., 2001; Приходько и др., 2008).

Помимо названных регионов карантинное заболевание обнаружено и в Московской, Белгородской, Ростовской, Воронежской, Липецкой и Тамбовской областях (Кулешова, Рынза, 2010).

В Краснодарском крае, по данным Карантинной инспекции, шарка зарегистрирована в 4 районах на общей площади 112,3 га: Усть-Лабинском (ОАО «Агрообъединение «Кубань») – 3,5 га, Тимашевском – 62,98 га, Крымском – 0,57 и Динском районах (ОАО «Агроном») – 15, 25 га (<http://www.fsvps.ru>).

Вирус шарки сливы поражает помимо сливы (*Prunus domestica* L.), абрикос (*Prunus armeniaca* L.), персик (*Prunus persica* (L). Batsch.), нектарины (*Prunus*

persica var. *nucipersica* (*Borkh.*) *C.K. Schneid., hybrids*), миндаль (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb, син. *P. amygdalus* (L.) Batsch., *Amygdalus communis* L., *Amygdalus dulcis* Mill.), черешню (*Prunus avium* (L.), вишню (*Prunus cerasus* L.) (Вердеревская, 1981; Damsteegt et al., 2007; Kamenova, 2008; Capote et al., 2009; Fini et al., 2012; Sochor et al., 2012). Кроме того, может поражать декоративные и дикорастущие разновидности р. *Prunus* L.: миробалан (*P. cerasifera* Ehrh.), терн (*P. spinosa* L.), американскую сливу (*P. americana* Marsh.), *P. nigra*, *P. tomentosa*, *P. pumila* и др. (Polák, 2006; Kamenova, 1997, 2008; Çağlayan et al., 2012).

Чешский ученый J. Polák (2006), неоднократно обнаруживал PPV в листьях Бирючины обыкновенной и Бересклета европейского.

По данным Н. Baumgartnerová (1996) из Словакии, вирус шарки сливы в состоянии поражать растения, которые не являются членами рода *Prunus*, в частности грецкий орех (*Juglans regia* L.). Однако тестирования в двух независимых лабораториях не подтвердили статус грецкого ореха в качестве нового хозяина PPV (Polák, 2006). Носителями вируса шарки слив могут быть – паслен черный, клевер белый, яснотка белая, лютик едкий, белый донник лекарственный, клевер ползучий и др. (Еремин, Витковский, 1980; Manachini et al., 2007; Damsteegt et al., 2007; Sochor et al., 2012).

В. Manachini, Р. Casati и др. (2007) получили положительные результаты передачи вируса шарки PPV-М тлей *Myzus persicae* от инфицированных травянистых резерваторов (клевер ползучий, клевер луговой, ромашка аптечная) к древесным культурным растениям (персик).

В. Salvador и др. (2008) говорят о том, что у некоторых изолятов, распространяющихся в течение длительного времени в травянистых растениях, способность к инфицированию деревьев уменьшается. Разные штаммы вируса могут заражать не одни и те же виды травянистых растений.

Изучение путей распространения вирусных заболеваний имеет важное значение для разработки действенного способа борьбы с ними (Приходько и др., 2008).

Передача вируса шарки на дальние расстояния осуществляется, в основном, за счет распространения зараженного посадочного материала и его частей (клоновые подвой и черенки). Передача на короткие расстояния происходит преимущественно насекомыми (Jordović, 1963; Вердеревская, Маринеску, 1985; Sochor et al., 2012).

В насаждении распространение вирусов чаще происходит при посредстве сосущих насекомых, в частности, тлей. Вегетативный путь заражения сливы вирусом шарки первым экспериментально установил Д. Атанасов в 1935 г. (Вердеревская, 1981).

По данным А.В. Андреева, А.И. Полинковского и др. (1983) основной путь распространения вируса шарки сливы – это перенос его осенними ремигрантами *Brachycaudus cardui*, *B. helichrysi* и *Myzus persicae*.

Химические обработки в борьбе с тлями проводятся, как правило, весной-летом, однако, это не гарантирует их низкой численности осенью. Чаще всего распространению способствует массовый лет и питание тли в осенний период, когда борьба с сосущими вредителями уже не ведется. Имеются данные о более чем 20 видах тли, но самыми активными векторами являются *Aphis craccivora* Koch, *Brachicaudus helichrysi* Kalt, *B. persicae*, *B. cardui* L., *Phorodon humuli* Schr., *Aphis fabae* Scopoli (Aphididae), *Aphis gossypii* Glover (Aphidae), *Aphis spiraecola* Patch (Aphididae), *Passerini* (Aphididae), *Myzus persicae* Sulzer (Aphididae) и др. (Андреев и др., 1983; Ратушняк, 2004; Manachini et al., 2007; Moreno et al., 2009; Кулешова, Рынза, 2010; Çağlayan et al., 2012; Jevremović, Paunović, 2014).

В насаждениях сливы Краснодарского края доминирующим видом тли является сливовая опыленная тля (Методическое и аналитическое обеспечение, 2010).

Поэтому изучение растений первоначальных резерваторов инфекции, прежде всего, в зоне сильного распространения данного патогена на культурных, сорных и дикорастущих растениях является необходимой задачей (Основные методы фитопатологических исследований, 1974).

Характеристика вируса шарки сливы (*Plum pox potyvirus*). По современной классификации вирусов растений, вирус шарки сливы (*Plum pox potyvirus*) принадлежит к одноцепочным РНК (+) – содержащим вирусам, семейство *Potyviridae*, род *Potyvirus* (Cambra et al., 2006; Упадышев, Донецких, 2008). Вирионы нитевидные, размером 760х20 нм (Вердеревская, 1981; Власов, Ларина, 1982; Stone Fruits, 1996). Вирусы данного семейства вызывают в пораженных клетках появление характерных образований в виде пластинок, вертушек, кристаллов, которые обнаруживаются при электронной электроскопии (Калашян, 1973).

В настоящее время вирус шарки достаточно хорошо изучен на молекулярном уровне и даже используется в качестве вектора в биотехнологии (Cambra et al., 2006).

При идентификации возбудителей используют показатели, которые характеризуют размер, форму, строение и физико-химические свойства вирусных частиц. Принимается во внимание тип проявляющихся признаков у поражаемых растений, вид переносчиков.

Один возбудитель может иметь различные генетические варианты, которые возникают в результате изменчивости, при этом они имеют одинаковую морфологию и биохимический состав, но различаются по структуре белков. Такие генетические варианты называют штаммами. Штаммы могут различаться по серологической специфичности, отношению к температуре, вирулентности, электрофоретической подвижности, эпидемиологическим свойствам, географии распространения, патогенности для различных представителей косточковых, могут иметь несовпадающий круг переносчиков (Келдыш, Помазков, 2003; Cambra et al., 2006; Чирков и др., 2012, 2015). Штамм, как таксономическая категория, отражает существующее внутривидовое разнообразие возбудителей (Келдыш, Помазков, 2003).

Серологические и молекулярные различия привели к разделению вируса шарки на различные штаммы. Геномный анализ показал, что в настоящее время распространены 9 штаммов вируса: *PPV-D* (Dideron), *PPV-M* (Marcus), *PPV-EA* (El

Amar), *PPV-C* (Cherry), *PPV-CR* (Cherry Russia), *PPV-W* (Winona), *PPV-T* (Turkish), *PPV-Rec* (Re-combinant), *PPV-An* (Ancestral) (Cambra et al., 2006; Zagrai et al., 2011; Чирков и др., 2012, 2015; Приходько и др., 2011, 2013).

Наибольшее распространение имеет штамм *PPV-D* (Dideron). Он обнаружен в Европе, США, Канаде, Южной Америке, Тунисе, Казахстане, Китае, Японии, Белоруссии и др. (Polak, 2002; Rebenstorf, Büttner, 2004; Boulila et al., 2004; Rosenbaum et al., 2006; Snover-Clift et al., 2007; Kamenova, 2008; Kensaku et al., 2011; Salavei et al., 2012; Rozák et al., 2014). Изоляты этого штамма поражают практически все восприимчивые растения рода *Prunus*. Из культурных растений поражают преимущественно сливу и абрикос, реже персик. Данный штамм вируса шарки сливы считается не эпидемической формой, более распространен в Западной и Центральной Европе (López-Moya et al., 1997; Polak, 2002; Rebenstorf, Büttner, 2004; Bünter et al., 2006; Приходько и др., 2011).

По данным I. Zagrai и др. (2009, 2010, 2012), A. Briciu и др. (2012) в Румынии вирус шарки ограничен несколькими районами и представлен в основном штаммами *PPV-D* и *PPV-Rec*. Ученые S. Spiegel, Е.М. Kovalenko и др. (2004) обнаружили вирус шарки сливы на диком абрикосе и в коллекции культурной сливы в южном Казахстане, где он представлен двумя штаммами *PPV-D* и *PPV-M*.

Штамм *PPV-M* имеет большее распространение в восточной части Средиземноморья, юго-восточной и центральной Европе. Этот штамм более вредоносен для персика, но может поражать также и сливу (Polak, 2002; Приходько и др., 2011; Dallot et al., 2011), считается самым агрессивным, патогенным штаммом (Dallot et al., 2011; Zagrai et al., 2012).

L. Predajňa, Z. Šubr и др. (2012) говорят, что при смешанном заражении, штаммы *PPV-D* и *PPV-Rec*, могут замещаться более конкурентоспособным штаммом *PPV-M*.

Филогенетический анализ показал, что существует 2 подгруппы штамма *PPV-M*. Изоляты Средиземноморских стран (Франция, Италия, Кипр и Греция)

относятся в ветви *PPV-Ma*, тогда как изоляты собранные в Центральноевропейских и Восточноевропейских странах (Болгария, Чешская Республика, Сербия и Словакия), принадлежали к ветви *PPV-Mb* (Myrta et al., 2001; Dallot et al., 2011; Glasa, Candresse, 2012).

Изоляты штамма *PPV-Rec* являются естественными рекомбинатами между штаммами *PPV-D* и *PPV-M*. Генетическое разнообразие изолятов *PPV-Rec* от югославских форм (Сербия, Босния и Герцеговина) в 2 раза больше, чем изолятов *PPV-Rec*, полученных до настоящего времени из других стран (Албания, Болгария, Чешская Республика, Германия, Венгрия, Словакия).

По словам М. Glasa, S. Paunović и др. (2005) генетическая однородность подтверждается анализом рекомбинантного штамма *PPV* из Сербии и поддерживает региональное происхождение этой подгруппы. Это говорит о состоятельности гипотезы, что бывшая Югославия является центром дисперсии *PPV-Rec* (Szathmáry et al., 2010).

Ученые С. Ulubas Serce, T. Candresse и др. (2009) обнаружили в садах провинции Анкара (Турция) 16 изолятов вируса шарки сливы. Из известных штаммов были идентифицированы *PPV-M* и *PPV-D*. Часть образцов характеризовалась уникальной перекомбинацией в гене НР-Pro, и не принадлежащей к уже известным штаммам. Ученые предположили, что это новый штамм вируса шарки, ограниченно распространенный в окрестностях Анкары, который предложили назвать *PPV-T* (Турция) (Çağlayan et al., 2012).

В 2012 г. был идентифицирован еще один штамм вируса шарки на сливе, обнаруженный в Восточной части Албании, которому предложено название *PPV-An* (Ancesor) (Palmisano et al., 2012).

Штамм *PPV-EA* имеет также ограниченное распространение, и является эндемиком для дельты реки Нил в Египте (Приходько и др., 2011, 2013).

Штамм *PPV-C* (Cherry) впервые был идентифицирован в Молдавии и Италии, позже в Белгородской и Самарской областях РФ, изоляты штамма поражает вишню и черешню (Приходько и др., 2011). Кроме того, нетипичные изоляты этого штамма были обнаружены в Москве и Поволжье. Анализ показал

идентичность с *PPV-C* лишь на 73-80,6 %. Таким образом, новый штамм, было предложено назвать *PPV-CR* (Cherry Russia) (Приходько и др., 2013; Chirkov et al., 2013; Glasa et al., 2013).

По данным D. James и A. Varga (2004), штамм *PPV-W* (Winona) был обнаружен впервые на одном участке в Канаде. Позже стали появляться сведения об обнаружении изолятов *PPV-W* в США на растениях сливы, которые были завезены из Украины (Mavrodieva et al., 2008, 2013).

По сведениям Ю.Н. Приходько и др. (2011) на территории Российской Федерации широкое распространение имеют изоляты *PPV-D*. Изоляты штамма *PPV-M* были выявлены в Ставропольском и Краснодарском крае на сливе и персике.

Считающийся ранее малораспространенным, штамм *PPV-W* выявлен российскими учеными Ю.Н. Приходько (2011), Sheveleva et al. (2012, 2013) в Московской, Белгородской, Воронежской областях и Ставропольском крае и Тверской области. Полученные данные указывают на широкое распространение данного штамма на косточковых культурах в Европейской части бывшего СССР. Кроме того, в Самарской области обнаружены изоляты *PPV*, отличающиеся от всех известных штаммов вируса шарки сливы по серологическим и молекулярным свойствам. Вынесено предположение о принадлежности этих изолятов к новому, ранее не известному штамму *PPV* (Приходько и др., 2011).

Из 9 штаммов вируса шарки сливы в Европейской части Российской Федерации обнаружены 6 (*D*, *M*, *Rec*, *W*, *C*, *CR*) и разнообразие изолятов вируса шарки сливы с каждым годом расширяется (Чирков и др., 2015). Внутривидовая дифференциация вируса шарки на 9 штаммов говорит о высокой изменчивости вируса и вероятности преодоления толерантности и устойчивости сортов сливы. Знание штаммовых различий вируса необходимы при оценке и селекции сливы на устойчивость к вирусу шарки, для разработки стратегии борьбы с этим вирусом.

Вредоносность вируса шарки сливы (*PPV*). Как известно вирусные заболевания оказывают отрицательное влияние на урожайность промышленных насаждений плодовых культур, а также снижают качество и выход посадочного

материала в питомниках. Помимо этого, снижают продуктивность маточных плантаций клоновых подвоев, влияют на качество плодов: снижают накопление сахаров и органических кислот; ухудшают зимостойкость деревьев, устойчивость к болезням и вредителям, не позволяют раскрыться продукционному потенциалу сорта в полной мере (Ллахматова, 1995; Упадышев и др., 2008; Бунцевич, Костюк, 2016).

Вызванное вирусом шарки сливы формирование мозаичного узора на листьях известно как фактор, снижающий содержание хлорофилла (за счет разрушения хлоропластов) и активность фотосинтеза в целом (Дорожкин и др., 1998; Neumüller, 2005; Jakab-Plyefalvi et al., 2011; Бунцевич и др., 2017). Ученые Баумгартнерова и Словакова (1998) и Zhan et al. (2000) при изучении влияния вируса шарки на растения абрикоса и персика установили, что у инфицированных растений наблюдался низкий уровень хлорофиллов, а содержание каротиноидов было выше, чем у здоровых растений.

Снижение урожайности от вируса шарки сливы может достигать 85 - 100 %. Плоды преждевременно опадают, возможно некротическое поражение древесины у восприимчивых сортов (Бивол и др., 1980; Вердеревская, Маринеску, 1985; Stone Fruits, 1996; Упадышев и др., 2008).

Вес плодов снижается в среднем на 20 %, уменьшается содержание сахаров до 25 %, повышается кислотность, т.е. ухудшаются вкусовые качества плодов (Упадышев и др., 2008).

Ранее считалось, что у большинства сортов сливы вирус шарки несущественно влияет на рост и развитие растения, ограничиваясь симптомами на листьях и плодах (Вердеревская, Маринеску, 1985). Однако имеются сведения о некрозе отдельных веток и деревьев в результате заражения вирусом шарки. Такая сильная реакция на заражение вирусом шарки наблюдалась у старого сорта Венгерка итальянская, Большой зелёный Ренклюд (Blattny, Heger, 1965).

У зараженных вирусом шарки деревьев диаметр ствола деревьев меньше, чем у здоровых на 38 %. Из-за снижения жизнеспособности деревьев увеличивается количество выпадов деревьев, снижается продуктивность с

единицы площади. В смешанных инфекциях с другими вирусами (*PDV*, *PNRSP*) усиливается проявление симптомов, повышается процент гибели деревьев (Neumüller, 2005).

Сорта сливы типа Венгерок поражаются вирусом шарки в большей степени, так как листья этих сортов богаты углеводами, поэтому более заселены тлей. В насаждениях толерантных сортов Ренклюд Улленса, Рут Герштетер вирус шарки распространяется гораздо медленнее, т.к. их листья с жестким кожистым покровом меньше приходятся по вкусу тлям (Гатина, 1989).

В клональном микроразмножении растений отмечено, что экспланты с бессимптомных (здоровых) растений сливы приживаются и регенерируют микропобеги более эффективно, чем экспланты с инфицированных вирусом шарки растений. Разница между уровнем регенерации микропобегов *in vitro*, изолированных из симптомированных и бессимптомных растений составляет 21-40 % в зависимости от сорта (Batukaev, Vamatov, Vinter, 2018).

В связи с распространением вируса шарки, появлением новых штаммов, возникает необходимость оценки современного состояния сливовых насаждений и дикорастущих резерваторов, локализации очагов *PPV* в Краснодарском крае, а производство безвирусного посадочного материала выдвигается в наиболее актуальные задачи питомниководства.

Современные методы идентификации вируса шарки сливы. Основанием для проведения диагностики являются симптомы заболеваний, появляющиеся на растениях. Первичный отбор растений с симптомами и без таковых проводится по внешним признакам. По симптомам осуществляется контроль за распространением заболевания (Помазков, 1972).

Однако диагностировать заболевание только по внешним признакам не всегда возможно. Очень часто одни и те же или очень сходные признаки поражения вызываются различными причинами. Такое явление называется фитопатологической конвергенцией. Ярким примером этого является хлороз плодовых культур (Помазков, 1972; Попкова, 1979). Поэтому, к недостаткам визуального метода диагностики следует отнести то, что с его помощью не

удается выявить скрытые (латентные) формы инфекции. Тем не менее, визуальный анализ дает основание для предварительного диагноза и выводов о природе заболевания (Келдыш, Помазков, 2003).

Основой любой технологии получения безвирусных клонов является проверка и тестирование кандидата в оздоровленный клон, в том числе и на латентную вирусную инфекцию (Куликов, Упадышев, 2015).

На сегодняшний день в практике широко используются два метода диагностики вирусов – полимеразная цепная реакция (ПЦР) и иммуноферментный анализ (ИФА) (Рязанцев и др., 2009; Кулешова, Рынза, 2010).

Иммуноферментный анализ (ИФА) позволяет за 2-3 дня в условиях лаборатории протестировать несколько сотен образцов, однако он не достаточно чувствителен для диагностики в конце вегетации и в состоянии покоя растений, при выделении вирусов из тканей коры и древесины, а также растений в культуре *in vitro*, где концентрация вирусов, как правило, низкая (Добржанская и др., 2001; Походенко, Упадышев, 2008).

Данный метод основан на взаимодействии изучаемого вируса с маркированными ферментами антителами. Результат серологического анализа определяется по цветной ферментативной реакции (Упадышев и др., 2008).

Эффективность тестирования вирусов плодовых растений зависит от многих факторов: важное значение имеют срок проведения диагностики, выбор органа растения для проведения диагностики. Например, в условиях юга России диагностику вирусных болезней плодовых культур методом ELISA необходимо проводить весной и в начале лета, при накоплении максимального количества вирусных частиц. В более поздние сроки, под воздействием высоких температур, в результате неравномерного распределения вирусных частиц в растении и инактивации вирусов, может быть получен ложный отрицательный тест (Упадышев и др., 2008; 2011).

В настоящее время в России разработано несколько тест-систем, основанных на принципе ИФА. Система Пиротест, разработанная российскими учеными позволяет эффективно идентифицировать *PPV* в растениях косточковых

культур, поэтому эффективна для массовой диагностики *PPV* при фитосанитарном мониторинге и сертификации саженцев (Приходько и др., 2008).

Российскими учеными разработан метод иммунохроматографии (ИХА) в пористых мембранах (тест-полоски). Данный экспресс-метод создан на основе моноклональных антител к вирусу шарки и наночастиц коллоидного золота, используемого в качестве маркера (CG). Надежность метода получила высокую оценку Европейской организацией по защите растений, данный метод включен в диагностические протоколы EPPO (Byzova et al., 2010; Бызова и др., 2010; Чирков и др., 2012).

На сегодняшний день самый распространенный и постоянно совершенствующийся метод диагностики вируса шарки сливы - полимеразная цепная реакция (ПЦР) (Jarošová et al., 2010; Pasquini, 2010; Briciu et al., 2012).

Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами – короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18 - 30 букв. Каждый из праймеров комплементарен (сопоставим) с одной из цепей двуцепочечной матрицы, обрамляя начало и конец амплифицируемого участка. Полимеразную цепную реакцию проводят в амплификаторе — приборе, который обеспечивает периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1°C. Во избежание испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло, например вазелиновое. Добавление специфических ферментов может увеличить выход ПЦР-реакции (Вартапетян, 1991; Real-Time PCR, 2002; James et al., 2003; Capote et al., 2006, 2009; Jarošová et al., 2010; Briciu et al., 2012; <http://molbiol.ru>; <http://www.lytech.ru/Inform/pcrmethod.htm>).

По данным П.А. Походенко и М.Т. Упадышева (2008 а), метод ПЦР при тестировании растений *in vitro* является более чувствительным, чем ИФА. ПЦР позволяет с высокой степенью достоверности выявить вирус *PPV* в древесине растений (Кулешова, Рынза, 2010).

В России разработкой отечественных вариантов ПЦР занимаются Приходько, Ю.Н., Чирков С.Н., Добржанская Е.О., Упадышев М.Т., Походенко П.А. и др.

Наиболее действенный прием борьбы с *PPV* – получение безвирусного посадочного материала, а надежные методы вирусологического контроля необходимы на всех этапах производства. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) является наиболее эффективным высокочувствительным для диагностики *PPV*. Методом ПЦР можно достоверно выявить *PPV* в пробирочных растениях (Добржанская и др., 2001; Походенко, Упадышев, 2008 а; Рязанцев и др., 2009).

Комплексный подход, который включает в себя биологическое тестирование, серологические и молекулярные методы, используя, утвержденные реактивы и методы, рекомендуются в протоколе EPPO (EPPO Standard PM 7/32 (1), 2009) для обнаружения и идентификации *PPV* (Cambra et al., 2006; Кулешова, Рынза, 2010).

В связи с высокой вредоносностью и изменчивостью вируса шарки сливы методы диагностики на вирусоносительство постоянно совершенствуются.

1.3 Методы борьбы с вирусом шарки сливы

Вирусные заболевания плодовых растений являются хроническими и системными. Если растение было однажды инфицировано, дерево остается зараженным в течение последующей жизни. Поэтому вирусологический контроль подвойного и привойного материала – одно из важных условий при производстве саженцев. Методы борьбы с вирусными заболеваниями являются профилактическими, а не лечебные, в связи с системным характером протекания заболеваний (Вердеревская, 1981).

Эффективных способов борьбы с вирусом шарки сливы до сих пор не найдено. В основном принимаются профилактические меры по ограничению распространения вируса шарки сливы, включающие в себя: использование

оздоровленного безвирусного посадочного материала, выращивание устойчивых (толерантных) сортов, пространственную изоляцию, соблюдение агротехники, комплекс защитных мероприятий насаждений от тлей – переносчиков вируса, мониторинг (Журавель и др., 2007).

Устойчивость к повреждению вредными организмами, в том числе и вирусу шарки сливы (Богданов, 2003), кроме устойчивости к комплексу неблагоприятных абиотических факторов среды (зимостойкость, устойчивость к засухе) является одним из важнейших критериев сорта (Витковский, 2003; Заремук, 2006).

Устойчивость растений, патогенность вирусов и их штаммов напрямую зависит от степени защитной реакции клетки на инфицирование (Тихонова, 2016).

Выведение и внедрение в производство иммунных и высокоустойчивых форм и сортов сливы является наиболее радикальным методом борьбы с вирусом (Бивол и др., 1980; Лахматова, 1995).

Основными типами устойчивости принято считать иммунитет (полная устойчивость), толерантность и сверхчувствительность, т.е. толерантность, рассматривается как одно из состояний устойчивости к возбудителям (Малиновский, 2010).

Природа толерантности растений к вирусам до конца не изучена. При накоплении вирусных частиц в клетках растений расходуются ресурсы хозяина, нарушается функционирование отдельных клеток и их органелл. При этом происходит активация различных защитных механизмов растения-хозяина, которые работают на ограничение распространения вируса и требуют определенной перестройки метаболизма (Реунов, 1999; Neumüller, 2005).

Различают несколько форм толерантности. В одних случаях вирус распространяется и накапливается по всему растению, при этом четкие симптомы заболевания отсутствуют, в других – размножение вируса в растении ингибируется, но симптомы заболевания хорошо выражены, и третья форма толерантности – ослабление симптомов (вплоть до полного отсутствия) и слабое накопление вирусных частиц (Ragetti, 1967; Shafer, 1971). То есть, чаще всего,

говоря о толерантности к шарке, подразумевается толерантность к симптомам (Бивол и др., 1980; Кеглер и др., 1983).

Толерантными считаются те сорта, клоны, которые в течение 5 лет наблюдений после экспериментального заражения не дали симптомов, либо после первоначального слабого проявления симптомов в дальнейшем их не проявляли. По Д. Трифонову толерантными считаются те сорта, у которых процент поврежденных сортов не превышает 5 % (Кеглер и др., 1983).

Генетическая резистентность к вирусу шарки сливы (*PPV*) является самой надежной альтернативой для долгосрочной борьбы с этой болезнью (Scorza, Ravelonandro, 2006).

Устойчивость сортов к наиболее вредоносным заболеваниям, могла бы способствовать повышению эффективности садоводства и повышению его экологичности (Богданов, 2003).

В настоящее время активно развивается такое направление, как трансгенез. Ученые М. Ravelonandro, R. Scorza и др. (2000) на протяжении длительного времени занимаются развитием биотехнологического подхода к контролю за *PPV*, который является эффективным и экологически безопасным. Полученные гибридные формы сливы, в частности С5, имеющие *PPV* вставку СР (ген белка оболочки вируса), показали устойчивость к вирусу, и демонстрируют полноценность С5, как родителя в развитии новых устойчивых к шарке сортов сливы.

В России в таком направлении, как трансгенез работают С. Долгов, А. Фирсов, Р. Михайлов, Т. Серова, О. Шульга и др. Разработанная ими стратегия РНК интерференции демонстрирует высокую эффективность защиты растений от вирусной инфекции и, в частности, для получения косточковых культур устойчивых к вирусу шарки, что недостижимо методами традиционной селекции (Mikhailov et al., 2010; Долгов и др., 2011; Dolgov et al., 2013).

В Румынии, Польше, Испании, Чили были проведены испытания трансгенной сливы, трансформированной геном белка оболочки вируса шарки. В условиях сильного инфекционного давления трансгенный клон С5, названный

Honey Sweet, показал высокую устойчивость к вирусу (Wong et al., 2010; Zagrai et al., 2011).

Известны сорта сливы Mildora и Tegera выведенные при селекции на устойчивость к шарке, отличающиеся высоким качеством плодов, ранним вступлением в плодоношение (Paunovic et al., 2006; Stefanova et al., 2009).

Гибриды сливы, устойчивые к вирусу шарки, выведены в рамках селекционной программы в Чачаке (Сербия). В качестве материнских растений использован сорт Stanley, отцовских Čačanska Lepotica, Čačanska Najbolja и Stanley. Гибриды получили нумерацию P1-P7. Симптомы вируса шарки обнаружены на листьях гибридов P3 и P6, но плоды всех гибридов были без симптомов (Milisevic et al., 2011).

Селекционерами из Германии, ввиду отсутствия во всем мире иммунных сортов, разработана новая стратегия селекции на устойчивость, с использованием сверхчувствительности. Устойчивыми к вирусу считаются сорта Katinka, Hanita, Elena и Presenta и раннеспелый гибрид с регулярным высоким плодоношением и удовлетворительным качеством плодов, известный под именем Jojo с 1999 г. Гибрид способен расти здоровым в течение 10 лет в сильно инфицированных шаркой садах (Hartmann, 1999).

В связи с этим, очевидна необходимость оценки сортов сливы на восприимчивость к вирусу шарки, которая позволит выявить наиболее устойчивые или толерантные к вирусу сорта сливы отечественной селекции или интродуцированные.

В настоящее время основным способом борьбы с вирусными заболеваниями является перевод питомниководства на безвирусную основу. А также применение эффективных мер по защите растений, включающих в себя систему мониторинга с использованием современных методов диагностики, соблюдение пространственной изоляции, проведение дезинфекции орудий труда при проведении агротехнических работ и др.

1.4 Клональное микроразмножение в системе безвирусного питомниководства

1.4.1 Сущность клонального микроразмножения, преимущества, этапы

Одним из главнейших условий при закладке интенсивных насаждений плодовых культур является высокое качество посадочного материала. Долговечность насаждений и их урожайность зависит от качества саженцев. Это касается и сортовой чистоты, и фитосанитарного состояния саженцев.

Развитие безвирусного питомниководства неразрывно связано с применением биотехнологических приемов, применяемых для производства посадочного материала. В частности используется метод микроразмножения растений.

Метод клонального микроразмножения - получение генетически идентичных исходному экспланту растений в культуре *in vitro*, использует уникальное свойство соматической растительной клетки – тотипотентность, т.е. способность клеток полностью реализовывать генетический потенциал целого организма (Роговая, Гвоздев, 2005). Данный метод размножения растений разработан еще в 1957 г. Американские исследователи Скуг и Миллер открыли возможность получения посадочного материала растений свободного от вирусных инфекций (Кузьмина, 2010).

1. Количество вирусных частиц уменьшается по направлению к апикальной меристеме, из-за слабого развития в ней проводящей системы – данная гипотеза лежит в основе оздоровления растений от вирусов (Митрофанова и др., 2014; Тихонова, 2016). Процесс оздоровления основан на том, что в тканях растений вирусы распространены не равномерно, а в клетках меристемы (в точках роста) вирусные частицы отсутствуют, так как эти клетки делятся гораздо быстрее, чем вирусные частицы ([http://www. lechebnik.info/7-3.htm](http://www.lechebnik.info/7-3.htm)).

Основные направления клонального микроразмножения – это оздоровление растений меристемным способом *in vitro* и непосредственно микроразмножение растений.

Оздоровление растений меристемным способом и клональное микроразмножение позволяют:

1. Освободить (оздоровить) растения от инфекций, в том числе вирусной и фитоплазменной.
2. Получить генетически однородные растения, полученные от одного маточного растения, в короткие сроки.
4. Работать круглогодично, получать большое количество посадочного материала;
5. Размножать культуры, которые трудно размножать традиционными способами (Роговая, Гвоздев, 2005).
6. Получить более высокую урожайность с деревьев, выращенных *in vitro*.

Процесс клонального микроразмножения заключается в нескольких этапах:

- Поиск и отбор маточных растений, изоляция и ввод эксплантов в культуру *in vitro*.
- Этап собственно микроразмножения, т.е. получение большого количества качественных мериклонов.
- Этап ризогенеза размноженных мериклонов.
- Адаптация укорененных микрорастений к нестерильным условиям среды. Доращивание их в условиях теплицы (Методические рекомендации, 2005; Роговая, Гвоздев, 2005).

Благодаря совмещению этапов культивирования микрорастений *in vitro* с хемотерапией сокращается время оздоровления, повышается выход безвирусных растений. В лаборатории защиты растений ВСТИСП под руководством Упадышева М.Т. разрабатывают различные способы освобождения растений от вирусов. Усилиями его коллектива разработан метод хемотерапии с применением гидроксibenзойных кислот (салициловая, галловая, сиреневая), способствующий

повышению выхода безвирусных регенерантов ежевики, груши и рябины до 80-100 % (Куликов, Упадышев, 2015).

Магнитно-импульсная обработка прибором СИ-3, разработанном в отделе механизации ВСТИСП, позволяет освобождать от вирусной инфекции до 60-100 %. Частота импульсов прибора 3,2-12,8 Гц. При этом снижается себестоимость мериклонов в 1,8 раза (за счёт увеличения выхода здоровых растений и повышения коэффициента размножения) (Упадышев, Донецких, 2008).

Современные методики оздоровления плодовых растений от вирусов рассматривают клональное микроразмножение способом апикальных меристем, как часть комплексного подхода основанного на термо- хемо-, криотерапии и других методиках (Митрофанова и др., 2009; Чирков, 2009).

1.4.2 Введение эксплантов в культуру *in vitro*, подготовка растительного материала, сроки интродукции

Одним из важнейших этапов в технологии клонального микроразмножения является этап ввода эксплантов в культуру. Высокие потери эксплантов от поверхностной и внутренней инфекции, низкая эффективность стерилизаторов или высокая их токсичность для растительных клеток снижают результативность интродукции меристем в культуру.

Для уничтожения инфекции, находящейся на поверхности эксплантов, необходимо провести обработку растительного материала стерилизующими растворами, не повредив при этом внутренние ткани. В связи с этим успешность интродукции в культуру *in vitro* определяется правильным выбором стерилизующих препаратов и длительностью (экспозицией) обработки. В качестве стерилизаторов используются различные химические соединения.

Основная группа используемых стерилизаторов – ртутьсодержащие препараты, отрицательной стороной которых является высокая токсичность для человека.

Раствор сулемы или ртути двухлористой (HgCl_2) является самым распространенным стерилизующим препаратом. Как правило, применяется 0,1 %-й раствор с экспозицией от 1 до 10 минут. Применять рабочий раствор можно до 4 раз. После обработки необходимо 2-3 раз промыть экспланты стерильной водой по 2-3 минуты каждый раз (Методические рекомендации, 2005). Использование сулемы повышает выход стерильных эксплантов, но может надолго задерживать начало их регенерации (Муратова и др., 2005).

О.А. Леонтьев-Орлов, В.Г. Трушечкин и В.А. Высоцкий (1988) проводили оценку эффективности мертиолята, диацита, и сулемы при обработке эксплантов яблони. В результате работы установлено, что стерилизация диацитом 5-10 минут оказывает менее жесткое действие на апексы яблони, чем мертиолят, который приводит к некрозу эксплантов.

Ю.А. Майорова (2009) использовала 0,1 % раствор сулемы в экспозиции 8 минут для поверхностной обработки тканей косточковых культур. При этом эффективность обработки составляла 96 %. Она же использовала диацит – 0,1 % - й раствор в экспозиции 9 минут, эффективность обработки составила 91 %.

При введении хризантемы в культуру *in vitro* Х. Гранда (2009) также использовал 0,1 % -й раствор сулемы. Для обработки листьев время обработки составляло 1-2 минуты, для побегов 3-4 минуты.

Е.Н. Беседина (2015) применяла для обеззараживания эксплантов раствор йодида ртути (0,1 %), который обеспечил выход санированных эксплантов подвоев яблони на уровне 60 %.

При двухступенчатой схеме стерилизации, экспланты помещали на 2 секунды в 70 % этиловый спирт, далее на 15 минут в 0,1-0,2 %-м раствор сулемы. Для обработки используются верхушки не менее 2-3 см (Лапинская, 1998; Magyar-Tabori et al., 2011).

Для стерилизации эксплантов груши Л.В. Ломовская (2004) использовала сначала смесь перекиси водорода (3 %) с этанолом (96 %), потом обрабатывала экспланты 0,01 %-м раствором сулемы. В результате такой обработки экспланты груши практически полностью были освобождены от посадочной инфекции.

Токсичность ртутьсодержащих препаратов является их главным недостатком. Поэтому, постоянно ведутся поиски эффективных и малотоксичных стерилизаторов. Так в качестве стерилизаторов используют вещества, содержащие хлор. Существует большая группа стерилизующих препаратов на основе гипохлоритов натрия (Jones et al., 1979; Pua et al., 1983; Fiorino, Loreti, 1987).

Растворы гипохлорита натрия (NaClO) применяют в концентрации от 0,5 до 5 % с экспозицией 1-20 минут. Токсичность для растительных клеток – это главный недостаток препарата, последствий которого можно избежать, сделав промывку эксплантов в 8-10 порциях стерильной воды (Методические рекомендации, 2005). Иранские ученые успешно применяли раствор гипохлорита натрия при микроразмножении Гизелы (Fallahpour et al., 2015), ученые из Хорватии для обработки эксплантов вишни (Mihaljević et al., 2013) российские исследователи для обработки эксплантов осины (Зонтиков и др., 2013).

В настоящее время разработаны разнообразные схемы стерилизации для различных культур и сортов растений, в том числе с использованием бытовых дезинфицирующих средств. В качестве альтернативы высокотоксичным препаратам ртути С. Муратова, Д.Г. Шорников и др. (2010) использовали гипохлорит натрия в составе дезинфицирующего раствора торговой марки «Белизна» при размножении актинидии и лимонника китайского, соотношение препарата и стерильной воды 1:1-1:3. Эффективная экспозиция стерилизации при этом была от 2,5 до 5...8 мин, и обеспечивала выход 60...90 % стерильных эксплантов.

О.Р. Jones (1979) для обработки верхушек побегов подвоя яблони М 26 сначала промывал их 1 час под проточной водой, а далее обрабатывал их 40 минут 10 %-ным раствором гипохлорит натрия (действующее вещество

дезинфицирующего средства «Доместос»). После этого промывал экспланты в стерильной воде 5 раз.

Л.В. Иванова-Ханина (2014) использовала 50 %-ный раствор «Доместоса» (экспозиция 12 минут) для санации эксплантов малины и ежевики, при этом эффективность санации достигала 86,5 %.

Для санации побегов Оттава-3Е (подвой яблони) Е.С. Риа и др. (1983) проводили стерилизацию в 2 этапа: сначала на 5-10 секунд экспланты погружали в 95 %-ный спирт, а затем на 5 минут в 10 %-ный Jivex - и раствор NaOCl (0,6 %).

Соколов и др. (2013) эффективно использовали 10 % -й гипохлорит натрия и препарат Велтолен в концентрации 0,2 и 2 % для санации *Campanula sclerophylla*, *Daphne woronowii* и др.

А.В. Милехин и С.Л. Рубцов (2015) использовали для санации эксплантов хризантемы двухэтапную обработку сначала пероксидом водорода (12 %) в течение 5 мин., затем бытовыми препаратами «Белизна» или «Domestos» в разведении 1:9, с экспозицией 10 мин. С последующей тройной промывкой растительных объектов стерильной дистиллированной водой. При этом способе стерилизации выход жизнеспособных эксплантов составлял более 70 %.

Стерилизация эксплантов плодовых культур осложняется тем, что для них характерно сильное окисление раневой поверхности тканей, а используемые стерилизующие вещества только усиливают этот процесс. В конечном итоге значительная часть эксплантов оказывается нежизнеспособной.

В работе Л.Е. Ланской (2008) сообщается о высокой эффективности использования в качестве стерилизующего агента бытового средства «Fairgy» (выход жизнеспособных эксплантов составляет 90 %).

Гипохлорит кальция ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) используется в концентрациях от 3 до 9 %, считается менее токсичным, чем гипохлорит Na. Его главный минус – продолжительность обработки от 10 до 30 минут (Методические рекомендации, 2005).

Л.В. Алексеенко (1998) применяла гипохлорит кальция для санации апексов земляники. Наряду с ртутьсодержащими препаратами (диацид и сулема) он показал высокую эффективность.

Перекись водорода (H_2O_2) используется в концентрациях до 30 % (в основном для стерилизации семян) с экспозицией 20-60 минут. Достаточно одной промывки водой. Недостаток – очень длительная экспозиция (Методические рекомендации, 2005). При добавлении в раствор стерилизатора небольшого количества поверхностно активного вещества в количестве 0,1-0,05 % раствора, можно повысить эффективность стерилизации (Деменко, 2007).

По мнению С.А. Корнацкого (1991), обеспечить достаточно высокий выход стерильных эксплантов сливы на уровне сулемы, позволяет 0,01 % раствор йода.

С целью экономичного использования дорогостоящих добавок на этапе введения в культуру *in vitro* практикуют безгормональные среды. Некоторые исследователи вводили в питательную среду органические добавки, например, гидролизат казеина, который стимулирует активное развитие бактериальной микрофлоры, сапрофитных микроорганизмов (Алексеенко, 1998; Шипунова, 2003). Спустя неделю все заражённые сапрофитной микрофлорой растения выбраковывают, а оставшиеся «чистые» экспланты пассируют на обычные питательные среды для микроразмножения (Беседина, 2015).

И.В. Бартиш и др. (1994) использовали для стерилизации побегов груши белково-связывающий раствор - нитрата серебра в концентрации 0,1-0,3 %, обеспечивающий высокую эффективность обработки.

Вариантов поверхностной стерилизации эксплантов много. Однако, подбор для каждой культуры нетоксичных стерилизующих препаратов их концентрации, экспозиции, при которой достигается высокий уровень стерильности культуры и низкий уровень угнетения эксплантов, остается актуальным.

При интродукции эксплантов в культуру *in vitro* важно учитывать особенности исходного растительного материала.

Общие факторы, оказывающие влияние на эффективность микрোকлонального размножения можно разделить на две группы: физиологические и физические.

К физиологическим факторам относятся: происхождение, размер экспланта, ориентация его на среде, сортовая реакция на состав среды, срок интродукции в культуру (Методические рекомендации, 2005, Клональное микроразмножение растений, 2012).

Размер и расположение эксплантов. Размер экспланта, вводимого в культуру *in vitro* является одним из факторов, определяющих эффективность оздоровления и микроразмножения растений. С одной стороны, чем меньше размер изолируемого экспланта, тем выше вероятность оздоровления (Высоцкий, 2000), с другой стороны, чем меньше размер экспланта, тем ниже регенерационная способность меристематических тканей, тем труднее он приживается, а для образования конгломерата побегов необходим более длительный период времени (Методические рекомендации, 2005).

Ф.Л. Калинин и др. (1992) считают, что из меристем размером 0,1-0,2 мм без листовых примордиев, приживаются только 1-10 %. В связи с этим, если основной задачей работы является не оздоровление от вирусов, рациональнее использовать меристемы размером от 0,5 до 2,0 мм, которые состоят из конуса нарастания, а также подстилающего слоя ткани и 2-3 листовых зачатков. Такие экспланты легче регенерируют (Туровская, 1989; Методические рекомендации, 2005; Матушкина, 2008).

По мнению некоторых исследователей, экспланты из апикальных почек имеют лучший регенерационный потенциал по сравнению с боковыми (латеральными) почками (Туровская, 1989; Корнацкий, 1991; Соловых, Муратова, 2010), что можно объяснить содержанием специфических эндогенных регуляторов роста (ауксиноподобных веществ) в верхушечных почках, которые подавляют рост и развитие боковых почек (Высоцкий, 1986).

Сроки введения эксплантов в культуру *in vitro*. Для успешной интродукции эксплантов в культуру *in vitro* необходимо принимать во внимание

сезонность ростовых процессов, проходящих в растениях. Способность эксплантов к регенерации во многом определяется сроками изоляции эксплантов от исходных растений (Попов, 1975; Machnik, Grzyb, 1994). По мнению многих авторов, большей регенерационной активностью обладают экспланты отобранные в период активного роста побегов (Матушкина, Пронина, 1989; Лапинская, 1998; Муратова и др., 2005; Матушкина, 2008; Майорова, 2009).

Для сливы домашней, по мнению С.А. Корнацкого (1991), Р.М. Пугачёва (2003), оптимальным периодом для введения эксплантов в культуру *in vitro* является фаза интенсивного роста побегов.

Для подвоев яблони, по данным Бесединой Е.Н. (2015) сроки введения меристем различаются, для одних (ММ106, СК2, СК3, СК 7) лучшим временем изоляции в культуру *in vitro* является фаза роста побегов (май-июнь), для других (СК 4) – фаза распускания почек (март).

Если провести сравнительную оценку регенерационной способности эксплантов с позиции теории органогенеза, то согласно исследованиям И.С. Исаевой (1977), Л.Л. Бунцевича (2012) в марте-апреле (в условиях Краснодарского края) вся энергия растения направлена на подготовку к фазе цветения и оплодотворения, гинецей и андроцей цветка проходят завершающую стадию формирования. На этом этапе максимально интенсивно идет формирование всех органов цветка. В связи с этим можно предположить, что приживаемость меристем в этот период будет ниже, чем в период активного роста побегов, так как состав гормонов в это время обеспечивает реализацию генеративного ресурса.

По результатам исследований В.В. Вовк (2000) установлено, что для малины оптимальным сроком выделения меристем является период с середины мая до начала июня. В тоже время у Л.В. Ивановой-Ханиной (2014) уровень приживаемости и частота регенерации малины и ежевики в октябре был значительно выше, чем в феврале.

В.В. Шахов и его коллеги (2017) установили, что введение в культуру эксплантов черной смородины лучше проводить в летний и осенний период, когда приживаемость эксплантов составляла 77-89 %.

Для земляники лучшим периодом изоляции эксплантов в культуру *in vitro* является позднеосенний период, процент регенерации составлял в среднем 76,5 % (Мацнева, Ташмакова, 2018).

Для некоторых культур эффективнее использовать для инициации растения в период покоя. Это отмечено у сирени сортов «Мадам Лемуан», «Красавица Москвы» (Набиева, 2011), у вишни и некоторых сортов яблони (Высоцкий, 1986).

К физическим факторам культивирования микрорастений относятся температура, влажность воздуха, интенсивность освещения и др. Для большинства растений, в том числе и для сливы, благоприятной температурой культивирования является температура в интервале +22...26 °С днём и +18...22 °С ночью. Оптимальная относительная влажность воздуха в пределах – 65-70 %. С целью повышения эффективности размножения, для каждого вида и сорта растений необходимо индивидуально подбирать условия культивирования (Корнацкий, 1991; Методические рекомендации, 2005; Матушкина, 2008).

В связи с различной реакцией растений на факторы культивирования (срок введения в культуру, стерилизующие вещества, размер экспланта и др.), которая отражается на эффективности размножения, возникает необходимость индивидуального подбора оптимальных условий микроразмножения для каждого сорта растения.

1.4.3 Оптимальный состав питательной среды для микроразмножения сливы домашней

При клональном микроразмножении плодовых культур применяют питательные среды, различающиеся по составу: среду Мурасиге и Скуга,

Розенберга, Driver - Kuniyuki (DKW), Lloyd - McCown (Woody Plant Medium), Нича, Гамборга (B5), Quoirin-Leroivre, Хеллера, Уайта, Боксуса, Ли-Фоссада и Андерсона и другие (Шипунова, 2003; Муратова, 2005; Бунцевич и др., 2010 а; Ланская, 2007; Fallahpour et al., 2015).

В микроклональном размножении сливы применяют различные питательные среды: жидкую среду Woody plant medium (WPM) (Пугачев, 2003), среду Лепуавра и B5 (Шипунова, 2003; Бунцевич и др., 2010 а), среду Розенберга, модифицированную для плодовых культур (Луговской и др., 2004), среду Нича (Ланская, 2008). Наиболее подходящей для многих пород и сортов считается питательная среда Мурасиге-Скуга (МС) (Корнацкий, 1991; Методические указания, 2005).

На результативность клонального микроразмножения оказывают влияние все компоненты питательных сред: минеральные соли, витамины, углеводы и регуляторы роста. Состав питательной среды необходимо подбирать для каждого вида растений, и даже сорта, универсального рецепта для всех видов растений нет (Кузьмина, 2010).

Различные плодовые культуры проявляют разную эффективность размножения *in vitro* на различных питательных средах.

Исследования И.А. Райкова (2012) показали, что для микроразмножения малины лучше использовать Мурасиге-Скуга, чем среды Андерсона и Ли-Фоссада.

Учёные из Турции, подтвердили свою гипотезу (на гибридах фундука) о том, что для размножения растений лучше подходит среда, которая имеет минеральный и органический состав, как в семенах этих растений. На среде Driver-Kuniyuki (DKW) коэффициент размножения был выше на 23 %, а длина микропобегов в 3 раза больше по сравнению с контролем Woody plant medium (WPM) (Nas, Read, 2004).

По мнению Н.И. Туровской (1994) груша сорта Осенняя Яковлева более эффективно размножается на среде Ллойда-Маккауна, коэффициент размножения на которой составлял 1:23,3. Для подвоев яблони 62-396 и 54-118 оптимальной по

составу является среда Гамборга (B5). Через 1,5 месяца культивирования 100 % побегов подвоя 62-396 и 83 % подвоя 54-118 уже имели оптимальный размер для клонирования, на среде Мурасиге-Скуга таких побегов было только 67 %.

При регенерации меристем сливы домашней М.Е. Arena, О.Н. Caso (1992) также выявили преимущество использования среды Мурасиге-Скуга, перед средой Фоссарда.

Н.Н. Коваленко и Н.И. Медведева (2015) провели корректировку питательной среды Мурасиге-Скуга для микроразмножения сливы домашней, изменив гормональный и витаминный состав среды (витамин С – 1,0 мг/л; глицин – 1,0 мг/л), повысив тем самым коэффициент размножения эксплантов.

По мнению многих авторов наиболее подходящей для клонального микроразмножения косточковых культур, в частности сливы, считается среда Мурасиге-Скуга (MS) (Корнацкий, 1991; Шипунова, 2003; Методические рекомендации, 2005; Роговая, Гвоздев, 2005; Бунцевич и др., 2010). Отличительная особенность среды заключается в том, что она содержит много неорганического азота, который активизирует процессы соматического эмбриогенеза и органогенеза (Кузьмина, 2010).

Важнейшим технологическим элементом микроклонального размножения растений *in vitro* является использование веществ, регулирующих рост растений.

Фитогормоны представляют собой группу природных органических соединений, которые способствуют росту, развитию и дифференцировке растений. Для микроразмножения растений используются основные регуляторы роста - ауксины, цитокинины, гиббереллины. Они способствуют росту, дифференциации и органогенеза тканей растений в культуре (<http://www.biologydiscussion.com>).

Применение находят, как природные регуляторы роста – фитогормоны (метаболиты самих растений), так и их синтетические аналоги.

– Цитокинины: природный — зеатин, синтетические - 6-фурфуроаминопурин (кинетин), 6-бензиламинопурин (БАП), 2-изопентениладенин (2ip), 6-бензиладенин (БА) и др.;

- Ауксины: природный ауксин – индолил-3-уксусная кислота (ИУК) и его синтетические аналоги — α -нафтил-уксусная кислота (α -НУК) и индолил-3-масляная кислота (ИМК);
- Гиббереллины: гибберелиновая кислота (ГК) (Методические указания, 2005).

Ростовые реакции эксплантов в ходе клонального микроразмножения являются результатом сложного физиологического процесса, эффективность которого зависит от многих факторов (генотипа и состояния маточного растения, типа экспланта, стерилизующего вещества, этапа микроразмножения, условий культивирования). Определяющее значение в развитии эксплантов имеет состав питательной среды. При этом важную роль играет оптимальное соотношение внесенных в питательную среду биологически активных веществ (регуляторов роста), которые участвуют в регуляции процессов жизнедеятельности растений, в значительной степени определяя темпы роста и развития эксплантов (Бутенко, 1999; Кухарчик и др., 2002; Методические рекомендации, 2005; Верзилин, 2007; Бунцевич и др., 2013).

На различных этапах клонального микроразмножения сливы состав регуляторов роста меняется. В научных публикациях содержатся сведения об оценке экзогенных стимуляторов роста на разных сортах и растениях, о влиянии их концентраций и сочетаний, периода введения в культуру *in vitro* на процессы микроразмножения.

В.В. Роговая и М.А. Гвоздев (2005) говорят о возможности использования для микроразмножения сливы модифицированных питательных сред Розенберга, Лепуавра и Гамборга (B5).

Испытание питательных сред Хеллера, Уайта, Мурасиге и Скуга в исследованиях Ц.В. Тутберидзе и В.Н. Михайлюк (1999) показали, что лучшие результаты были получены на среде Мурасиге-Скуга при добавлении 6-БАП 0,1 – 0,3 мг/л.

D. Rusić с коллегами (2008) рекомендовал среду Мурасиге-Скуга для микроразмножения сливы сорта Ситница с добавлением 7 г/л агара, 20 г/л сахарозы, 2,0 мг/л 6-БАП и 0,5 мл/л ИМК.

На основании ряда опытов Л.Е. Ланской (2007, 2008) с сортами сливы: Евразия 21, Неженка, Аленушка, Орловский сувенир, Краса Орловщины рекомендовано использовать на этапе введения в культуру эксплантатов сливы питательную среду Нича с добавлением 1 мг/л ГК, а на этапе микроразмножения – среду Нича и Ли де Фоссарда.

С.А. Корнацким (1990) также было отмечено, что на этапе ввода эксплантов сливы в культуру *in vitro* оптимальной является среда по прописи Мурасиге и Скуга с добавлением 6-БАП 0,2 мг/л, а на этапе мультипликации – 1,0 мг/л. Максимальный коэффициент размножения наблюдался после третьего пассажа у сортов: Память Тимирязева 1:32, Десертная красная 1:28, а у сорта Евразия 21 коэффициент размножения увеличился в 2 раза только после пятого пассажа.

В целом, для получения большого количества побегов сливы, и стимулирования развития пазушных почек микрорастения сливы в среду вводят 6-БАП в концентрациях 0,5-1 мг/л (Корнацкий, 1991; Пугачев, 2003; Методические рекомендации, 2005; Бунцевич и др., 2010).

Большая работа по изучению индукции морфогенеза в культуре соматических тканей сливы домашней проведена С.А. Муратовой (2002, 2005). В результате проведенных исследований было отмечено, что оптимальной средой для регенерации побегов из каллуса и листовых тканей сливы является среда Мурасиге и Скуга, дополненная сахарозой или глюкозой 30 – 40 мг/л, 6-БАП или тидиазуроном 4 мг/л, НУК (ИМК) 0,2 или 0,5 мг/л. Для стимулирования образования корней микрорастения замачивали в растворе ИМК (50 мг/л) в течение 16-24 часов с последующим пассажем побегов на агаризованную питательную среду с содержанием ИМК 0,5 – 1 мг/л. Как легкоукореняемые, выделены сорта сливы Ода, Евразия 21, Этюд.

Группа ученых во главе с F. Sadeghi (2015) провели ряд исследований по оптимизации процессов мультипликации и ризогенеза у *Prunus Empryrean* 3 в условиях *in vitro*. Испытывали питательные среды: ½ Мурасиге и Скуга, Линсмайера и Скуга, COS, с добавлением ИМК в разных концентрациях (0,5; 1; 1,5; 2 мг/л). Наибольшее число побегов на сливе образуется при добавлении ИМК

в концентрации 0,5 мг/л. В результате на среде с добавлением 6-БАП – 0,4 мг/л средние показатели числа побегов оказались больше, чем на той же среде с концентрацией 6-БАП – 0,8 мг/л и на среде WPM с 6-БАП – 0,4 мг/л, где не было существенных отличий. При этом образуются более качественные корни.

Среда Мурасиге и Скуга с содержанием половиной дозы макросолей, с добавлением 0,2-0,5 мг/л ИМК, 20-40 мг/л флороглюцина и 15 г/л сахарозы лучше всего подходит для укоренения микрорастений сливы китайской (*Prunus salicina*) (Роговая, Гвоздев, 2005).

P. Miguel (2003) и его коллеги в опытах с культурой эмбрионов *Prunus «Capdeboscq»* использовали питательную среду Кворина-Лепуавра с содержанием: сахароза – 20 г/л, агар-агар – 7 г/л, 6-БАП – 0,1 мг/л, НУК – 0,1 мг/л и ГК в разных концентрациях (0,0; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0). Максимальный рост апикальной меристемы наблюдался при содержании ГК 7,5 и 10,0 мг/л, но при 10,0 мг/л происходило ухудшение развития корневой системы, а при 7,5 мг/л – уменьшение числа корней.

С.А. Корнацкий (1991) рекомендует использовать для стимулирования пролиферации у эксплантов сливы 6-БАП в количестве 0,5-1,0 мг/л, а в пассаже предшествующему укоренению побегов, снизить количество 6-БАП до 0,2-0,25 мг/л. Таким образом, можно повысить в 1,2-1,4 раза количество побегов длиной более 1,5 см.

По мнению Y.-N. Zou (2010) для успешного размножения сливы китайской (*Prunus salicina*) лучше использовать среду WPM с добавлением 0,3 мг/л кинетина и 1,0 г/л гидролизата казеина, 0,2 мг/л бензиладенина, 0,05-0,1 мг/л ИМК.

Эффективность самых распространенных и чаще всего используемых регуляторов роста в культуре *in vitro* изучена на многих плодовых, ягодных и цветочно-декоративных культурах. На повышение эффективности регенерации микропобегов влияет наиболее полный набор регуляторов роста в питательной среде (Бленда и др., 1983; Luo et al., 2005).

Вместе с тем, по мнению Н.В. Агафонова (1985) и его коллег, высокая насыщенность питательной среды гормональными препаратами приводит к

угнетению, и даже гибели эксплантов. Поэтому на этапе введения и микроразмножения побегов рекомендуется использовать только 6-БАП, на этапе введения от 0,5 до 1,5 мг/л, а на этапе собственно микроразмножения - до 1,5- 3,0 мг/л (Агафонов и др., 1983; Корнацкий, 1991; Методические рекомендации, 2005). Использование концентраций БАП свыше 3,0 мг/л на этапе мультипликации приводит к формированию очень коротких побегов у микрорастений красноватого цвета, которые для укоренения не пригодны (Туровская, 1994).

Ученые из Польши В. Borkowska и W. Litwinczuk (1993) вместо пуриновых цитокининов рекомендуют использовать тидиазурон, цитокинин ряда дифенилмочевины, обладающий большей активностью. Л.В. Алексеенко (1998) эффективно использовала тидиазурон (0,5 мг/л) на этапе мультипликации при клональном микроразмножении земляники.

В.В. Вовк (2000), считает, что на стадии размножения малины цитокинины структурного ряда дифенилмочевины (4-PU - 0,4 мг/л и TDZ - 0,1 мг/л) действуют в несколько раз эффективнее 6-БАП (2 мг/л) и способны повысить эффективность размножения ремонтантной малины до 100 %. Д.Н. Челябин (2012) успешно использовал цитокинины ряда дифенилмочевины (CPPU) для размножения элитных форм малины, а И.А. Райков (2012) при введении в культуру меристем смородины чёрной, что увеличивает выход жизнеспособных регенератов.

У яблони, использование различных цитокининов на этапе собственно микроразмножения показало, что наиболее быстрое размножение обеспечивается добавлением в среду 6-БАП, рост побегов ускоряет зеатин (Fiorino, 1983). По данным Д.Г. Шорникова (2008) наиболее эффективным регулятором роста для микроразмножения актинидии, является зеатин в количестве 1-2 мг/л.

По результатам исследований James, Thurbon (1981) присутствие тидиазулона на этапе мультипликации побегов подвоя М9, имеет последствие на этапе ризогенеза (ускоряется процесс образования корней).

Одной из частых проблем микроразмножения является витрификация побегов (стекловидность). По мнению О.В. Матушкиной и ее коллег (2008, 2012),

чтоб уменьшить уровень витрификации побегов необходимо снизить количество 6-БАП до 0,5 мг/л или добавлять более слабый цитокинин - кинетин (5,0 мг/л).

Используемые в культуре *in vitro* регуляторы роста – это дорогостоящие синтезированные вещества. Стоимость 6-БАП – 3623,7 руб/ г., ГК – 8302,4 руб/г по ценам Sigma-Aldrich 2018 года ([http:// sigmaaldrich.com](http://sigmaaldrich.com)). Кроме того, они являются токсически опасными веществами для человека: ГК умеренно опасна, 6-БАП токсичен.

В целом, данные об использовании в культуре *in vitro* аналогов дорогостоящих регуляторов роста более дешевыми веществами иной природы в публикациях встречаются не часто.

В практике плодоводства известно применение БАВ на основе янтарной кислоты для повышения продуктивности и качества плодов черешни, вишни и сахарной свеклы. Л.А. Бадовская, Н.И. Ненько и др. (1997) успешно применяли препарат «Универсальный», состоящий из смеси янтарной кислоты, фумаровой кислот, малеиновой, и 2(5Н)-фуранона (содержание янтарной кислоты не менее 85 %), посредством листовой обработки.

Е.Н. Гущина, Л.Д. Шаманская (2009) использовали янтарную кислоту (0,005 %) при размножении облепихи сорта Алтайская *in vivo*. Наибольший выход саженцев 1 сорта отмечался в варианте с сочетанием ИМК и янтарной кислоты - 32,8 %.

В культуре *in vitro* Ю.А. Майорова (2009) использовала янтарную и биоянтарную кислоту в концентрации от 0,5 до 1,0 мг/л, для повышения коэффициента размножения гибридов вишни, который составил при этом 1:20,4.

И.М. Фартзинова предлагала применять капли настойки лимонника (15-20 капель/л) в процессе микроразмножения груши. По результатам ее исследований это сокращает срок получения полноценных регенерантов и увеличивает коэффициент размножения. В качестве стимулятора роста при клональном микроразмножении подвоев яблони она рекомендует использовать экстракт родиолы в концентрации 10-30 капель/л (Патент № 2141524, 1999).

Д.Г. Шорников (2008) предложил для стимуляции побегообразования эксплантов элеутерококка колючего использовать совместно с 6-БАП (1 мг/л) и ГК (1мг/л) спиртовой экстракт корня элеутерококка.

Использование гелкарина GP-812 (2 г/л) при микроразмножении ежевики сорта Thornless Evergreen дает хорошие результаты, в то время как использование смолы гуара по данным этих же авторов, снижает интенсивность размножения, хотя микрорастения развиваются более выровненными и крепкими (Fira et al., 2010).

В работе В. Benmahiou et al. (2012) сообщается, что добавление в среду Мурасиге-Скуга метатополина в количестве 2 мг/л в сочетании с витамином В₅ и 4 мг/л 6-бензиладенина, способствует образованию оптимального количества побегов *Pistacia vera L.* с качественными признаками.

Этап укоренения микропобегов (ризогенеза) является завершающим этапом микроразмножения и предшествующим процессу адаптации растений к нестерильным условиям. Процессы корнеобразования зависят от ряда факторов, в числе которых сортовые особенности, тип ауксина и его концентрация, способ его применения, количество проведенных пассажей.

Лучшими средами для корнеобразования косточковых культур, по мнению ряда авторов, являются питательная среда Хеллера и среда Мурасиге и Скуга разбавленная в 2 раза, с содержанием сахарозы 15 мг/л, и с исключением мезоинозита, способствующего образованию каллуса (Корнацкий, 1991; Методические рекомендации, 2005; Zou, 2010).

Для успеха ризогенеза микропобегов сливы из среды исключаются цитокинины (препятствуют процессу ризогенеза) и добавляются ауксины. Самый распространенный и часто используемый ауксин – ИМК (индолил-3-масляная кислота) (Корнацкий, 1991; Луговской и др., 2004; Методические рекомендации, 2005).

Чаще всего используют ИМК в количестве 0,5-1 мг/л, однако имеются данные, что микрорастения сливы китайской (*Prunus salicina*) хорошо укореняются при концентрации ИМК 0,2-0,5 мг/л (Zou, 2010). Превышение

концентрации ИМК в среде более 2 мг/л, по мнению С.А. Корнацкого (1991), вызывает образование гипертрофированных корней.

По мнению некоторых учёных более эффективным способом ризогенеза, чем введение ауксинов в питательную среду, является погружение побегов в стерильный водный раствор ИМК (25-30 мг/л) на 12-24 часа (Шипунова, 2003; Бунцевич и др., 2010). Другим способом индукции укоренения является обработка микропобегов сливы тальковой ауксинсодержащей пудрой ИМК с концентрацией 0,125 %, 0,25 % и ИУК с концентрацией 0,25 % и 0,5 % (Корнацкий, 1991; Корнацкий и др., 1991; Шипунова, 2003). Применение такой пудры выявило различную реакцию сортов на нее, которую следует учитывать при укоренении микрочеренков сливы (Корнацкий, 1991).

Кроме того, Р.М. Пугачёв (2003) считает, что применение технологии укоренения микропобегов сливы на ионитных субстратах *ex vitro*, является перспективным направлением.

По мнению многих авторов, у большинства плодовых культур, на всех этапах микроразмножения в культуре *in vitro* имеются свои сортовые особенности, поэтому регенерационная способность, мультипликационная активность зависит больше от генотипа, чем от модели размножения (Леонтьев-Орлов, 1986; Туровская, 1994; Высоцкий, 1998; Матушкина, 2008; Райков, 2012; Иванова-Ханина, 2015).

В связи с этим можно сделать вывод о том, что единого мнения авторов о воздействии ростовых веществ на интенсивность роста, мультипликации и ризогенеза микропобегов плодовых в культуре *in vitro* нет. Для каждого сорта растения необходимо подобрать свой оптимальный состав среды для микроразмножения.

В целом, анализ научной литературы отечественных и иностранных авторов показывает, что в клональном микроразмножении сливы домашней, ростовые реакции эксплантов на известные стимуляторы роста (ИМК, БАП и др.) изучены достаточно, однако информация об использовании БАВ на основе янтарной кислоты не встречается.

2 ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты исследований

Объектами исследований были 29 сортов сливы домашней различного эколого - географического происхождения (табл. 1) (Атлас, 2009; Заремук, Богатырева, 2010; Журавель и др., 2007).

Таблица 1 – Краткая характеристика объектов исследований – основных сортов сливы домашней

Название сорта, краткая характеристика	Фото
Анна Шпет. Сорт создан в Германии. Срок созревания – поздний. Дерево среднерослое. Плоды широкоовальные или широкояйцевидные (40-50 г.), красновато-фиолетовые с много-численными серыми подкожными точками, покрыты густым сизым налетом. Урожайность 20-30 т/га. Сорт зимостойкий, относительно засухоустойчивый. Устойчив к основным болезням.	
Балкарская. Сорт получен в Северо-Кавказском НИИ горного и предгорного садоводства. Срок созревания – средне-поздний. Дерево среднерослое. Плоды яйцевидно-округлой формы, красно-фиолетовые, плотные, масса до 50 г. Урожайность до 17,5 т/га. Зимостойкость и засухоустойчивость средняя. Высокоустойчив к кластероспориозу и монилиозу.	
Блюфри. Сорт американской селекции, получен от скрещивания сортов Стенлей и Президент, самоплодный. Срок созревания поздний. Сила роста высокая, ослабевает с началом плодоношения. Плоды округло-эллиптической, ассиметричной формы, темно-синей окраски, с обильным светлым налетом (60-70 г). Зимостойкость высокая, засухоустойчивость средняя.	

Герцог. Сорт создан в СКФНЦСВВ от скрещивания сортов Метелка и Великий Герцог. Срок созревания – средний. Дерево среднерослое, компактное. Плоды крупные 45-50 г, удлинено-овальные, фиолетово-синие с сильным восковым налётом. Урожайность средняя – 15 т/га. Зимостойкость средняя, засухоустойчивость высокая, устойчив к кластероспориозу, устойчивость к монилиозу выше-средней.



Гилберт. Сорт шведской селекции, от скрещивания сортов Онтарио х Рут Герштетер. Раннего срока созревания. Дерево среднерослое. Плоды широкоовальные, бордово-фиолетовые с подкожными точками, крупные (40-45 г). Сорт зимостойкий.



Ренклюд Донецкий. Создан в СКФНЦСВВ совместно с Артемовской станцией садоводства от скрещивания Ренклюд альтана и Стенлей. Проходит экологические испытания. Дерево среднерослое. Плоды округлые, красно-фиолетовые, 50-55 г. Зимостойкость выше средней, засухоустойчивость выше средней. Устойчив к основным заболеваниям.



Кабардинская ранняя. Сорт создан в НИИ горного и предгорного садоводства от свободного опыления сорта Анна Шпет. Срок созревания – ранний. Дерево среднерослое. Плоды широкоовальные, красно-фиолетовые с многочисленными серыми подкожными точками, покрыты густым сизым налетом, масса 40-50 г. Урожайность 20-25 т/га. Зимостойкость, засухоустойчивость, устойчивость к грибным болезням средняя.



Краснодарская. Сорт создан в СКФНЦСВВ от скрещивания сортов Венгерка ажанская и Великий Герцог. Срок созревания – средний. Дерево среднерослое. Плоды до 40-45 г. Урожайность 17-18 т/га. Зимостойкость средняя, засухоустойчивость и устойчивость к грибным болезням выше средней.	
Кубанская легенда. Сорт создан на Крымской опытно-селекционной станции (КОСС) от скрещивания сортов Ренклюд Альтана и Юбилейная сочинская. Срок созревания - средний. Дерево среднерослое. Плоды обратно-яйцевидные с «шейкой» у плодоножки, красно-фиолетовые (35-40 г.). Зимостойкость высокая, засухоустойчивость средняя, устойчив к основным болезням.	
Кубанский карлик. Сорт создан на КОСС путем гибридизации сорта Венгерка Вангенгейма с сухофруктовыми сортами сливы (смесь пыльцы). Срок созревания – средний. Дерево слаборослое. Плоды округло-овальные, фиолетовые, 30-35 г. Урожайность 16 т/га. Зимостойкость высокая, засухоустойчивость, устойчивость к грибным болезням средняя.	
Предгорная. Сорт создан на Дагестанской опытной станции плодоводства от посева семян сорта Ранняя синяя. Срок созревания – поздний. Дерево сильнорослое. Плоды округлые, красные, 30-35 г. Урожайность до 20 т/га. Зимостойкость высокая, средняя засухоустойчивость, устойчив к грибным болезням.	
Прикубанская. Сорт создан в СКФНЦСВВ от скрещивания сортов Венгерка ажанская и Ренклюд зеленый. Срок созревания – среднепоздний. Дерево среднерослое. Плоды округлые, красные с интенсивным налетом, 30-35 г. Урожайность до 18 т/га. Сорт зимостойкий, засухоустойчивость выше средней, устойчив к грибным болезням.	

Ренклюд Альтана – чешский сорт, от свободного опыления сорта Ренклюд зеленый. Срок созревания – средний. Дерево среднерослое. Плоды округлые, красно-фиолетовые с зеленоватым оттенком, 35-45 г. Урожайность до 20 т/га. Зимостойкость, засухоустойчивость высокая. Устойчив к основным грибным болезням.	
Стенлей – американский сорт получен от опыления сорта Венгерка ажанская пыльцой сорта Великий герцог. Дерево сильнорослое. Срок созревания – поздний. Плоды обратнойяцевидной формы, до 35-40 г. Урожайность до 20 т/га. Зимостойкость, засухоустойчивость средняя. Устойчив к основным грибным болезням.	
Чачакская улучшенная или наилучшая (Ћаcанска Najbolja) – сербский сорт, получен от скрещивания Венгерки Вагенгейса и Пожегача. Срок созревания – поздний. Дерево сильнорослое. Плоды яйцевидной формы, темно-синего цвета (40-50 г.). Урожайность до 19 т/га. Зимостойкость средняя, засухоустойчивость выше средней, устойчив к основным заболеваниям.	
Чернослив адыгейский. Сорт создан на Майкопской опытной станции ВНИИР. Срок созревания – средний. Дерево сильнорослое. Плоды овальной формы, сине-фиолетовые, 35-45 г. Урожайность 17 т/га. Зимостойкость, засухоустойчивость выше средней. Устойчив к основным грибным болезням.	

Предметом изучения являлось влияние вируса шарки сливы на растения сливы различного эколого-географического происхождения и эффективность янтарной кислоты, сукцинатов калия и натрия при микроклональном размножении сливы домашней.

Вещества синтезированы в лаборатории общей химии, метрологии и стандартизации ФГБОУ ВПО КубГТУ под руководством Посконина В.В., Бадовской Л.А.

Таблица 2 – Характеристика химических соединений

№	Название	Состав
1	Янтарная кислота	97,5 %-ная 1,4-бутандиовая кислота
2	Сукцинат калия	дикалиевая соль янтарной кислоты
3	Сукцинат натрия	динатриевая соль янтарной кислоты

Янтарная кислота $\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (рис. 1) – природная четырехуглеродная дикарбоновая кислота ациклического ряда, образуется при дыхании в цикле Кребса и в глиоксилатном цикле.

Янтарная кислота и её соли (сукцинаты) являются производными органических кислот, это универсальные внутриклеточные метаболиты, которые участвуют в обменных реакциях в организме (Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений, 2005).

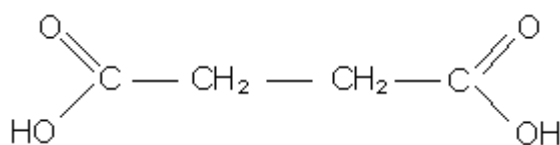


Рисунок 1 - Янтарная кислота

Янтарная кислота – органическая кислота, которая содержится в растениях и животных организмах, янтаре, буром угле. Ее используют в химической промышленности, фармацевтике и косметологии (<http://slovari.yandex.ru/.html>). Это один из компонентов цикла трикарбоновых кислот, и дополнительное введение ее в оптимальных дозах способствует активации дыхания и обменных процессов в клетках растений, что является результатом проявления защитной функции организма на воздействие химического раздражителя, в данном случае, янтарной кислоты (Благовещенский, 1968).

Янтарная кислота представляет собой бесцветные гигроскопичные кристаллы, растворимые в спирте, в эфире и в воде. Плотность 1,563 г/см³. Температура плавления – 183° С, температура разложения – 235° С. Как важный энергетический продукт янтарная кислота стимулирует рост и развитие тканей, особенно при неблагоприятных и патологических факторах, снижающих процессы жизнедеятельности организма. Одним из важнейших свойств янтарной кислоты является ее способность регулировать рост растения (Гущина, 2009; <http://plodogorod.com>).

Калиевая и натриевая соль янтарной кислоты (сукцинаты) используются как регуляторы кислотности в пищевой промышленности, применяются как биологически активные добавки и регуляторы роста в питомниоводстве (Деримедведь, Тимченко, 2002; Ненько и др., 2009; Сукцинаты натрия, калия и кальция, 2017).

Биологическая активность янтарной кислоты и ее соединений обусловлена стимулирующим влиянием на физиологические процессы, способствует повышению клеточного дыхания и фотосинтеза, активности ферментов, синтезу белков. Это приводит к увеличению площади листовой поверхности, к увеличению биомассы надземной части и развитию корневой системы (Гущина, 2009).

Выбор препаратов обусловлен тем, что они являются малотоксичными соединениями, не обладают мутагенным действием, влияют на ростовую активность растений, используются в микродозах и ранее не применялись в технологии клонального микроразмножения сливы домашней.

Направление по использованию препаратов на основе янтарной кислоты в биотехнологии растений, а именно, в клональном микроразмножении является перспективным.

Все БАВ вводились в питательную среду непосредственно до процесса автоклавирования. В качестве контроля использованы стандартные веществ 6-БАП, ГК, ИМК, по этапам размножения. На этапе изоляции эксплантов в среду вводили 6-БАП – 0,2 мг/л, на этапе собственно микроразмножения

(мультипликации) 6-БАП – 1 мг/л и ГК – 0,5 мг/л, на этапе укоренения ИМК – 0,5 мг/л.

Для опыта по подбору эффективного стерилизующего вещества были использованы 0,1 % - й раствор йодида ртути (стандарт), гипохлорит натрия в составе дезинфицирующего препарата торговой марки «Белизна» в разведении 1:9 и дезинфицирующее средство марки «Абактерил» 0,3 %-й раствор.

Бытовое дезинфицирующее средство «Абактерил» использовали по примеру Сочинского института цветоводства и субтропических культур, для двухэтапной санации эксплантов (Самарина, 2012).

Средство «АБАКТЕРИЛ» - многокомпонентный препарат, который состоит из веществ различных химических групп. В его состав входят синергетическая смесь четвертичных аммониевых соединений алкилдиметилбензиламмоний хлорида и алкилдиметилэтилбензиламмоний хлорида (ЧАС) с полигексаметиленгуанидин гидрохлоридом (ПГМГ) и N,N-бис(3-аминопропил) додециламином: (суммарно) – 9 %. Средство работает против грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, грибов (в т.ч. плесневых), анаэробной инфекции, некоторых вирусов. Для дезинфекции используют водные растворы в концентрации 0,25 % или 0,5 % способом орошения или протирания (Инструкция №01/11, 2011).

2.2 Условия проведения исследований

Работа выполнена в Прикубанской зоне садоводства Краснодарского края на базе коллекционного участка сливы ОПХ «Центральное» в 2010-2014 гг., исследования по клональному микроразмножению сливы домашней проводились в лаборатории вирусологии ФГБНУ СКФНЦСВВ в 2012-2017 гг.

Опытно-производственное хозяйство «Центральное» находится в границах Прикубанской зоны южного садоводства. Период активной вегетации в зоне исследований составляет 190-200 дней. Возобновление вегетации на территории прикубанской зоны плодоводства Краснодарского края обычно наступает в

третьей декаде марта – начале апреля. Для зоны характерны сильные годовые колебания температуры, в период исследований температурный минимум доходил до минус 20,8 °С, а максимум – до + 39,6 °С. Лето жаркое, средняя температура за июль составляет 22-25 °С, а максимальные значения могут повышаться до 40 °С и выше. Сумма активных температур составляет 3200-3600 °С. Осадков выпадает от 630 мм до 760 мм в год (Агроклиматический справочник, 1961; Агроклиматические ресурсы, 1975).

В период исследований 2010-2014 гг. среднегодовая температура воздуха превышала многолетнюю норму на 1,1-3,1 °С и составляла 11,8-13,8 °С (табл. 3, прил. А).

Таблица 3 – Основные агрометеорологические показатели погодных условий Прикубанской плодовой зоны Краснодарского края (2011-2014 гг.)

Показатель	Годы исследований			
	2011	2012	2013	2014
Средняя температура, (°С)	11,8	13,4	13,8	13,3
Максимальная температура воздуха, (°С)	39,5	38,3	36,5	39,6
Минимальная температура воздуха, (°С)	-12,4	-20,8	-11,9	-17,9
Сумма осадков, (мм)	796,7	573,6	697,3	658,9

Максимальная температура воздуха в летний период достигала 39,5-39,6 °С минимальная температура отмечена в 2012 г. и составлял 20,8 °С со знаком минус.

Зимний период 2011 гг. характеризовался большим количеством выпавших осадков, среднее количество которых превысило норму на 60,4 %. В январе температура опускалась до минус 10,4 °С, в феврале до минус 12,4 °.

Март в 2011 году был умеренно теплым и дождливым. Апрель был прохладным и дождливым. Средняя температура воздуха в период цветения сливы составляла 10,0 °С. С июля по сентябрь преобладала умеренно жаркая и сухая погода. Среднемесячная температура за летний период составляла 24,5°С.

Температурный максимум отмечался в июле и составлял 39,5 °С (табл. 3). (Агробиологический бюллетень, 2011 г.).

Зима 2011-2012 гг. в начале января была аномально теплая погода с небольшим количеством осадков в течение всего периода. В конце месяца похолодало, отмечались сильные морозы, что отразилось на состоянии плодовых деревьев. Минимальная температура опускалась до минус 15,0 °С. В течение 5 дней температура воздуха держалась от минус 10,8 до минус 15 °С (табл. 3).

В условиях ЗАО ОПХ «Центральное» весна 2012 года была необычно ранней, умеренно теплой и дождливой. Среднемесячные температуры весенних месяцев превышали среднемноголетние показатели на 9,1 °С. Осадки выпадали не равномерно, в апреле их было меньше по сравнению со среднемноголетними данными, а в мае их количество превышало норму на 17,3 мм.

Лето 2012 года было умеренно жарким и сухим. Средняя температура воздуха за летний период превышала среднемноголетнюю среднемесячную температуру на 3,12 °С и составляла 25,2 °С. В августе выпало всего 3,5 мм осадков, что ниже среднемноголетней месячной суммы осадков на 44,5 мм. В осенний период было аномально тепло и сухо (табл. 3).

В зимний период 2012-2013 года было необычно тепло, с небольшим количеством осадков (особенно в последнюю декаду января), это спровоцировало пробуждение плодовых культур и кустарников, почки набухли еще в феврале. Во второй половине февраля произошло понижение температуры, в связи с этим ростовые процессы приостановились. Среднемесячная температура воздуха на 4,9 °С превышала норму. Минимальная температура воздуха опускалась до 8,8 °С со знаком минус.

Начало весны 2013 года было с аномально теплой погодой и обильными осадками, поэтому ростовые процессы у плодовых культур возобновились в среднем на 15 дней раньше средних многолетних данных. Лето 2013 года было дождливым. Так, среднее количество осадков в июне и июле составляло 90,85 мм, что превышало норму на 27,35 мм. В июле отмечались ливневые осадки с градом,

количество которых составило 160 % от нормы. Сентябрь был дождливым и прохладным (табл. 3).

Первая половина зимы 2014 года характеризовалась теплой погодой. Во второй декаде января и первой декаде февраля стало холоднее, средняя температура воздуха на 3,7 °С – 4,4 °С была выше нормы, при этом отмечалось выпадение осадков в виде ледяного дождя.

Весенний период 2014 года был теплым и дождливым, сумма осадков составляла 117,3 мм.

В летние месяцы (июнь, июль) была теплая и дождливая погода. Последняя декада июля и август были жаркими. Максимальная температура воздуха в августе достигала 39,6 °С (табл. 3).

Рельеф центральной подзоны равнинный, почвенный покров представлен черноземами выщелоченными сверхмощными малогумусными (от 2,0 до 2,3 %), мощность гумусного горизонта более 150 см. Черноземы выщелоченные, средне обеспечены подвижными формами фосфора и калия, характеризуются нейтральной или кислой реакцией среды, обладают достаточно благоприятными физическими свойствами (Агроклиматический справочник по Краснодарскому краю, 1961; Вальков и др., 2002).

Работы по клональному микроразмножению сливы проводились в лаборатории вирусологии НЦ «Защиты и биотехнологии растений» ФГБНУ СКФНЦСВВ.

2.3 Методы исследований

Решение проблем вирусных заболеваний посадочного материала осуществлялось путём фитосанитарных мероприятий на основе вирусологического мониторинга питомников и маточных насаждений. Происхождение новых очагов вирусной инфекции устанавливалось способом вирусологического мониторинга насаждений. В основе вирусологического

мониторинга лежит системный учёт вирусных и фитоплазменных заболеваний, изучение степени их распространения по методике S.A. Hill (1984).

Идентификация вируса шарки сливы проводилась визуальным методом по наличию симптомов вируса шарки на листьях и плодах сливы домашней, с последующим тестированием с помощью ОТ-ПЦР в лабораторных условиях.

Для выделения исходных растений, используемых в клональном микроразмножении, на первоначальном этапе проводилось вирусологическое обследование насаждений сливы домашней и саженцев в питомниках на наличие визуальных симптомов вируса шарки сливы на растениях. Визуальное выделение симптомированных вирусом шарки сливы растений проводили в период вегетации: вторая декада мая – вторая декада июня.

Распространение вируса шарки сливы (PPV) в границах участка сада оценивалось методом картограмм (Бунцевич, Костюк (Винтер), Данилюк, 2010, 2014) разработанным сотрудниками лаборатории вирусологии СКФНЦСВВ. С помощью метода можно дать оценку распространения вирусов, которые выявляются визуально, по схеме изучаемого ареала вируса, путём сравнения данных за ряд лет и формализацией переноса, как количественного объекта.

Для построения картограммы в журнал заносится схема насаждения с обозначением направлений сторон света, кварталы, блоки, ряды и места всех деревьев насаждения. Учитывается сортимент, примесь и выпад. На следующем этапе проводится визуальная диагностика сада и обнаруженные заражённые деревья (места) отмечаются на схеме. Мониторинг проводится в течение ряда лет.

Анализ картограмм включает в себя определение скорости и степени распространения вируса, направления распространения (по сортам, по кварталу и по блокам). Определяются закономерности распространения вируса в насаждении, единичный или множественный характер очагов вирусной инфекции (на картограммах очаги инфекции отмечены заливкой), тенденции к расширению ареала, преобладающие направления развития множественных очагов инфекции и др.

Для лабораторной диагностики методом ПЦР отбирались растения с типичными симптомами вируса шарки сливы и бессимптомные растения.

Вирусологический мониторинг проводился в плодоносящих садах сливы ОПХ «Центральное» г. Краснодар, а также ОПХ им. К.А. Тимирязева Усть-Лабинский р-н, и в других плодородческих хозяйствах Краснодарского края в 2010-2017 гг. Тест-образцы для изучения распространенности вируса шарки сливы (*PPV*) отбирались в процессе маршрутных обследований насаждений сливы.

В качестве образцов для исследований отбирались – листья, спящие почки. Тестирование проводилось в 2 срока, соответствующие фазам активного роста (1 декада июня) побегов и глубокого покоя (2 декада ноября).

Диагностика на вирусоносительство проводилась в лаборатории генетики и молекулярной биологии ФГБНУ СКФНЦСВВ (г. Краснодар) методом ОТ-ПЦР с праймерами и реакционными смесями, производства ООО «АгроДиагностика» и по их методическим указаниям (Методические указания, 2009). Набор реагентов *PPV* основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации фрагментов кДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Амплификацию проводили на программируемом амплификаторе «Eppendorf», результаты амплификации регистрировали на трансиллюминаторе «Vilber Lourmat», и цифровым фотоаппаратом «Canon».

Определение штаммового состава вируса шарки проведено в лаборатории вирусологии ВНИИСБ (г. Москва) методом ПЦР-РВ. *PPV-W* обнаруживался с помощью праймеров W8328F/W8711R и *PPV-Nib-CP-WF/PPV-Nib-CP-WR*. Праймерами 3174-SP-F3/3174-SP-R1 не определялся. Это свидетельствует о том, что данный штамм, не является рекомбинантным, т.е. представляет собой автохтонный российский штамм вируса шарки.

Оценку степени поражения листьев и плодов сортов сливы домашней вирусом шарки проводили по «Программе и методике сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур» (Мичуринск, 1973), (Мичуринск, 1980), (Орел, 1999), методу Т.Ф. Бивол, Т.Д. Вередеревской, Х. Кеглера и В.А. Кукурузак

(1984), основанной на визуально определяемой интенсивности симптомов на листьях и плодах (рис. 2).

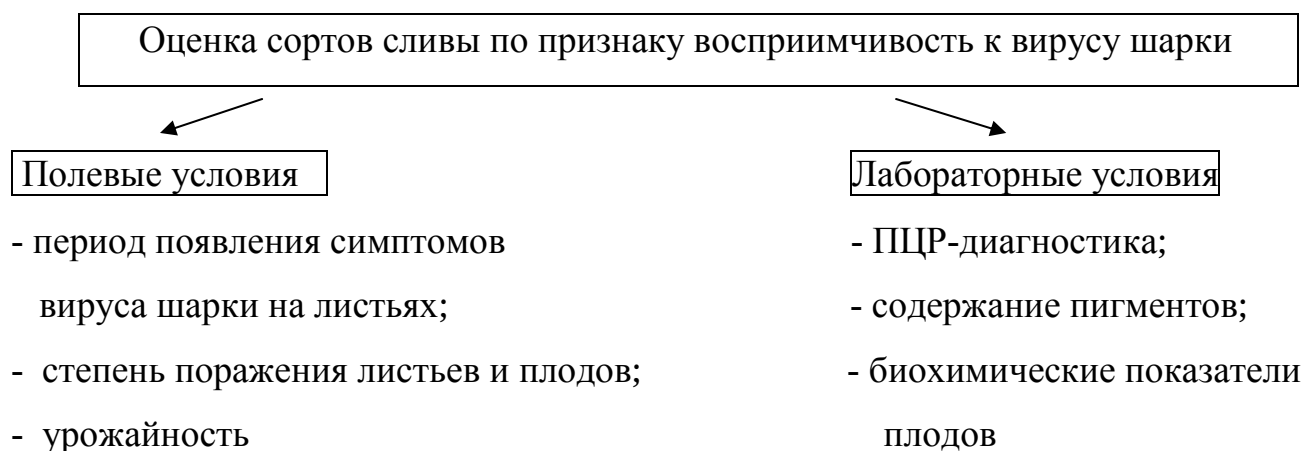


Рисунок 2 – Схема исследований восприимчивости сортов сливы к вирусу шарки

В зависимости от степени проявления симптомов, степень поражения диагностировалась по баллам:

0 – поражений нет;

1 – на листьях единичные, едва заметные пятна;

2 – поражено до 10 % листьев, пятна четко проявляются, 2-3 мм в диаметре;

3 – поражено до 25 % листьев, пятна четко проявляются, занимая $\frac{1}{4}$ поверхности листа;

4 – поражено до 50 % листьев, пятна занимают $\frac{1}{2}$ поверхности листа;

5 – поражено свыше 50 % листьев, пятна занимают большую часть поверхности листа.

Поражение плодов оценивалось по шкале:

0 – поражений нет;

1 – на плодах единичные, поверхностные пятна, занимающие до 10%;

2 – на плодах заметные пятна, занимающие до 25 % поверхности;

3 – на плодах единичные вдавленные пятна;

4 – на плодах глубоко вдавленные пятна, кольца, полосы, занимающие до 10 % поверхности;

5 – на плодах глубоко вдавленные пятна, кольца, полосы, занимающие более 10 % поверхности.

Содержание пигментов в листьях сливы домашней (суммы хлорофиллов а и b, каротинов) определяли спектрофотометрически на приборе UNICO 2800 UV/VIS согласно общепринятой методике В.Ф. Гавриленко (1975).

Оценка биохимических показателей плодов проведена по «Методическим указаниям по химико-технологическому сортоиспытанию овощных, плодовых и ягодных культур для консервной промышленности» (Москва, 1993).

Клональное микроразмножение осуществляли в соответствии с «Методическими рекомендациями по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами» (2005), с использованием рекомендаций производству предложенных С.А. Корнацким (1991) и В.А. Высоцким (1998).

Схема исследований по клональному микроразмножению представлена на рисунке 3.

По схеме опыта на этапе введения в культуру *in vitro* провели подбор оптимальных стерилизующих веществ для эксплантов сливы и оптимальные сроки их введения.

Варианты опыта:

- 1) йодид ртути (HgJ_2) 0,1 %, экспозиция 30 секунд (St);
- 2) раствор гипохлорита натрия («Белизна»), разведение 1:9, экспозиция 8 мин;
- 3) двухступенчатая стерилизация раствором гипохлорита натрия (8 мин.) + 0,3 % раствором «Абактерила» (20 мин.).
- 4) раствор гипохлорита натрия («Белизна»), разведение 1:9, экспозиция 10 мин;
- 5) двухступенчатая стерилизация раствором гипохлорита натрия (10 мин.) + 0,3 % раствором «Абактерила» (20 мин.).



Рисунок 3 – Схема постановки опытов по клональному микроразмножению сливы домашней

В качестве эксплантов использованы апексы активно растущих побегов размером 1-2 мм, отобранные со свободных, протестированных на вирусы растений. Время изолирования апексов – 1 декада мая.

Для сравнительной оценки сроков введения в культуру *in vitro* сливы домашней сортов Стенлей, Кабардинская ранняя, Блюфри, Анна Шпет и Чачакская поздняя экспланты вводили в культуру *in vitro* с марта по июнь.

В качестве эксплантов отбирались искусственно пробужденные почки в третьей декаде марта (контроль) и апексы вегетирующих побегов в первых декадах апреля, мая, июня. Повторность трехкратная, по 15 эксплантов в повторности. На данном этапе использовали среду по прописи Мурасиге-Скуга, дополненную 6-БАП – 0,2 мг/л (Корнацкий, 1991).

На этапе мультипликации проведены испытания, ранее не применявшихся в клональном микроразмножении сливы БАВ группы янтарной кислоты, определена оптимальная концентрация веществ, проведена оценка их эффективности для микроразмножения изучаемых сортов сливы. На этапе ризогенеза подобрали композицию ростовых веществ, способствующих корнеобразованию. На этапе, предшествующем адаптации мериклонов сливы к

нестерильным условиям среды, определена оптимальная степень развития стебля и корневой системы микрорастений для начала адаптации.

Поддержание стерильности помещений, инструментов, посуды, приготовление питательных сред, стерилизацию растительного материала проводили по общепринятым методикам (Методические рекомендации, 2005; Клональное микроразмножение растений, 2012)

Особенности исходного материала. Для введения в культуру *in vitro* отбирались молодые растущие побеги сливы домашней сортов Стенлей, Кабардинская ранняя, Блюфри, Анна Шпет, Чачакская поздняя. В связи с тем, что растительный материал для исследований отбирался с тестированных растений (свободных от вируса шарки сливы), в культуру *in vitro* вводились экспланты сливы размером 1-2 мм, которые помещались в культивационные сосуды так, чтобы они соприкасались абаксиальной частью со средой.

Питательные среды, условия культивирования. В ходе исследований проведена оценка трех питательных сред, для выбора оптимального состава среды при клональном микроразмножении экспериментальных сортов сливы домашней. Для микроразмножения использовали минеральные основы сред по прописи Мурасиге-Скуга, Гамборга (B5) и Уайта (Приложение Б), применяли стандартный набор ростовых веществ: на этапе введения в культуру - БАП - 0,2 мг/л, на этапе мультипликации - БАП - 1 мг/л, ГК - 0,5 мг/л, на этапе ризогенеза - ИМК - 0,5 мг/л.

Маточные растворы макро- и микроэлементов готовили с использованием неорганических солей отечественного и иностранного производства марки х.ч. или ч.д.а. Автоклавирование сред проводили при температуре 120 °С и рабочем давлении 1 атм. в течение 20 мин в вертикальных автоклавах ВК-30. Все работы, требующие соблюдения стерильности, осуществляли в ламинар-боксе С-1,2 (код 110.120).

С учетом всех принятых во внимание данных по оптимизации технологии клонального микроразмножения сливы домашней *in vitro* соблюдались следующие условия: культивирование микропобегов сливы проводили в условиях стандартного фотопериода 16/8 (день - 16 часов, ночь - 8 часов), освещенности 3000-3500 люкс, температуре $+23\pm 3$ °С и влажности 50-60 %. Субкультивирование побегов на свежую питательную среду повторяли каждые 30-40 суток.

Для введения эксплантов в культуру *in vitro* при испытании стерилизующих веществ использовали среду Мурасиге-Скуга с половинным содержанием минеральных солей, дополненную 6-БАП 0,2 мг/л (Корнацкий, 1991).

При изучении ростовой активности препаратов группы янтарной кислоты в качестве стандартного варианта использована среда по прописи Мурасиге-Скуга с полным составом солей и регуляторами роста: 6-БАП - 1,0 мг/л, ГК - 0,5 мг/л. Все витамины, регуляторы роста, БАВ, добавлялись в среды перед автоклавированием. В качестве структурообразующего элемента питательной среды применяли агар-агар бактериологический, в качестве источника углеводного питания - сахара (20-30 г/л).

Общее состояние растений оценивали по 5 балльной шкале на основании внешнего вида растений:

5 баллов – состояние очень хорошее, растения с ярко-зелеными листьями;

4 балла – состояние хорошее, растения светло-зеленые.

3 балла – состояние удовлетворительное, растения бледно зеленые;

2 балла – состояние не удовлетворительное, растения желто-коричневого цвета;

1 балл – состояние плохое, растения темнокоричневые с признаками некроза.

0 баллов – растения погибли.

Укоренение микропобегов сортов сливы домашней проводили на средах Мурасиге-Скуга с половинным составом солей и ИМК в концентрации 0,5 мг/л и БАВ янтарной кислотой и сукцинатами калия и натрия.

Укорененные и адаптированные микрорастения сливы домашней переносили в поликарбонатные теплицы для дальнейшего выращивания.

Для статистической обработки использованы стандартные биометрические методы (дисперсионный анализ) (Доспехов, 1985; Лакин, 1990; Щеглов, 2012). Все необходимые вычисления выполнены на ПК с помощью пакета прикладных программ Microsoft Office (Excel) и Stat Soft STATISTICA 7.0, используя Anova одно- и двухфакторный дисперсионный анализ. Построение графиков проведено в программе Microsoft Excel.

Показатели экономической эффективности рассчитаны согласно методике В.Р. Боева, 1996.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Особенности распространения вируса шарки сливы (*Plum pox potyvirus*) в условиях Прикубанской зоны Краснодарского края

В ходе вирусологических обследований насаждений сливы, проведенных в период с 2011 по 2013 гг., в насаждениях сливы домашней были обнаружены растения с симптомами вируса шарки, в связи с чем возникла необходимость идентификации вируса, оценки восприимчивости сортов сливы к вирусу и его влияния на растения сливы домашней в условиях Прикубанской зоны южного садоводства.

В результате изучения распространения вируса шарки на районированных сортах сливы Кабардинская ранняя и Стенлей разработаны новые методические подходы к оценке динамики распространения вируса, заключающиеся в графическом отображении основных характеристик переноса вируса шарки в границах изучаемого ареала путем анализа данных за определенный период времени.

В период 2011-2013 гг. проводился вирусологический мониторинг в границах одного участка сада сливы. Общая площадь участка составляла 0,35 га, площадь 1-го блока – 0,17 га, площадь 2-го блока – 0,18 га. Схема посадки 6х4 м. Год закладки насаждения – 1995. Расположение рядов с востока на запад, места деревьев с юга на север. Всего в насаждении обследовано 509 деревьев, из них 313 деревьев сорта Кабардинская ранняя (с 1 по 6 ряд), 196 деревьев сорта Стенлей с 7 по 10 ряд. Для оценки динамики распространения вируса шарки (PPV) в насаждении применялся разработанный метод картограмм (Бунцевич, Винтер и др., 2010, 2014).

В результате обследований установлено, что в 2011 г. на исследуемом участке 148 деревьев сливы имели симптомы вируса шарки сливы на листьях, из них 112 деревьев сорта Кабардинская ранняя и 36 деревьев сорта Стенлей (табл. 4, рис. 4).

сорта	Кабардинская ранняя						Стенлей			
ряды	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 м							PPV	PPV		
2 м		PPV		PPV	PPV					
3 м		PPV			PPV					
4 м						PPV				
5 м		PPV	PPV		PPV	PPV	PPV			
6 м			PPV	PPV	PPV	PPV				
7 м	PPV		PPV	PPV		PPV				
8 м			PPV		PPV		PPV			
9 м		PPV		PPV	PPV			PPV		
10 м					PPV	PPV		PPV		
11 м						PPV	PPV		PPV	
12 м					PPV					
13 м		PPV	PPV	PPV	PPV	PPV				
14 м				PPV			PPV			PPV
15 м				PPV	PPV	PPV				
16 м		PPV			PPV	PPV				
17 м		PPV					PPV	PPV		
18 м		PPV			PPV	PPV	PPV			
19 м										
20 м										
21 м		PPV	PPV							
22 м				PPV		PPV	PPV			
23 м		PPV				PPV				
24 м						PPV	PPV			
25 м							PPV	PPV		
26 м								PPV	PPV	
27 м					PPV				PPV	PPV
28 м										
29 м										

а

Рисунок 4 а – Картограмма сада сливы

сорта	Кабардинская ранняя						Стенлей			
ряды	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 м	PPV					PPV	PPV			
2 м	PPV	PPV		PPV	PPV	PPV				
3 м	PPV	PPV	PPV				PPV			
4 м	PPV						PPV			
5 м										
6 м	PPV					PPV				
7 м							PPV			
8 м			PPV							
9 м		PPV		PPV	PPV	PPV				
10 м	PPV	PPV		PPV	PPV					
11 м	PPV	PPV	PPV	PPV		PPV				PPV
12 м	PPV	PPV	PPV			PPV				
13 м	PPV	PPV		PPV	PPV	PPV				
14 м	PPV	PPV								
15 м			PPV	PPV		PPV				
16 м	PPV	PPV	PPV	PPV		PPV		PPV		
17 м		PPV	PPV				PPV			
18 м	PPV				PPV			PPV		
19 м	PPV							PPV		
20 м	PPV			PPV	PPV		PPV			
21 м	PPV			PPV	PPV	PPV	PPV			PPV
22 м	PPV				PPV	PPV	PPV	PPV		
23 м	PPV		PPV	PPV	PPV	PPV				PPV
24 м			PPV	PPV	PPV	PPV	PPV	PPV		
25 м			PPV	PPV	PPV	PPV	PPV			
26 м					PPV	PPV	PPV	PPV		
27 м				PPV	PPV	PPV	PPV			
28 м		PPV			PPV		PPV		PPV	
29 м		PPV		PPV	PPV		PPV			PPV
30 м				PPV	PPV	PPV	PPV			

Б

Примечание: а - блок №1, б - блок №2. Клетки темно-серого цвета с надписью «PPV» означают деревья, инфицированные вирусом шарки сливы (*Plum Pox Potyvirus*) по состоянию на 2011 г; светлосерые клетки - 2012 г.; заштрихованные клетки - 2013 г; красные окружности – основные очаги инфекции.

Рисунок 4 б – Картограмма сада сливы

Таблица 4 – Динамика распространения вируса шарки сливы на сортах Кабардинская ранняя и Стенлей, 2011-2013 гг.

Сорт	Блок	Всего деревьев, шт.	Инфицированных PPV деревьев	2011 г.	2012 г.	2013 г.
Стенлей	1	95	деревьев, шт.	17	21	21
			%	17,9	22,1	22,1
	2	101	деревьев, шт.	19	22	26
			%	18,8	21,8	25,7
	Распространение на сорте			18,4	21,9	24,0
Кабардин- ская ранняя	1	161	деревьев, шт.	43	50	51
			%	26,7	31,1	31,7
	2	152	деревьев, шт.	69	82	87
			%	45,2	53,9	57,2
	Распространение на сорте			35,8	42,2	44,5
	1	256	Р по 1 блоку, %	23,4	27,7	28,4
	2	253	Р по 2 блоку, %	34,9	40,7	45,4
	Квартал	509	Р по кварталу, %	29,1	34,4	37,7

Распространение вируса подсчитывалось по формуле:

$$P = n \cdot 100 / N,$$

где Р - распространенность болезни (%), N – общее количество растений; n – количество больных растений.

Таким образом, в 2011 г. распространение вируса шарки в насаждении составляло 29,1 % (148 инфицированных деревьев из 509), на деревьях сорта Кабардинская ранняя – 35,7 % (112 деревьев из 313), сорта Стенлей – 18,4 % (36 деревьев из 196)(табл. 4, рис. 4).

В 2012 г. симптомы вируса шарки сливы появились еще на 27 деревьях: на 20 деревьях сорта Кабардинская ранняя и 7 деревьях сорта Стенлей и распространение вируса шарки составляло 34,4 % (табл. 4, рис. 4).

Распространение вируса шарки на сорте Кабардинская ранняя увеличилось до 42,2 %, на сорте Стенлей – до 21,9 %.

В 2013 году симптомы болезни появились еще на 18 деревьях: на сорте Кабардинская ранняя – 8 деревьев и 4 дерева сорта Стенлей. Распространение на

сорта Кабардинская ранняя возросло на 2,6 % и составило 44,5 %, на сорте Стенлей на 2,1 % и составило 24,2 % (табл. 4, рис. 4 а, б).

Наблюдаются различия в распространении вируса шарки по блокам. В годы исследований распространение вируса во втором блоке было выше на 11,5 - 17 %, чем в первом. В 2013 году распространение вируса шарки сливы увеличилось, в первом блоке всего на 0,7 %, во втором на 4,7 %.

Таким образом, в этом блоке вирус шарки распространяется более активно и в 2013 г. уже 45,4 % деревьев имели симптомы вируса шарки на листьях.

Разница в степени распространения вируса шарки на сортах Кабардинская ранняя 44,5 % и Стенлей 24,4 % показывает, что существуют сортовые особенности динамики вируса шарки в данном садовом агроценозе.

Не смотря на значительное распространение вируса шарки в границах опытного участка, сорт сливы Стенлей и сорт Кабардинская ранняя показали достаточно высокую толерантность к вирусу шарки сливы. Поражение листьев сорта Кабардинская ранняя было в пределах 1-2 баллов, сорта Стенлей 1-4 балла. Поражение плодов и осыпание урожая не отмечались.

В результате графического отображения на карте плодового насаждения симптомированных деревьев, видно, что зараженные растения расположены в основном множественными очагами (представленными несколькими деревьями) и дальнейшее распространение вируса шарки в насаждении проходит в границах основных очагов вируса шарки (рис. 4 а, б). Очаги заражения деревьев сливы в опытном саду имеют устойчивую тенденцию к расширению. Ежегодно ареал распространения вируса увеличивается на 3,3-5,3 %. Перенос вируса шарки сливы на опытном участке в большей степени имеет вертикальное направление (между деревьями вдоль ряда), в меньшей степени горизонтальное (между соседними рядами).

За время эксплуатации сада сливы, более 20 лет, практически половина деревьев сливы имела визуальные симптомы вируса шарки на листьях. Однако, в связи с тем, что сорта сливы Стенлей и Кабардинская ранняя являются толерантными к вирусу шарки, сад успел выработать свой потенциал.

Основная задача при закладке сада сливы домашней - проведение профилактических мероприятий, препятствующих распространению вируса.

Метод картограмм применим для оценки распространения визуально выявляемых вирусов и др. объектов.

3.2. Штаммовый состав вируса шарки сливы

В результате проведенных исследований в условиях Прикубанской зоны садоводства идентифицировано три штамма вируса шарки сливы из 9 известных – *PPV-Winona*, *PPV-Marcus*, *PPV-Dideron* (табл. 5).

Таблица 5 – Штаммовый состав вируса шарки (*PPV*), коллекция сливы ФГБНУ СКФНЦСВВ, 2011-2013 г.

Сорт сливы	Наличие симптомов вируса шарки сливы	Штамм вируса шарки
Сорта отечественной селекции		
Балкарская	-	D
Герцог	+	D
Кабардинская ранняя	-	W
Краснодарская	+	D
Кубанская легенда	-	W
Сорта интродуценты		
Стенлей	+	D
Стенлей	-	M, W
Гилберт	+	D
Чачакская поздняя	+	D
Ренклюд Альтана	-	W
Гитлане	+	W
Мелитопольская	-	D, M
Ренклюд донецкий	-	D

Установлено, что в Прикубанской зоне садоводства самым распространенным штаммом вируса шарки сливы является штамм *PPV-D* (табл. 5, рис. 5). Данный штамм определен у деревьев сортов отечественной селекции

Балкарская, Герцог, Краснодарская и у сортов интродуцентов Стенлей, Гилберт, Чачакская поздняя, Ренклод донецкий и Мелитопольская. Причем, большая часть сортов инфицированных штаммом *PPV-D* имела симптомы вируса шарки сливы на листьях (Герцог, Краснодарская, Стенлей, Гилберт, Чачакская поздняя), у другой части образцов вирус диагностирован в визуально здоровых, т.е. бессимптомных растениях (Балкарская, Ренклод донецкий, Мелитопольская).

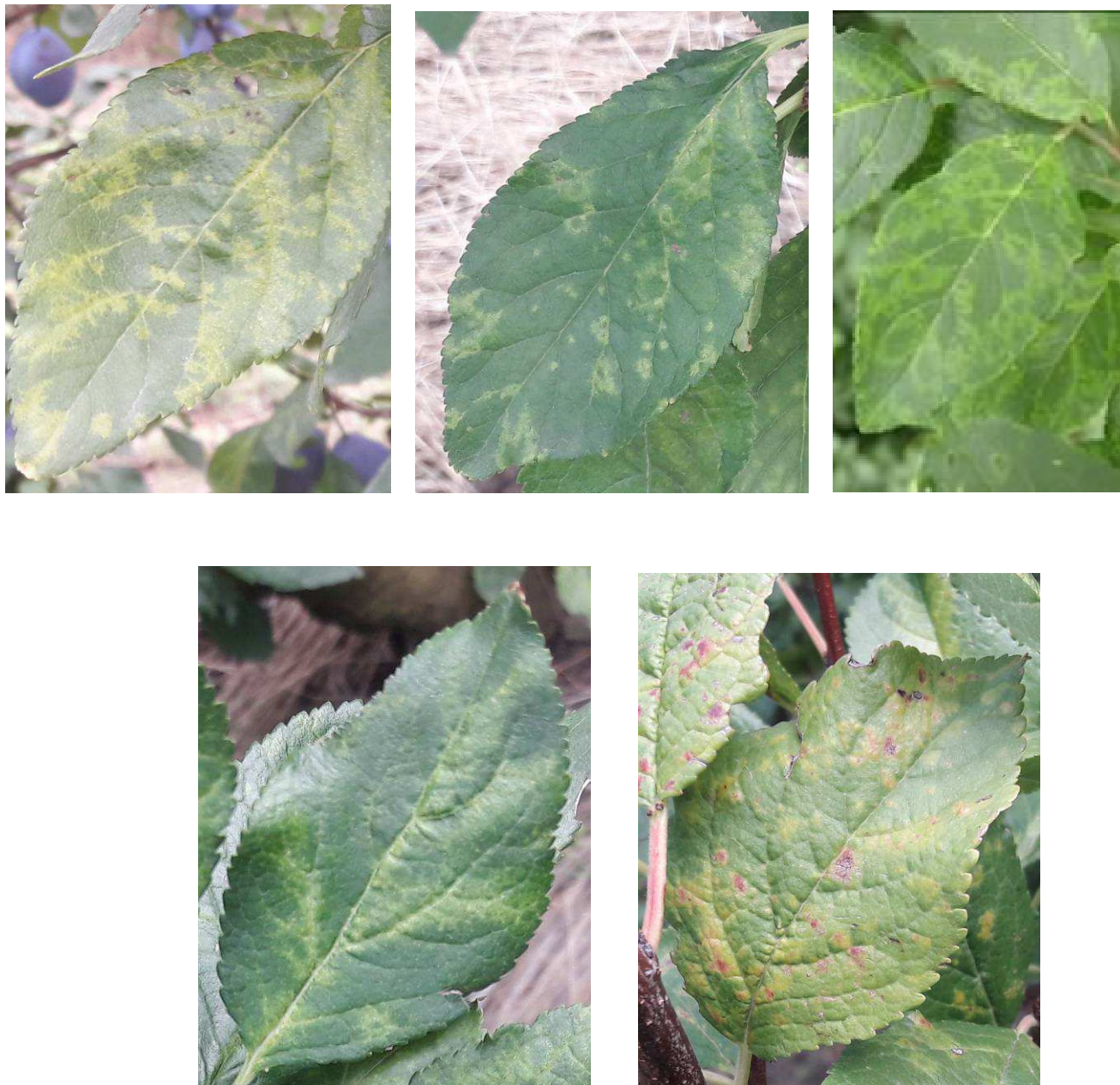


Рисунок 5 – Различные симптомы проявления вируса шарки штамм *PPV-D* на листьях сливы в Прикубанской зоне садоводства Краснодарского края

Штамм *PPV-W* идентифицирован у сортов Кабардинская ранняя, Кубанская легенда, Стенлей, Ренклюд Альтана, Гитлане. У всех сортов, кроме сорта Гитлане, вирус обнаружен в бессимптомных растениях.

Таким образом, установлено, что в условиях Прикубанской зоны южного садоводства для штамма *PPV-W* характерно латентное течение болезни.

Штамм *PPV-M* обнаружен только на образцах сливы сортов Стенлей и Мелитопольская. В обоих образцах идентифицированы по 2 штамма вируса шарки одновременно; у сорта Стенлей штамм *PPV-M* и *PPV-W*, у сорта Мелитопольская штаммы *M* и *D*. Вирус шарки сливы был диагностирован в визуально здоровых растениях, симптомов не было ни на листьях, ни на плодах.

В условиях Прикубанской зоны южного садоводства штамм *PPV-M* существует совместно с другими штаммами вируса шарки. Обнаружен штамм только в сортах интродуцентах. У инфицированных деревьев сливы течение болезни носит скрытый характер.

На сливе сорта Предгорная и сорта Анна Шпет за весь период исследований, симптомы вируса шарки сливы на листьях и плодах не отмечались.

В ходе исследований по результатам визуальной и лабораторной диагностики методом ПЦР выделены деревья сливы домашней 12-ти сортов, свободные от вируса шарки (*PPV*). Часть из них включена в процесс клонального микроразмножения (табл. 6).

Таким образом, в Прикубанской зоне южного садоводства имеют распространение штаммы вируса шарки сливы *PPV-D*, *PPV-W* и *PPV-M*. Самый распространенный штамм *PPV-D* - 61 % от общего количества образцов, который идентифицирован у большинства симптомированных растений. Для штаммов *PPV-M* и *PPV-W* больше характерная латентная форма болезни, без проявления характерных симптомов вируса шарки сливы на листьях и плодах. Штамм *PPV-M* обнаружен в растениях совместно со штаммами *PPV-D* и *PPV-W* вируса шарки.

Таблица 6 – Растения сортов сливы, свободные от вируса шарки сливы, 2011-2013 гг.

№	Сорт	ПЦР-тест на PPV	Наличие симптомов шарки сливы	Заключение
1	Стенлей	-	отсутствуют	Здоров
2	Кабардинская ранняя	-	отсутствуют	Здоров
3	Дорита	-	отсутствуют	Здоров
4	Анна Шпет	-	отсутствуют	Здоров
5	Ренет Харитонова	-	отсутствуют	Здоров
6	Прикубанская	-	отсутствуют	Здоров
7	Венгерка душистая	-	отсутствуют	Здоров
8	Предгорная	-	отсутствуют	Здоров
9	Гилберт	-	отсутствуют	Здоров
10	Мелитопольская	-	отсутствуют	Здоров
11	Блюфри	-	отсутствуют	Здоров
12	Плотная	-	отсутствуют	Здоров

3.3 Определение сроков тестирования и проявления симптомов вируса шарки сливы на растениях в условиях Прикубанской зоны садоводства Краснодарского края

Проявление симптомов вируса шарки сливы на листьях и плодах зависит от многих факторов (восприимчивость сорта, штамм вируса, условия произрастания и т.д.), но сроки их проявления в большей мере определяются климатическими условиями года.

В условиях Краснодарского края первые симптомы вируса шарки сливы на листьях у сортов Кабардинская ранняя, Краснодарская, Кубанский карлик, Ренклюд Альтана, Стенлей и Чачакская улучшенная визуально проявлялись в первой декаде мая в разные годы исследований.

Весной 2011 г. температура воздуха была ниже нормы на 1-1,5 °С (16-17 °С), были осадки 60-90 % от нормы, что, в целом, увеличило сроки цветения у некоторых сортов, таких как Герцог, Прикубанская, Турчанка

симптомы вируса шарки на листьях появились во второй декаде мая (15-20 мая), в остальные годы исследований симптомы визуализировались в первой декаде мая (табл. 7).

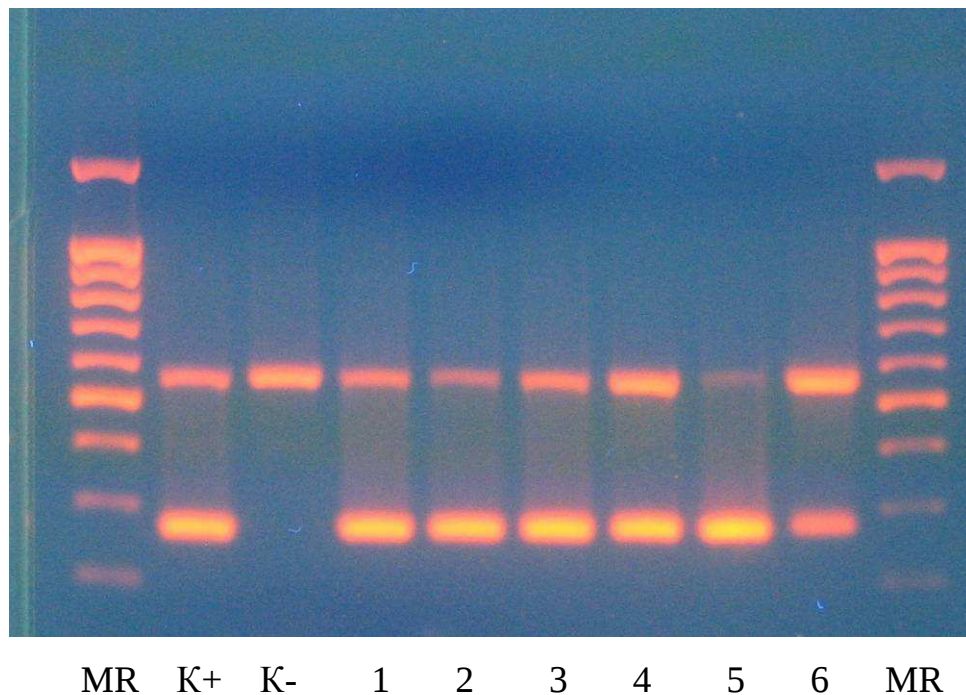
Для сортов Геркулес и Чачакская поздняя в целом характерно более позднее проявление симптомов вируса шарки на листьях, в среднем после 10 мая (2 декада).

Таблица 7– Период проявления симптомов вируса шарки сливы на листьях сливы домашней, 2011-2014 гг.

Сорт	2011	2012	2013	2014
Ранние				
Кабардинская ранняя	1 декада мая	1 декада мая	1 декада мая	1 декада мая
Средние				
Геркулес	2 декада мая	1 декада мая	2 декада мая	2 декада мая
Герцог	2 декада мая	1 декада мая	1 декада мая	1 декада мая
Краснодарская	1 декада мая	1 декада мая	1 декада мая	1 декада мая
Кубанский карлик	1 декада мая	1 декада мая	1 декада мая	1 декада мая
Мелитопольская	1 декада мая	1 декада мая	2 декада мая	1 декада мая
Прикубанская	2 декада мая	1 декада мая	1 декада мая	1 декада мая
Ренклод Альтана	1 декада мая	1 декада мая	1 декада мая	1 декада мая
Чернослив адыгейский	1 декада мая	1 декада мая	2 декада мая	1 декада мая
Поздние				
Турчанка	2 декада мая	1 декада мая	1 декада мая	1 декада мая
Стенлей	1 декада мая	1 декада мая	1 декада мая	1 декада мая
Чачакская поздняя	2 декада мая	2 декада мая	2 декада мая	2 декада мая
Чачакская улучшенная	1 декада мая	1 декада мая	1 декада мая	1 декада мая

Таким образом, визуальную диагностику вируса шарки сливы в условиях Краснодарского края следует начинать со 2 декады мая, когда симптомы вируса шарки проявятся на листьях у большинства сортов.

С целью уточнения оптимальных сроков проведения лабораторной диагностики в Прикубанской зоне садоводства Краснодарского края образцы тестировались в различные фазы вегетации растений: в период органического покоя – ноябрь (спящие почки) и в период активного роста листьев и максимального проявления симптомов на них – 1 декада июня (листья) методом ОТ-ПЦР (табл. 8, рис. 6).



Примечание: MR-маркерная линейка; K+ -положительный контроль; 1-6 – номера образцов.

Рисунок 6 - Тестирование листьев сливы методом ПЦР в традиционном варианте с использованием универсальных праймеров P1/P2

На рисунке 6 представлены результаты тестирования ряда образцов, где в образцах диагностирован вирус шарки сливы (Кабардинская ранняя, Венгерка юбилейная, Стенлей).

Тестирование образцов, отобранных в период покоя растений (спящие почки), показало, что ряд образцов имел отрицательный результат (табл. 8), хотя в период вегетации на листьях отмечались чёткие симптомы шарки сливы, и летняя диагностика растительного материала (листья) показала наличие вируса шарки.

В период покоя вирусные частицы не проявляют активность, поэтому их сложнее диагностировать.

Таблица 8 – Диагностика сортов сливы на вирусоносительство, в зависимости от периода вегетации, 2011-2013 гг.

Сорт	Июнь (1 декада)	Ноябрь (2 декада)
Сорта отечественной селекции		
Кабардинская ранняя	+	-
Венгерка юбилейная	+	-
Венгерка кубанская	-	-
Сорта интродуценты		
Стенлей	+	+
Ренклюд Альтана	+	-
Гилберт	-	+
Гитлане	+	-
Чачакская поздняя	-	-
Чачакская улучшенная	+	-
Мелитопольская	+	+

Примечание: «+»-инфицирован (обнаружен PPV), «-»- здоров (PPV не обнаружен).

Это может быть обусловлено климатическими особенностями Прикубанской зоны южного садоводства: длительный вегетационный период, высокие летние температуры, большая амплитуда колебаний температур, высокая влажность воздуха и другие особенности влияют на экспрессию вирусов в тканях растений в период вегетации.

Поэтому, диагностику вируса шарки сливы (PPV), ОТ-ПЦР следует проводить в период максимального проявления симптомов вируса на листьях (май-июнь), до наступления высоких температур, когда для анализа отбираются молодые листья и части растения.

3.4 Адаптационные особенности сортов сливы домашней при инфицировании вирусом шарки

3.4.1 Оценка сортов сливы домашней по восприимчивости к вирусу шарки сливы в условиях Прикубанской зоны Краснодарского края

Восприимчивость сорта к вирусу шарки определяется генотипом сорта. От уровня восприимчивости зависит проявление симптомов на листьях и плодах сливы, качество и количество урожая. В таблице 9 представлены результаты оценки восприимчивости сортов сливы к вирусу шарки.

Таблица 9 - Восприимчивость сортов сливы к вирусу шарки по проявлению симптомов (2011-2013 гг.)

Сорт сливы	Симптомы на листьях	Симптомы на плодах
Ранние		
Кабардинская ранняя	+	-
Средние		
Балкарская	-	-
Геркулес	++++	+
Герцог	++++	-
Краснодарская	++++	+
Кубанский карлик	++	-
Мелитопольская	++	+
Предгорная	-	-
Прикубанская	++	-
Ренклод Альтана	+	+
Чернослив адыгейский	+	-
Поздние		
Турчанка	+++	+
Стенлей	++	-
Чачакская поздняя	++	-
Чачакская улучшенная	+++	+

Поражение листьев оценивалось по следующей шкале:

«–» высокоустойчивые (полевая устойчивость) – 0 баллов (поражения нет);
 «+» устойчивые (толерантные) — 1 балл (на листьях единичные, едва заметные пятна); «++» – 2 балла (поражено до 10 % листьев на дереве, пятна четко проявляются, 2-3 мм в диаметре);
 среднепоражаемые «+++» – 3 балла (поражено до 25 % листьев на дереве, пятна четко проявляются, занимая $\frac{1}{4}$ поверхности листа);
 сильновосприимчивые – «++++» 4 балла (поражено до 50 % листьев на дереве, пятна занимают $\frac{1}{2}$ поверхности листа); «+++++» 5 баллов (поражено свыше 50 % листьев на дереве, пятна занимают большую часть поверхности листа).

Поражение плодов оценивалось по шкале:

«–» высокоустойчивые (полевая устойчивость) – 0 баллов (поражения нет);
 «+» устойчивые (толерантные) — 1 балл (на плодах единичные, поверхностные пятна, занимающие до 10 % поверхности); «++» – 2 балла (на плодах заметные пятна, занимающие до 25 % поверхности);
 среднепоражаемые «+++» – 3 балла (на плодах единичные вдавленные пятна);
 сильновосприимчивые – «++++» 4 балла (на плодах глубоко вдавленные пятна, кольца, полосы, занимающие до 10 % поверхности); «+++++» 5 баллов (на плодах глубоко вдавленные пятна, кольца, полосы, занимающие более 10 % поверхности).

Таким образом, сорта были разделены по группам восприимчивости (табл. 10).

К группе сильновосприимчивых сортов (4 балла поражения) отнесены сорта Герцог, Геркулес, Краснодарская, у которых симптомы вируса шарки визуально отмечались на 50 % листьев дерева. Пятна, дуги были хорошо заметные, занимали до $\frac{1}{2}$ части поверхности листа.

Поражение плодов вирусом шарки у сорта Геркулес и Краснодарская не превышало 1 балла. Сначала пятна на плодах были поверхностные и заметные, позже практически исчезали, маскируясь под общей окраской плода.

Таблица 10 - Восприимчивость сортов сливы к вирусу шарки (по признаку проявления симптомов на листьях), 2011-2013 гг.

Сильно-восприимчивые (4 балла)	Средне-поражаемые (3 балла)	Устойчивые (толерантная форма)		Устойчивые (полевая устойчивость) (0 баллов) без симптомов
		1 балл	2 балла	
Герцог	Турчанка	Кабардинская ранняя	Стенлей	Балкарская
Геркулес	Чачакская улучшенная	Ренклод Альтана	Мелитопольская	Предгорная
Краснодарская		Чернослив адыгейский	Прикубанская	
			Кубанский карлик	
			Чачакская поздняя	

У сорта сливы Герцог симптомы вируса шарки на плодах в период исследований не проявлялись.

К группе среднепоражаемых вирусом шарки сортов (3 балла) отнесены Турчанка и Чачакская улучшенная, у которых пятна на листьях четко проявлялись и занимали до 25 % поверхности листа. На плодах были пятна поверхностные, не проникающие внутрь плода.

В результате проведенных исследований установлено, что в условиях Краснодарского края к сортам, проявляющим толерантность к вирусу шарки сливы, относятся сорта Кабардинская ранняя, Ренклод Альтана, Чернослив адыгейский. Проявление симптоматики вируса шарки на листьях сливы, составляло в среднем 1 балл, пятна на листьях единичные. К этой же группе отнесены сорта Стенлей, Мелитопольская, Кубанский карлик, Прикубанская, Чачакская поздняя, у которых в среднем поражение составило 2 балла, симптомированные листья занимали до 10 % от всего количества листьев. Хотя у сорта Стенлей все чаще встречаются листья с поражением листьев в 4 балла. Симптомы вируса шарки на плодах отмечались только на плодах сорта Ренклод Альтана и Мелитопольская, при этом пятна на плодах были поверхностные, к концу созревания маскировались под общей окраской плода.

По данным, полученным в условиях Прикубанской зоны южного садоводства, сорт Ренклод Альтана проявил себя, как толерантный к вирусу шарки сливы. Симптомы вируса на листьях и плодах в среднем составляли 1 балл поражения (единичные пятна на листьях и поверхностный рисунок на плодах).

Анализ полученных данных позволил установить, что в период проведения исследования симптомы вируса шарки на листьях и плодах сортов Балкарская и Предгорная не проявлялись, таким образом, их можно отнести к группе сортов с высокой полевой устойчивостью к вирусу шарки сливы по данному признаку. Эти сорта представляют интерес, как доноры признака толерантности к вирусу шарки сливы.

3.4.2 Изменение физиологических и биохимических показателей растений сливы в связи с инфицированием вирусом шарки

Важными показателями, отражающими функциональное состояние растений сливы, является биохимический состав листьев, плодов и общее физиологическое состояние растений. Изменения, возникающие при поражении растений, в том числе и вирусом шарки, показывают, как глубоко затронуты физиологические процессы.

По полученным данным у сортов сливы, инфицированных вирусом шарки сливы отмечено снижение содержания в листьях хлорофиллов «a» и «b» (табл. 11).

В результате анализа полученных данных определено, что у инфицированного штаммом *PPV-D* сорта сливы Стенлей, количество хлорофилла «a» составляло 1,67 мг/гСВ, в листьях здоровых растений - 2,65 мг/гСВ. Содержание пигмента снизилось на 0,98 мг/гСВ или 37 % (табл. 11).

У сорта Кабардинская ранняя, инфицированного штаммом *PPV-W* содержание хлорофилла «a» в листьях инфицированных растений снизилось на 0,53 мг/гСВ или 19,1 % и составляло 2,24 мг/гСВ, у здоровых растений – 2,77 мг/гСВ.

Таблица 11 – Определение содержания пигментов в листьях растений сливы домашней, мг/гСВ (2011-2013 гг.)

Сорт	Статус растения	Хлорофилл «a»	Хлорофилл «b»	Сумма хлорофиллов $a + b$
Стенлей (штамм D)	здоровое (без PPV)	2,65	0,88	3,53
	инфицированное (PPV)	1,67	0,49	2,16
Кабардинская ранняя (штамм W)	здоровое (без PPV)	2,77	1,01	3,78
	инфицированное (PPV)	2,24	0,7	2,94
Ренклюд Альтана (штамм D)	здоровое (без PPV)	2,88	0,99	3,87
	инфицированное (PPV)	2,14	0,63	2,77
Чачакская поздняя (штамм D)	здоровое (без PPV)	2,54	1,01	3,55
	инфицированное (PPV)	1,92	0,64	2,56
Мелитопольская (штаммы D и M)	здоровое (без PPV)	3,48	0,94	4,42
	инфицированное (PPV)	2,07	0,66	2,73

В листьях растений сорта Ренклюд Альтана, инфицированных штаммом *PPV-W* вируса шарки, содержание хлорофилла «a» составляло 2,14 мг/г СВ, что на 0,74 мг/гСВ или 25,7 % меньше, чем у здоровых растений, где содержание пигмента составляло 2,88 мг/гСВ (табл. 11).

У сорта Чачакская поздняя, инфицированного штаммом *PPV-D*, содержание хлорофилла «a» снизилось на 0,62 мг/гСВ или 24,4 % и составляло 1,92 мг/гСВ, у здоровых растений его количество составляло 2,54 мг/гСВ.

В листьях сливы сорта Мелитопольская, инфицированного штаммами *PPV-M* и *PPV-D*, количество хлорофилла «a» у инфицированных растений снизилось на 1,41 мг/гСВ или 40,5 %. Содержание пигмента в листьях инфицированных растений составляло 2,07 мг/гСВ, в здоровых – 3,48 мг/гСВ (табл. 11).

У растений, зараженных штаммами *PPV – D*, *PPV – W* вируса шарки сливы, количество хлорофилла в листьях снизилось от 19,1 до 37 %. При инфицировании сразу двумя штаммами вируса *PPV – M*, *PPV – W* (сорт Мелитопольская) содержание хлорофилла в листьях больных растений снизилось на 40,5 %. В среднем содержание хлорофилла «a» снизилось на 29,3 %.

Такая же тенденция наблюдается и по содержанию хлорофилла «b» (табл. 11). Так у сорта Стенлей, инфицированного штаммом *PPV-D* количество хлорофилла «b» в листьях здоровых растений составляло 0,88 мг/гСВ, в листьях инфицированных растений 0,44 мг/гСВ, что на 0,44 мг/гСВ или 44,3 % меньше, чем у здоровых растений.

У сорта Кабардинская ранняя, инфицированного штаммом *PPV-W*, содержание пигмента у здоровых растений составляло 1,01 мг/гСВ, у инфицированных – 0,7 мг/гСВ, в целом содержание хлорофилла «b» уменьшилось на 0,31 мг/гСВ или 30,7 % (табл. 11).

В листьях растений сорта Ренклод Альтана, инфицированного также штаммом *PPV-W* вируса шарки, у инфицированных растений количество хлорофилла «b» составляло 0,63 мг/гСВ, что на 0,36 мг/гСВ или 36,4 % меньше, чем в листьях здоровых растений – 0,99 мг/гСВ.

У сорта Чачакская поздняя, инфицированного штаммом *PPV-D* снижение хлорофилла «b» в листьях растений составляло 0,37 мг/г СВ или 36,6 %. Количество хлорофилла «b» у здоровых растений было 1,01 мг/гСВ, у инфицированных 0,64 мг/гСВ.

В листьях растений сорта Мелитопольская, инфицированных штаммами *PPV-M* и *PPV-D*, количество хлорофилла «b» составляло 0,66 мг/гСВ, что на 0,28 мг/гСВ или 29,8 % ниже, чем в листьях здоровых растений – 0,94 мг/гСВ (табл. 11).

В среднем по сортам содержание хлорофилла «b» снизилось на 35,5 %. У сорта Мелитопольская, инфицированного двумя штаммами вируса шарки *PPV-D* и *PPV-M*, содержание хлорофилла «b» уменьшилось на 29,8 %, у остальных сортов при инфицировании штаммами *PPV-D* и *PPV-W* на 30,7-44,3 %.

По показателю сумма хлорофиллов у растений сорта Стенлей, инфицированного штаммом *PPV-D*, сумма хлорофиллов составляла 2,16 мг/гСВ, что на 1,37 мг/гСВ или 37,8 % ниже, чем у здоровых растений – 3,53 мг/гСВ.

У сорта Кабардинская ранняя, инфицированного штаммом *PPV-W*, сумма хлорофиллов снизилась на 0,84 мг/гСВ или на 22,2 % и составляла 2,94 мг/гСВ. У здоровых растений сумма хлорофиллов равнялась 3,78 мг/гСВ (табл. 11).

У сорта Ренклод Альтана, инфицированного штаммом *PPV-W*, сумма хлорофиллов в инфицированных листьях составляла 2,77 мг/гСВ, что на 1,1 мг/гСВ или 28,4 % меньше, чем у здоровых растений – 3,87 мг/г СВ.

У сорта Чачакская поздняя, инфицированного штаммом *PPV-D*, сумма хлорофиллов уменьшилась на 0,99 мг/гСВ или 27,9 % и составляла 2,56 мг/гСВ, у здоровых растений – 3,55 мг/гСВ.

В листьях сливы сорта Мелитопольская, инфицированного штаммами *PPV-M* и *PPV-D*, вируса шарки, сумма хлорофиллов снизилась на 1,69 мг/гСВ или 38,2 %. У инфицированных растений его количество равнялось 2,73 мг/гСВ, у здоровых – 4,42 мг/гСВ (табл. 11).

В среднем по сортам сумма хлорофиллов «а» и «b» у инфицированных растений была на 29,3 % ниже, чем у здоровых. Снижение суммы хлорофиллов варьировало в пределах 22,2-38,2 %, в зависимости от биологических особенностей сорта и штамма вируса шарки.

Одним из показателей, определяющим работу фотосинтетического аппарата растений, является отношение хлорофиллов «а» и «b», которое обусловлено активностью хлорофилла «а». Известно, что чем выше отношение, тем интенсивнее проходит процесс фотосинтеза.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у большинства сортов сливы домашней: Стенлей, Кабардинская ранняя, Ренклод Альтана и Чачакская поздняя отношение хлорофиллов *a/b* увеличивалось с 2,5 до 3,01 единиц у здоровых растений и с 3,0 до 3,4 единиц у инфицированных. У сорта Мелитопольская обильная, инфицированного двумя штаммами вируса шарки *PPV-D* и *PPV-M*, отношение хлорофиллов у здоровых растений составило 3,1 единицы, а у инфицированных растений 3,7 (табл. 12).

Таким образом, установлено, что у инфицированных растений сортов сливы домашней процесс фотосинтеза идет более интенсивно, судя по показателю

отношения хлорофиллов «a» и «b». Особенно это отмечается у растений сливы сорта Мелитопольская обильная, инфицированного сразу двумя штаммами вируса шарки сливы.

Таблица 12 – Содержание каротина и соотношения пигментов в листьях здоровых и инфицированных вирусом шарки растений сливы домашней (2011-2013 гг.)

Сорт	Статус растения	Отношение хлорофиллов a/b	Каротиноиды, мг/гСВ	Отношение $(a+b)/$ каротиноиды
Стенлей (штамм D)	здоровый (без PPV)	3,01	1,81	2,6
	инфицированный (PPV)	3,4	1,35	1,6
Кабардинская ранняя (штамм W)	здоровый (без PPV)	2,74	1,71	2,2
	инфицированный (PPV)	3,2	1,49	1,9
Ренклюд Альтана (штамм D)	здоровый (без PPV)	2,9	1,43	2,7
	инфицированный (PPV)	3,4	1,91	1,5
Чачакская поздняя (штамм D)	здоровый (без PPV)	2,5	1,38	2,6
	инфицированный (PPV)	3,0	1,71	1,5
Мелитопольская (штаммы D и M)	здоровый (без PPV)	3,7	1,06	4,2
	инфицированный (PPV)	3,1	1,6	1,7

По содержанию каротиноидов в листьях сливы выявлены некоторые особенности. Так у инфицированных растений сортов Ренклюд Альтана, Чачакская поздняя и Мелитопольская выявлено увеличение количества каротиноидов по сравнению со здоровыми растениями (табл. 12). Наибольшее увеличение количества каротиноидов отмечено у сорта Мелитопольская, в котором были идентифицированы сразу два штамма вируса шарки *PPV-D* и *PPV-M*. У здоровых растений его содержание составляло 1,06 мг/гСВ, у инфицированных 1,6 мг/гСВ. Таким образом, его содержание увеличилось на 0,59 мг/гСВ или 50,9 %.

У сорта Ренклюд Альтана, инфицированного штаммом *PPV-W* количество каротиноидов в листьях инфицированных вирусом шарки растений увеличилось на 0,48 мг/гСВ или 33,6 % и составляло 1,91 мг/гСВ, у здоровых растений – 1,43 мг/г СВ (табл. 12).

Количество каротиноидов в листьях здоровых растений сорта Чачакская поздняя составляло 1,38 мг/г СВ, в листьях инфицированных растений (штамм *PPV-D*) – 1,71 мг/гСВ. Таким образом, содержание пигмента увеличилось на 0,33 мг/гСВ или 25,7 %.

У сортов Стенлей, инфицированного штаммом *PPV-D*, и Кабардинская ранняя, инфицированного штаммом *PPV-W*, количество каротиноидов в листьях инфицированных растений уменьшилось. У сорта Стенлей в листьях здоровых растений количество каротиноидов составляло 1,81 мг/г СВ, в листьях инфицированных вирусом шарки растений 1,35 мг/г СВ, т.е. их количество уменьшилось на 0,46 мг/г СВ или 25,4 % по сравнению со здоровыми растениями. Количество каротиноидов в листьях инфицированных растений сорта Кабардинская ранняя составляло 1,49 мг/гСВ, у здоровых растений 1,71 мг/гСВ, т.е. снижение составило 0,22 мг/гСВ или 12,9 % (табл. 12).

Таким образом, у сортов сливы Ренклюд Альтана, Чачакская поздняя, Мелитопольская отмечена более сильная реакция на снижение каротиноидов, чем у сортов Стенлей и Кабардинская ранняя.

Отношение суммы хлорофиллов к каротиноидам ($a+b$ /каротиноиды) играет не менее важную роль при характеристике работы фотосинтетического аппарата. Анализ позволил установить, что у инфицированных растений отмечено снижение этого отношения (табл. 12). Так, у сорта Кабардинская ранняя, инфицированного штаммом *PPV-W*, отношение суммы хлорофиллов к каротиноидам снизилось с 2,6 единиц у здоровых растений до 1,6 у инфицированных растений. У растений сортов Стенлей и Чачакская поздняя, инфицированных штаммом *PPV-D* вируса шарки, у растений сорта Ренклюд Альтана, инфицированного штаммом *PPV-W*, отношение суммы хлорофиллов ($a+b$) к каротиноидам снизилось с 2,2-2,6 единиц у здоровых растений, до 1,5-1,9 у инфицированных.

У растений сорта Мелитопольская, инфицированного штаммами *PPV-D* и *PPV-M*, соотношение суммы хлорофиллов к каротиноидам уменьшилось больше всего: с 4,2 у здоровых растений до 1,7 у инфицированных (табл. 12).

В результате проведенных исследований установлены особенности

изменения содержания пигментов у инфицирования вирусом шарки растений в зависимости от сорта и штамма вируса шарки.

В листьях инфицированных вирусом шарки растений снижается количество хлорофилла «a» на 19,1-40,5 %, хлорофилла «b» на 29,8-44,3 % в зависимости от сорта. У сортов сливы Ренклод Альтана, Чачакская поздняя, Мелитопольская количество каротиноидов в листьях инфицированных растений повышается на 25,7-50,9 %, у сортов Кабардинская ранняя и Стенлей, проявляющих более сильную толерантность, количество каротиноидов снижается на 25,4 и 12,9 % соответственно. У сорта Мелитопольская, инфицированном сразу двумя штаммами вируса шарки сливы, отмечалось наиболее сильное изменение показателей содержания хлорофиллов «a» и «b» и каротиноидов.

Таким образом, реакция растений на инфицирование вирусом шарки определяется степенью восприимчивости сорта и штаммом вируса шарки.

3.4.3 Влияние вируса шарки на качество плодов сливы

Известно, что качество плодов, в том числе динамика биохимических показателей определяется особенностью сорта, погодными условиями, а также влиянием различных инфекций (грибных, бактериальных, вирусных).

В результате исследования биохимического состава плодов разных сортов сливы определено, что у инфицированных вирусом шарки растений отмечено снижение содержания сухих веществ и сахаров (табл. 13).

Анализ полученных данных показал, что в среднем у инфицированных вирусом шарки растений количество сухих веществ снижалось на 2,3 %. У сорта Стенлей и Мелитопольская количество сухих веществ снижается на 1,8 %, у сорта Ренклод Альтана на 3,3 %. Если рассматривать содержание сухих веществ по годам, то в более засушливые годы 2011-2012 гг. их количество в целом было выше, и у здоровых растений, и у инфицированных.

Содержание сахаров в плодах сливы инфицированных растений также снизилось (табл. 13).

Так, у сорта Мелитопольская, инфицированного штаммами *PPV-D* и *PPV-M* вируса шарки сливы, количество сахаров уменьшилось на 1,1 %, у сорта Ренклюд Альтана, инфицированного штаммом *PPV-W* на 1,3 %, у сорта Стенлей, инфицированного штаммом *PPV-D* на 0,9 %.

Таблица 13 - Биохимические показатели плодов разных сортов сливы домашней в зависимости от инфицированности вирусом шарки сливы (2011-2013 гг.)

Сорт	Статус растения	2011 г.	2012 г.	2013 г.	Среднее:
Сухие вещества, %					
Стенлей	здоровый (без <i>PPV</i>)	19,6	19,8	17,9	19,1
	инфицированный (<i>PPV-D</i>)	17,8	18,2	15,9	17,3
Ренклюд Альтана	здоровый (без <i>PPV</i>)	23,4	28,6	22,4	24,8
	инфицированный (<i>PPV-W</i>)	20,2	23,7	20,6	21,5
Мелитопольская обильная	здоровый (без <i>PPV</i>)	12,6	13,8	11,7	12,7
	инфицированный (<i>PPV-D</i> , <i>PPV-M</i>)	10,7	11,4	10,6	10,9
Сахара, %					
Стенлей	здоровый (без <i>PPV</i>)	12,4	14,1	11,1	12,5
	инфицированный (<i>PPV-D</i>)	12,2	12,6	10,0	11,6
Ренклюд Альтана	здоровый (без <i>PPV</i>)	13,1	13,3	11,8	12,7
	инфицированный (<i>PPV-W</i>)	12,7	11,2	10,3	11,4
Мелитопольская	здоровый (без <i>PPV</i>)	13,0	12,5	11,1	12,2
	инфицированный (<i>PPV-D</i> , <i>PPV-M</i>)	12,0	10,8	10,5	11,1

В годы с дефицитом осадков (2011-2012 гг.) сахаров в плодах накапливалось больше, чем в год с достаточным количеством осадков (2013 г.).

Содержание свободных органических кислот в инфицированных вирусом шарки растениях в среднем снизилось на 0,06 % у сортов Ренклюд Альтана и Мелитопольская, у сорта Стенлей на 0,08 % (табл. 14).

Количество аскорбиновой кислоты в плодах инфицированных вирусом шарки растений в среднем снизилось на 0,8 мг/100 г у сорта Стенлей, на 0,6 мг/100г у сорта Мелитопольская и на 0,2 мг/100 г у сорта Ренклюд Альтана. В

2013 году содержание витамина С в плодах сливы в целом было выше, чем в 2011 - 2012 гг., которые были более засушливыми (табл. 14).

Таблица 14 – Содержание свободных органических кислот и аскорбиновой кислоты в связи от инфицированностью вирусом шарки сливы (2011-2013 гг.)

Сорт	Статус растения	2011 г.	2012 г.	2013 г.	Среднее:
Свободные органические кислоты, %					
Стенлей	здоровый (без PPV)	0,83	0,81	0,85	0,83
	инфицированный (PPV)	0,73	0,75	0,76	0,75
Ренклод Альтана	здоровый (без PPV)	0,69	0,66	0,70	0,68
	инфицированный (PPV)	0,6	0,61	0,65	0,62
Мелитопольская обильная	здоровый (без PPV)	0,72	0,70	0,74	0,72
	инфицированный (PPV)	0,65	0,64	0,69	0,66
Аскорбиновая кислота, мг/100 г					
Стенлей	здоровый (без PPV)	5,5	5,2	5,8	5,5
	инфицированный (PPV)	4,4	4,2	5,4	4,7
Ренклод Альтана	здоровый (без PPV)	6,5	5,9	7,0	6,5
	инфицированный (PPV)	6,1	6,0	6,8	6,3
Мелитопольская обильная	здоровый (без PPV)	3,8	3,6	4,3	3,9
	инфицированный (PPV)	3,0	3,4	3,5	3,3

По количеству антоцианов в плодах у инфицированных вирусом шарки растений наблюдалось не значительное снижение у сортов Мелитопольская 2,2 мг/100 г и у сорта Ренклод Альтана на 8,2 мг/100 г, у сорта Стенлей снижение антоцианов было более существенным и составило 28,2 мг/100 г (табл. 15).

Таблица 15 – Содержание антоцианов в плодах сливы, в зависимости от инфицированности вирусом шарки (2011-2013 гг.)

Сорт	Статус растения	2011 г.	2012 г.	2013 г.	Среднее:
Стенлей	здоровый (без PPV)	96,9	92	86,2	91,7
	инфицированный (PPV)	61,7	69,3	58,6	63,2
Ренклод Альтана	здоровый (без PPV)	44,5	41,1	39,2	41,6
	инфицированный (PPV)	32,1	34,7	33,4	33,4
Мелитопольская	здоровый (без PPV)	23,3	33,1	22,5	26,3
	инфицированный (PPV)	25,0	26,4	20,9	24,1

Выявлено, что независимо от складывающихся погодных условий в период проведения исследований в плодах инфицированных вирусом шарки растений происходит снижение количества сухих веществ на 2,3 %, сахаров на 0,9-1,3 %, антоцианов на 2,2 до 28,2 мг/100 г.

3.4.4 Влияние вируса шарки на урожайность сливы домашней

Основным показателем состояния плодовых растений, в том числе сливы домашней, является урожайность.

В результате сравнительного анализа урожая инфицированных и здоровых вирусом шарки растений сортов сливы домашней выявлено, что урожайность деревьев, инфицированных вирусом шарки, в среднем ниже на 5,4 - 38,6 %, чем здоровых, в зависимости от сорта (табл. 16). Установлено, что у сорта Стенлей, который считается толерантным к вирусу шарки сливы сортом, снижение урожайности в среднем составляло 2,7 % или 0,5 т/га.

Таблица 16 – Урожайность здоровых и инфицированных вирусом шарки растений разных сливы домашней, 2011-2013 гг.

Сорт	Урожайность						
	Здоровые (без PPV)		Инфицированные (PPV)		Снижение урожая в среднем		
	кг/дерево	т/га	кг/дерево	т/га	кг/дерево	т/га	%
Стенлей (контроль)	45	18,7	43,8	18,2	1,2	0,5	2,7
Гилберт	15,7	6,5	14,8	6,15	0,9	0,3	5,4
Кабардинская ранняя	38,6	16,1	35,9	14,9	2,7	1,2	7,4
Ренклюд Альтана	23,4	9,7	21,8	9,1	1,6	0,6	6,2
В среднем:					1,6	0,65	5,4
Мелитопольская	21,4	8,9	18,3	7,6	3,1	1,3	14,6
Чачакская улучшенная	10,5	4,4	8,0	3,3	2,5	1,1	25,0
Венгерка юбилейная	17,7	7,4	13	5,4	4,7	2,0	27,0
Кубанский карлик	12,2	5,1	8,6	3,6	3,6	1,5	29,4
В среднем:					3,47	1,47	24,0
Стринова	16	6,7	10	4,2	6	2,5	37,3
Дорита	10,7	4,5	6,5	2,7	4,2	1,8	40,0
В среднем:					5,1	2,15	38,6

Сорта Гилберт, Кабардинская ранняя, Ренклюд Альтана, Мелитопольская нами были отнесены к частично толерантным к вирусу шарки. Так у сорта Гилберт урожайность инфицированных деревьев снижалась в среднем на 5,4 % или на 0,3 т/га, у сорта Кабардинская ранняя на 7,4 % или 1,2 т/га и составляла 14,9 т/га, у сорта Ренклюд Альтана на 6,2 % или 0,6 т/га и составляла 9,1 т/га (табл. 16).

У сорта Мелитопольская урожайность снижается в среднем на 14,6 % или 1,3 т/га и составляет 7,6 т/га. У сортов Чачакская улучшенная, Венгерка юбилейная, Кубанский карлик снижение урожайности в среднем не превышает 30 %. У сорта Чачакская улучшенная инфицированные вирусом шарки деревья дают на 25 % меньше урожая, чем здоровые. У сорта Венгерка юбилейная урожайность снижается на 27 %, у сорта Кубанский карлик на 29,4 %. В среднем количество собранных плодов снижается на 1,1-2,0 т/га (табл. 16).

Более сильное влияние на урожайность, наряду с другими факторами, вирус шарки оказывает на сортах Стринова и Дорита. У инфицированных растений урожайность сорта Стринова снижается на 37,3 % или 2,5 т/га, у сорта Дорита на 40 % или 1,8 т/га. Их мы отнесли к группе сортов восприимчивых к вирусу шарки сливы.

Таким образом, вирус шарки сливы имеет распространение в Прикубанской зоне южного садоводства. Вирус снижает урожайность восприимчивых сортов и представляет собой источник инфекции на зараженных толерантных сортах, поэтому существует необходимость перехода на безвирусное производство посадочного материала, ключевым методом которого является клональное микроразмножение.

Оценка сортов сливы позволила выделить сорта с различной восприимчивостью к вирусу шарки. С целью определения эффективности солей янтарной кислоты в культуре *in vitro* при микрклональном размножении были отобраны пять сортов сливы, проявляющие толерантность к вирусу.

3.5 Оптимизация этапов клонального микроразмножения сливы домашней

3.5.1 Подбор эффективных и безопасных стерилизаторов для санации эксплантов сливы домашней при введении в культуру

В качестве показателей эффективности стерилизующих агентов учитывали долю стерильных, инфицированных патогенной микрофлорой эксплантов, некротизировавших, вследствие фитотоксичности стерилизатора.

Установлено, при введении в культуру эксплантов сливы минимальное количество инфицированных эксплантов было отмечено в варианте с использованием 0,1 %-го раствора йодида ртути (HgJ_2) (табл. 17).

Таблица 17 – Оценка эффективности стерилизующих препаратов при введении в культуру *in vitro* эксплантов сливы домашней (2013-2015 гг.), %

Вариант (концентрация, экспозиция)	Показатели развития эксплантов	Сортообразцы					
		Стен- лей	Кабардин- ская ранняя	Блю- фри	Анна Шпет	Чачак- ская поздняя	Ср.
Жизнеспособные экспланты							
HgJ ₂ , 0,1 %, 30 секунд (St)	жизнеспособные	87	79	85	75	82	82
	инфицированные	10	11	3	8	12	9
	некроз	3	7	12	17	6	9
Гипохлорит Na,1:9 (8 мин.)	жизнеспособные	63	75	72	58	61	68
	инфицированные	12	10	15	13	12	12
	некроз	25	15	13	29	27	22
Гипохлорит Na,1:9 (8 мин.) + 0,3 % р-р «Абактерила», (20 мин.)	жизнеспособные	35	30	33	40	57	39
	инфицированные	28	25	15	22	18	22
	некроз	37	45	52	38	25	39
Гипохлорит Na,1:9 (10 мин.)	жизнеспособные	30	27	35	31	49	34
	инфицированные	9	14	17	12	22	15
	некроз	61	59	48	57	29	51
Гипохлорит Na, 1:9 (10 мин.) + «Абактерила» (0,3 %), (20 мин.)	жизнеспособные	30	32	28	42	51	37
	инфицированные	31	21	35	29	27	29
	некроз	39	47	37	29	22	34

Уровень контаминации в варианте с йодидом ртути составлял 9 %. Максимальная инфицированность апексов отмечена при ступенчатой обработке гипохлоритом натрия в разведении 1:9 и Абактерилом (0,3 % - p-p). При стерилизации эксплантов гипохлорита натрия в экспозиции 8 и 10 минут заражение сапрофитной микрофлорой составило 12 и 15 % соответственно.

Средняя приживаемость эксплантов варьировала от 34 до 82 % (табл. 17).

Эффективность йодида ртути при санации побегов сливы была наиболее высокая, выход стерильных эксплантов составлял 75-87 % в зависимости от сорта (табл. 17, рис. 6).

Эффективность обработки эксплантов, более безопасным гипохлоритом натрия (1:9) в экспозиции 8 минут, была ниже на 12-17 %, чем при обработке йодидом ртути. Выход стерильных жизнеспособных эксплантов составлял 58-75 % в зависимости от сорта (рис. 7).

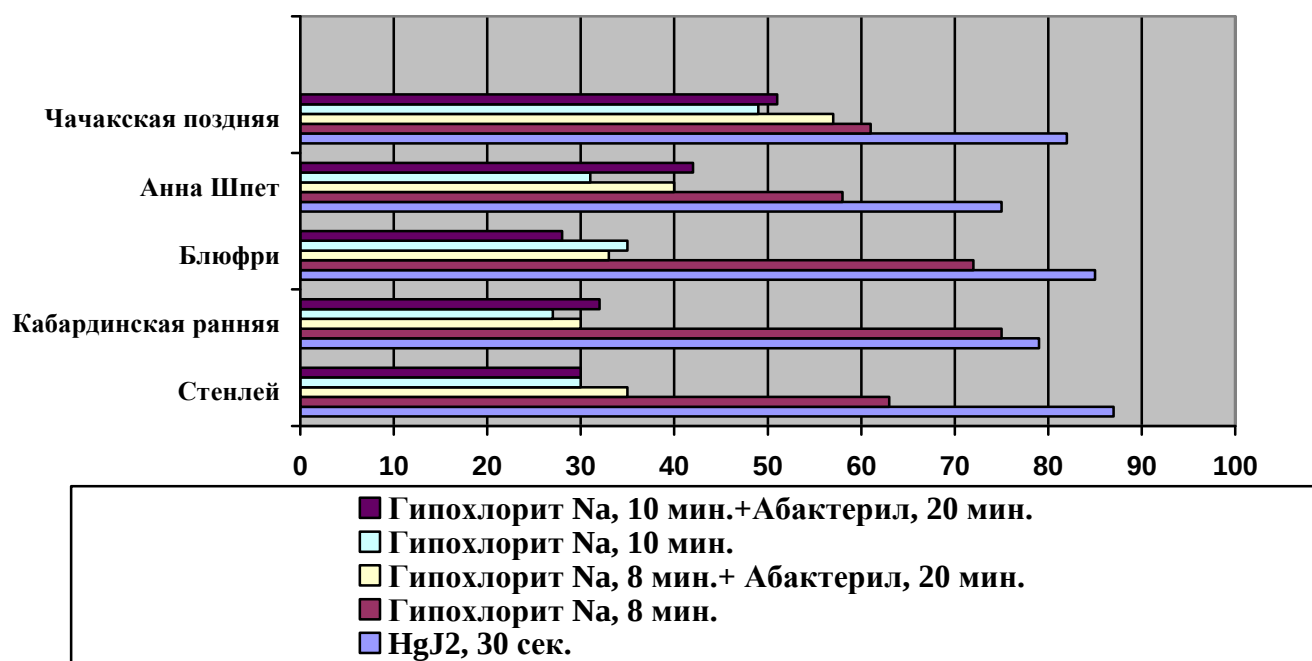


Рисунок 7 – Процент выхода стерильных эксплантов сливы домашней (2013-2015 гг.)

В варианте с обработкой эксплантов раствором гипохлорита натрия (1:9) с экспозицией 8 минут количество эксплантов, пригодных для культивирования,

было на 16 % ниже, чем после йодида ртути и составило 68 %, количество инфицированных эксплантов составило 12 %, некроз эксплантов 22 % (табл. 17).

Раствор гипохлорита натрия в экспозиции 10 минут оказался еще более токсичным для растительных тканей, выход жизнеспособных эксплантов 34 %, что ниже стандарта на 48 %. Количество эксплантов погибших в результате токсичности препарата составило 51 %.

Большой устойчивостью к действию всех стерилизующих препаратов отличились экспланты сортов Стенлей, Блюфри, Чачакская поздняя.

Низкий выход стерильных апексов отмечается в варианте с двухступенчатой обработкой раствором гипохлорита натрия и препаратом «Абактерил» – 39 % в среднем (табл. 17, рис. 7). Гибель эксплантов от инфекции составила в этом варианте 22 % в среднем, что больше, чем в вариантах с йодидом ртути и раствором гипохлорита натрия. При двухступенчатой обработке раствором гипохлорита натрия и препаратом «Абактерил» увеличивается доля инфицированных эксплантов, что свидетельствует о низкой эффективности, по сравнению с йодидом ртути и раствором гипохлорита натрия (в применяемых концентрациях и экспозициях). Некроз эксплантов в варианте с двухступенчатой обработкой раствором гипохлорита натрия и препаратом «Абактерил» составил 39 % в среднем, что значительно больше, чем в вариантах с йодидом ртути (9 %) и раствором гипохлорита натрия (22 %).

Значительное увеличение доли некротизировавших эксплантов свидетельствует о высокой фитотоксичности двухступенчатой обработки раствором гипохлорита натрия и препаратом «Абактерил» по сравнению с раствором йодида ртути и раствором гипохлорита натрия.

Дисперсионный анализ результатов оценки эффективности стерилизаторов показал, что воздействие стерилизующих препаратов на результативность санации является статистически достоверным для всех изученных показателей ($F_{\text{факт.}} > F_{\text{табл.}}$) (табл. 18).

Таблица 18 - Результаты дисперсионного анализа оценки эффективности стерилизующих веществ, 2013-2015 гг.

Изменчивость	Степени свободы	Средний квадрат	Критерий Фишера	Дисперсия	Доля в общей дисперсии, %
Жизнеспособные экспланты					
Между годами	2	3,51	3,72*	0,04	0,1
Между сортами	4	5,14	5,45*	0,12	0,4
Между вариантами обработки	3	1306,86	1383,74*	29,02	90,5
«Год × сорт»	8	0,74	0,78	0,00	0,0
«Год × вариант»	6	1,19	1,269	0,00	0,0
«Сорт × вариант»	12	11,49	12,18*	1,17	3,6
«Год × сорт × вариант»	24	3,26	3,46*	0,77	2,4
Остаточная	120	0,94	—	0,94	3,0
Инфицированные экспланты					
Между годами	2	0,117	0,132	0,00	0,0
Между сортами	4	2,092	2,34	0,00	0,0
Между вариантами обработки	3	1892,02	2141,91*	42,02	97,7
«Год × сорт»	8	0,55	0,627	0,00	0,0
«Год × вариант»	6	0,06	0,073	0,00	0,0
«Сорт × вариант»	12	1,97	2,23*	0,12	0,3
«Год × сорт × вариант»	24	0,66	0,75	0,00	0,00
Остаточная	120	0,88	—	0,88	2,0
Некроз эксплантов					
Между годами	2	3,84	6,11*	0,05	0,6
Между сортами	4	4,56	7,27*	0,11	1,3
Между вариантами обработки	3	292,62	466,12*	6,49	74,2
«Год × сорт»	8	0,51	0,80	0,00	0,0
«Год × вариант»	6	1,30	2,08	0,00	0,0
«Сорт × вариант»	12	9,70	15,45*	1,01	11,5
«Год × сорт × вариант»	24	2,04	3,24*	0,47	5,4
Остаточная	120	0,63	—	0,63	7,0

*-значения критерия Фишера, превосходящие стандартное для 5 %-ного уровня значимости.

Влияние стерилизующего препарата на эффективность стерилизации является статистически достоверным для всех изученных показателей. Доля влияния стерилизатора составила 90,5 %. Совместное влияние генотипа сорта и варианта обработки на выход жизнеспособных эксплантов – 3,6 %, некроз эксплантов – 11,5 %. Совместное влияние условий года и генотипа сорта, условий года и варианта обработки на выход жизнеспособных эксплантов не установлено.

Таким образом, выявлено, что эффективность препарата йодид ртути (HgJ_2), который относится к высокотоксичным веществам I класса опасности, в концентрации 0,1 % и экспозиции 30 секунд, составляет от 75 до 87 %. Эффективность гипохлорита натрия, который относится к малоопасным веществам IV класса опасности, в разведении 1:9 и экспозиции 8 минут составляет от 61 до 75 % в зависимости от сорта. В связи с этим его можно использовать в качестве альтернативы ртутным стерилизаторам, при проведении работ по санации эксплантов, как более экологичный и безопасный препарат.

3.5.2 Оптимизация сроков введения эксплантов сливы домашней в культуру *in vitro*

Важное значение для эффективного микроразмножения растений имеют сроки введения эксплантов в культуру *in vitro*. От срока интродукции в значительной степени зависит регенерационная активность эксплантов.

В связи с этим, была проведена сравнительная оценка весенних и летних сроков введения эксплантов сливы домашней в культуру *in vitro*. Учитывались следующие показатели: жизнеспособность эксплантов (число регенерировавших эксплантов к числу изначально высаженных), частота контаминации, некроз эксплантов (табл. 19, прил. В).

Наименьший процент выхода жизнеспособных эксплантов у сортов сливы Стенлей, Кабардинская ранняя, Блюфри, Анна Шпет и Чачакская поздняя отмечен при введении их в культуру из искусственно пробужденных почек в 3 декаде марта. В среднем за период исследований (2013-2015 гг.) у сортов Стенлей и

Блюффри приживаемость была в пределах 44,9-48,9 %, у сортов Кабардинская ранняя, Анна Шпет, Чачакская поздняя варьировала в диапазоне от 51,1 до 57,1 % (табл. 19).

Таблица 19 - Сводная таблица приживаемости эксплантов сливы домашней в различные сроки введения в культуру *in vitro*, %

Сорт	Срок введения	2013 г.	2014 г.	2015 г.	Среднее:	Отклонение от контроля, %
Стенлей	Март (3-я дек.) контроль	37,8	48,9	48	44,9	-
	Апрель (1 декада)	66,7	64,6	71,1	67,5	+22,6
	Май (1 декада)	84,4	80	86,7	83,7	+38,8
	Июнь (1 декада)	76,9	82	77,8	78,9	+34,0
Кабардинская ранняя	Март (3-я дек.) контроль	48,9	57,7	64,4	57,1	-
	Апрель (1 декада)	66,7	75,6	75,6	72,6	+15,5
	Май (1 декада)	78,5	83,3	84,4	82,1	+25,0
	Июнь (1 декада)	62,2	68,9	64,4	65,2	+8,1
Блюффри	Март (3-я дек.) контроль	44,4	46,7	55,6	48,9	-
	Апрель (1 декада)	62,2	54,8	66,7	61,2	+12,3
	Май (1 декада)	78,6	75,6	71,1	75,1	+26,2
	Июнь (1 декада)	83,3	84,4	82,2	83,3	+34,4
Анна Шпет	Март (3-я дек.) контроль	45,8	60	55,6	53,8	-
	Апрель (1 декада)	80	73,3	80	77,8	+24,0
	Май (1 декада)	73,3	80	82,2	78,5	+24,7
	Июнь (1 декада)	64,4	68,9	68,9	67,4	+13,6
Чачакская поздняя	Март (3-я дек.) контроль	40	53,3	60	51,1	-
	Апрель (1 декада)	73,3	64,4	68,9	68,9	+17,8
	Май (1 декада)	60	60,4	64,4	61,6	+10,5
	Июнь (1 декада)	60	68,9	64,4	64,4	+13,3

При инициации эксплантов в 1 декаде апреля количество жизнеспособных эксплантов увеличивается у сортов Стенлей, Блюффри, Чачакская поздняя до 61,2-68,9 %, у сортов Кабардинская ранняя и Анна Шпет до 72,6 и 77,8 %.

Установлено, что наилучшим сроком для введения в культуру *in vitro* эксплантов сливы сортов Стенлей, Кабардинская ранняя, и Анна Шпет является 1 декада мая, когда отмечена самая высокая приживаемость эксплантов.

У сорта Стенлей приживаемость эксплантов в 1 декаде мая составила в среднем 83,7 %, у сорта Кабардинская ранняя – 82,1 %. У сорта Анна Шпет приживаемость эксплантов в мае была почти на том же уровне, что и в апреле и составляла в среднем 78,5 %.

У сорта Блюфри уровень приживаемости эксплантов в мае составлял 75,1 %, что на 8,2 % ниже, чем в июне, когда приживаемость эксплантов была самая высокая и составляла 83,3 %. Для сорта сливы Чачакская поздняя в мае приживаемость немного снижается и составляет в среднем 61,6 % (табл. 18).

Уровень приживаемости эксплантов, определяется также инфицированностью и некрозом. В период искусственного пробуждения почек (3 декада марта) отмечен наиболее высокий уровень контаминации эксплантов сортов сливы Стенлей, Кабардинская ранняя, Блюфри, Анна Шпет, Чачакская поздняя, который составил в среднем 36,4 - 43,4 % от общего количества введенных в культуру эксплантов (табл. 18, рис. 8).

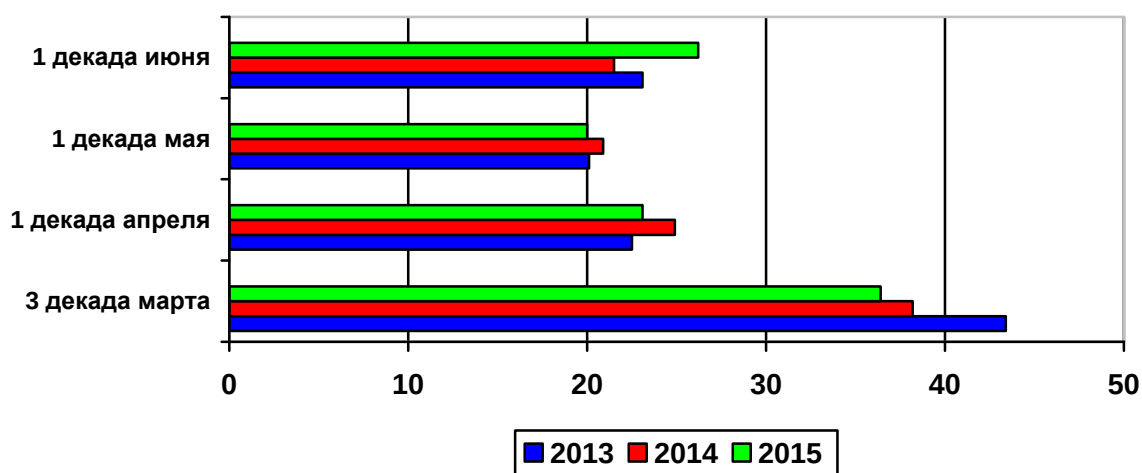


Рисунок 8 – Процент инфицированности эксплантов сливы в зависимости от срока введения в культуру (2013-2015 гг.)

Комнатные условия способствовали развитию патогенной микрофлоры, от которой не удалось избавиться полностью во время стерилизации эксплантов. В последующие месяцы уровень инфицированности эксплантов в среднем по годам

был существенно ниже в 1 декаде апреля 22,5-24,9 %, в 1 декаде мая 20-20,9 %, в 1 декаде июня 23,1-26,2 % (рис. 8).

Уровень некроза эксплантов сортов сливы Стенлей, Кабардинская ранняя, Блюффри, Анна Шпет, Чачакская поздняя в среднем по годам был более высоким в 3 декаде марта и варьировал от 7,0 до 13,2 %. В следующие сроки инициации уровень некроза снизился в апреле до 4,5-7,7 %, в мае до 2,2-5,0 %, в июне он составил 2,2-7,9 %. Отмечено, что в 2013 году уровень некроза эксплантов по срокам введения в культуру в целом был выше, чем в другие годы исследований (рис. 9).

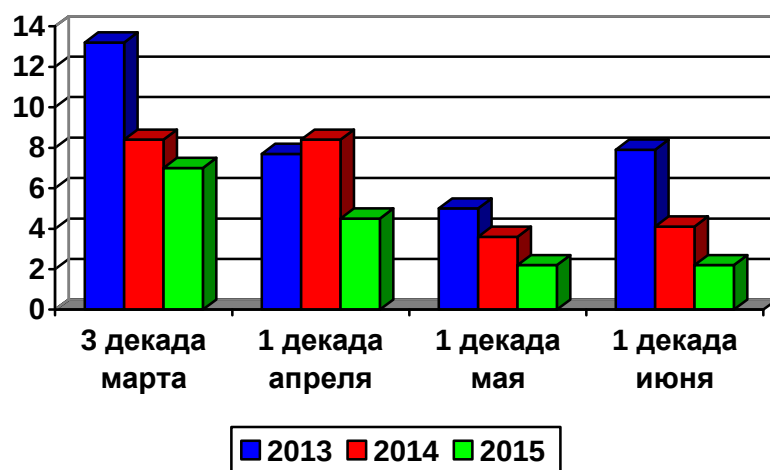


Рисунок 9 – Процент некроза эксплантов сливы в зависимости от срока введения в культуру (2013-2015 гг.)

Статистическая обработка результатов исследований подтвердила существенность влияния генотипа экспланта, года исследований и месяца введения в культуру *in vitro*, а также взаимодействия сорт и месяц.

Влияние сроков введения эксплантов в культуру *in vitro* является статистически достоверным. Доля влияния этого фактора на приживаемость эксплантов составила 36,8 %. Приживаемость эксплантов зависит также от генотипа сорта, доля влияния составила 2,5 % и от условий года, доля влияния фактора – 3,5%. Доля совместного влияния генотипа сорта и месяца интродукции 12,1 % (табл. 20).

Таблица 20 - Результаты дисперсионного анализа влияния сроков интродукции на регенерацию меристем сливы домашней, 2013-2015 гг.

Изменчивость	Степени свободы	Средний квадрат	Критерий Фишера	Дисперсия	Доля в общей дисперсии
Количество развившихся меристем					
Между годами	2	16,07	5,65**	0,22	3,5
Между сортами	4	8,71	3,06*	0,16	2,5
Между месяцами	3	107,28	37,72**	2,32	36,8
«Год × сорт»	8	0,62	0,22	0,00	0,0
«Год × месяц»	6	2,66	0,94	0,00	0,0
«Сорт × месяц»	12	9,65	3,39*	0,76	12,1
«Год × сорт × месяц»	24	1,04	0,37	0,00	0,0
Остаточная	120	2,84	-	2,84	45,1

*-значения критерия Фишера, превосходящие стандартное для 5 %-ного уровня значимости; ** - для 1 % - ного уровня значимости.

Предполагаем, что некоторые различия по годам и месяцам, были обусловлены этапами органогенеза растений в год исследований на момент изолирования эксплантов и чувствительностью эксплантов к стерилизующему препарату.

В общем, при введении эксплантов сортов сливы Стенлей, Кабардинская ранняя, Блюфри, Анна Шпет в культуру *in vitro* в период активного роста побегов (май-июнь), отмечена высокая регенерационная способность от 78,5-83,7 %. Для сорта Чачакская поздняя в целом была характерна более низкая приживаемость эксплантов во все сроки изоляции от 51,1 до 68,9 % (табл. 19).

Развитие эксплантов сортов сливы домашней идет более активно, так как растения переходят к вегетативному росту, после периода цветения.

Установлено, что для сортов сливы Стенлей и Кабардинская ранняя лучшим сроком введения эксплантов в культуру *in vitro* является 1 декада мая, доля развившихся эксплантов составляла 83,7 % и 82, 1 %, что превышало показатели контроля (3 декада марта) на 38,8 % и 25 %. Экспланты сорта Анна Шпет можно вводить в культуру в первые декады апреля и мая, т.к. уровень приживаемости эксплантов составлял 77,8 и 78,5 %, что превышало показатели контроля (3 декада

марта) на 24,0 и 24,7 %. Для сорта Чачакская поздняя оптимальным сроком для введения в культуру является 1 декада апреля. В это время доля развившихся эксплантов составляла 68,9 %, что превышало показатель контроля (3 декада марта) на 17,8 %. Для сорта Блюфри лучшим периодом инициации была 1 декада июня, когда прижились 83,3 % эксплантов, что на 34,4 % выше, чем в контрольном варианте (табл. 19).

Таким образом, введение эксплантов в культуру *in vitro* в наиболее благоприятные сроки позволяет получить большее количество эксплантов и повысить эффективность размножения сливы за счет повышения уровня регенерации на 17,8 - 38,8 % в зависимости от сорта по сравнению с контрольным периодом (3 декада марта) (табл. 19).

3.5.3 Подбор оптимальной среды для микроразмножения сортов сливы *in vitro*

Правильно подобранная питательная среда является одним из определяющих факторов эффективности микроразмножения растений. При введении в культуру нового вида, сорта и даже тканей одного и того же вида, требуются питательные среды, различающиеся по составу.

Установлено, что наибольший коэффициент размножения после двух пассажей был на среде Мурасиге-Скуга. В зависимости от сорта коэффициент составлял от 1:3,6 до 1:5,8 единиц, на среде Гамборга от 1:2,9 до 1:3,9, самый низкий коэффициент отмечен на среде Уайта от 1:2,0 до 1:2,5 (табл. 21).

Количество листьев на растениях в вариантах со средой Мурасиге-Скуга и средой Гамборга были практически на одном уровне и составляли 6,7 и 6,9 шт. соответственно. На среде Уайта этот показатель был ниже и составлял 4,9 шт. на одно микрорастение.

Длина микропобегов, образованных на среде Мурасиге-Скуга, также была самой высокой – 17,9 мм, на среде Гамборга – 13,9 мм, на среде Уайта – 8,2 мм.

Наибольшее количество хлоротичных растений отмечено на среде Уайта – 13,3 %, на среде Гамборга – 8 % и 4,7 % на среде Мурасиге-Скуга (табл. 21).

Таблица 21 - Качественный анализ микропобегов сливы домашней на различных питательных средах, этап мультипликации (после 2-х пассажей), 2012 гг.

Показатель	Сорт	Мурасиге-Скуга (st)	Среда Гамборга (B5)	Среда Уайта
Коэффициент размножения, ед.	Стенлей	1:5,8	1:3,7	1:2,5
	Кабардинская ранняя	1:3,6	1:2,9	1:2,0
	Блюфри	1:4,4	1:3,9	1:2,4
	среднее:	1:4,6	1:3,5	1:2,3
Количество листьев, шт.	Стенлей	7,0	7,1	5,4
	Кабардинская ранняя	7,3	7,4	4,2
	Блюфри	5,8	6,2	5,2
	среднее:	6,7	6,9	4,9
Длина микропобегов, мм	Стенлей	19,8	14,0	9,2
	Кабардинская ранняя	15,5	15,3	7,6
	Блюфри	18,5	13,3	7,8
	среднее:	17,9	13,9	8,2
Хлороз, %	Стенлей	4	5	16
	Кабардинская ранняя	3	9	11
	Блюфри	7	10	13
	среднее:	4,7	8	13,3
Витрификация, %	Стенлей	2	5	7
	Кабардинская ранняя	3	7	4
	Блюфри	1	8	3
	среднее:	2	6,7	4,7

Витрификация (стекловидность) побегов – одна из проблем, с которой приходится сталкиваться при микроразмножении растений (Клональное микроразмножение растений, 2005). По мнению О.В. Матушкиной и др. (2008, 2012) самой вероятной причиной витрификации является реакция на гормональный состав среды.

При микроразмножении сливы витрификация побегов отмечалась во всех вариантах опыта, но наименьший процент витрифицированных растений был на среде Мурасиге-Скуга – 2 %, на среде Гамборга – 6,7 %, на среде Уайта – 4,7 %.

Установлено, что для сорта Стенлей лучше всего подходит вариант со средой Мурасиге-Скуга. Коэффициент размножения на данной среде у сорта Стенлей составлял 1:5,8, длина микропобегов 19,8 мм, количество листьев – 7 шт. на растение, хотя в варианте на среде Гамборга количество листьев было почти таким же – 7,1 шт. В этом варианте низкий уровень витрификации – 2 % и хлороза – 4 % (табл. 21).

Внешний вид микропобегов сливы сорта Стенлей на изучаемых питательных средах показан на рисунке 10, на котором видна разница по количеству образующихся побегов и листьев.



а



б



в

Рисунок 10 – Внешний вид микропобегов сливы сорта Стенлей на этапе мультипликации на средах: а – Мурасиге-Скуга, б – Гамборга (B5), в – Уайта

У сорта Кабардинская ранняя, в целом, наблюдается такая же ситуация – по коэффициенту размножения, общему состоянию растений, длине микропобегов, количеству листьев, подверженности хлорозу тканей.

Коэффициент размножения на среде Мурасиге-Скуга был самый высокий и составил 1:3,6, на среде Гамборга этот коэффициент был ниже 1:2,9, но по количеству листьев и длине микропобегов показатели в этих вариантах были близкими, 7,3-7,4 листовые пластинки на растении и длина побегов варьировала в пределах 15,3-15,5 мм (табл. 21).

Для сорта Блюфри вариант со стандартной средой Мурасиге-Скуга также оказался наиболее благоприятным. Коэффициент размножения на среде составлял 1:4,4, количество листьев – 5,8 шт., длина микропобегов – 18,5 мм. В этом варианте самый низкий уровень витрификации – 1 %, растений с хлоротичной окраской – 7 % (табл. 21).

Таким образом, можно сделать вывод, что лучшей средой для мультипликации *in vitro* сортов Стенлей, Кабардинская ранняя и Блюфри является среда Мурасиге – Скуга с добавлением БАП – 1,0 мг/л.

На следующем этапе работы конгломераты мультиплицированных побегов делили и пассировали на питательные среды для укоренения (ризогенеза). Для корнеобразования в среду добавляли ИМК в количестве 1 мг/л.

Установлено, что в среднем, на среде Мурасиге-Скуга укоренились 83 % микропобегов от общего количества, пассированных на среду для ризогенеза, что является максимальной величиной в эксперименте. В этом варианте образовалось наибольшее число корней – в среднем, 2,1 шт. на растение, суммарная длина которых составляла в среднем 8,5 см. Кроме того, в данном варианте было максимальное число листьев – в среднем 6,5 шт. на микрорастение (табл. 22).

На среде Гамборга (B5) укоренение микропобегов прошло чуть менее эффективно. Корни развились у 79 % эксплантов, число корней у одного микрорастения составило, в среднем, 1,7 шт., суммарная длина корней – 7,5 см (табл. 22).

Общее состояние растений на среде Гамборга хорошее и оценивается в 4,5 баллов, что близко к показателю состояния микрорастений на среде Мурасиге-Скуга. Количество листьев, образующихся у эксплантов сливы на среде В5 (Гамборга), также было на уровне со средой Мурасиге-Скуга, 6,3 шт. в среднем.

Таблица 22 - Качественный анализ микрорастений сливы домашней на этапе ризогенеза, 2012 г.

Показатели	Сорта	Мурасиге-Скуга (стандарт)	Среда Гамборга (В5)	Среда Уайта
Наличие корней, от общего числа растений, %	Стенлей	83	79	31
	Кабардинская ранняя	79	82	24
	Блюфри	88	76	29
	В среднем:	83,3	79	28
Количество корней, шт.	Стенлей	2,4	1,5	1,3
	Кабардинская ранняя	1,9	1,6	1,3
	Блюфри	2,1	1,9	1,9
	В среднем:	2,1	1,7	1,5
Суммарная длина корней, см	Стенлей	9,5	7,7	7,1
	Кабардинская ранняя	7,6	6,5	5,7
	Блюфри	8,3	8,4	6,4
	В среднем:	8,5	7,5	6,4
Количество листьев, шт.	Стенлей	7,0	6,2	6,7
	Кабардинская ранняя	6,5	6,8	6,4
	Блюфри	6,1	5,8	5,2
	В среднем:	6,5	6,3	6,1
Хлороз, %	Стенлей	0	8	12
	Кабардинская ранняя	5	15	12
	Блюфри	0	10	7
	В среднем:	1,7	11	10,3
Общее состояние растений по 5-балльной шкале	Стенлей	4,7	4,6	4,0
	Кабардинская ранняя	4,8	4,5	3,9
	Блюфри	4,5	4,3	3,8
	В среднем:	4,7	4,5	3,9

Отличительной особенностью варианта со средой Гамборга является высокий уровень хлороза растений – 11 % в среднем, что может

свидетельствовать о неблагоприятных условиях для развития микрорастений на анализируемой среде.

На среде Уайта укоренение микропобегов имело самую низкую эффективность. Корни развились лишь у 28 % эксплантов, число корней на одно микрорастение составило, в среднем, 1,5 шт., с суммарной длиной корней – 6,4 см (табл. 22).

Общее состояние растений неудовлетворительное и оценивается в 3,9 баллов, что значительно ниже показателей состояния микрорастений на средах Мурасиге-Скуга и Гамборга (B5). Облиственность эксплантов на среде Уайта приближается по значению к вариантам с Мурасиге-Скуга и Гамборга (B5) – 6,1 шт. в среднем. При культивировании растений на среде Гамборга (B5) на среде Уайта наблюдается появление хлороза у растений – 10,3 % в среднем, что может свидетельствовать о неблагоприятных условиях развития для микрорастений на анализируемой среде.

Установлено, что клональное микроразмножение сортов сливы Стенлей, Кабардинская ранняя и Блюфри на этапах мультипликации и ризогенеза наиболее эффективно проходит на среде Мурасиге – Скуга.

3.5.4 Ростовые реакции растений на препараты группы янтарной кислоты на этапе мультипликации эксплантов сливы в культуре *in vitro*

В технологии клонального микроразмножения традиционно используют природные регуляторы роста и их синтетические аналоги, которые принимают участие в регуляции процессов жизнедеятельности растений, и определяют характер, темпы роста и развития эксплантов (Высоцкий, 1976; 1989; Бутенко, 1999; Кухарчик и др., 2002).

В нашей работе проводилось испытание комплекса, ранее не применявшихся в клональном микроразмножении сливы домашней, биологически активных веществ – органических препаратов группы янтарной кислоты.

В культуре *in vitro* органические кислоты могут выполнять несколько функций: улучшать доступность некоторых питательных микроэлементов или действовать как питательные вещества (Plant Propagation by Tissue Culture, 2007).

Считается, что направленность действия и эффективность регуляторов роста напрямую зависит от их концентрации и длительности воздействия. В этой связи экспериментальные препараты сукцинат калия, сукцинат натрия, янтарная кислота были изучены на протяжении 3-х пассажей в концентрации 2; 4; 5 мг/л при микроразмножении сорта Стенлей. Использовали питательную среду по прописи Мурасиге – Скуга. В качестве стандартного ростового вещества использовали 6-БАП - 1 мг/л.

Основной задачей было исследование ростовой реакции у микрорастений сливы домашней на данные препараты, для оценки возможности их использования в культуре *in vitro*. В процессе исследований эффективность препаратов оценивали по следующим критериям: коэффициент размножения, количество листьев образующихся на микропобегах, высота микропобегов, наличие стволика (центрального побега), количество витрифицированных микропобегов, общее состояние эксплантов сливы.

В результате исследований влияния янтарной кислоты и сукцинатов калия и натрия в заданных концентрациях выявлены некоторые особенности их влияния на развитие эксплантов сливы *in vitro*.

Установлено, что БАВ группы янтарной кислоты обладают стимулирующим влиянием на регенерацию побегов эксплантами сливы домашней при микроразмножении (табл. 23).

При использовании БАВ в концентрации 2 мг/л, ниже всего коэффициент размножения был в варианте с янтарной кислотой 1:2,6, с сукцинатом натрия 1:3,0, с сукцинатом калия 1:2,1. В варианте с концентрацией веществ 5 мг/л этот показатель варьировал от 1:3,8 до 1:4,7.

Наибольший коэффициент размножения на средах с экспериментальными БАВ был в варианте с концентрацией 4 мг/л. На среде с янтарной кислотой 1:7,4, с сукцинатом натрия 1:6,9, сукцинатом калия 1:6,2.

Таблица 23 – Качественный анализ регенерировавших микропобегов сливы сорта Стенлей на средах с различными регуляторами роста после 3 пассажей, 2012 г.

Показатели	6- БАП, 1 мг/л (St)	Янтарная кислота, мг/л			Сукцинат натрия, мг/л			Сукцинат калия, мг/л			НСР 05
		2	4	5	2	4	5	2	4	5	
Коэффициент размножения, ед.	9	2,6	7,4	4,7	3,0	6,9	3,8	2,1	6,2	4,5	-
Количество листьев, шт.	9,1	7,4	11,3	9,7	6,6	10,6	10,1	6,0	10,2	9,6	1,06
Наличие стволика, % от общего числа	100	72	91	67	78	95	61	80	100	74	-
Длина микро- побегов (высота), мм	11,8	9,2	14,7	10,6	8,8	11,7	9,7	8,3	14,3	10,9	1,08
Наличие каллуса, %	27,8	0	0	17	0	0	0	0	0	0	-
Витрификация, %	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Общее состояние растений в баллах по 5 б. шкале	4,1	3,0	4,5	3,4	3,1	4,2	3,5	3,2	4,0	3,7	-

Длина побегов в варианте с концентрацией веществ 4 мг/л, составляла 11,7 мм с сукцинатом натрия, 14,3 мм с янтарной кислотой и 14,7 мм с сукцинатом калия, по сравнению с контрольным вариантом, где высота побегов составляла 11,8 мм. В вариантах с концентрацией веществ 2 и 5 мг/л длина микропобега варьировала в пределах 8,3-10,9 мм.

При концентрации 5 мг/л в вариантах с сукцинатом натрия и янтарной кислотой после трёх пассажей стволики развились только у 61-67 % мериклонов, при концентрации веществ 4 мг/л у 91-100 % растений.

В вариантах сред с концентрацией веществ 2 мг/л количество листьев было ниже на 25-34 %, чем в стандарте, и составляло 6,0-7,4 шт., а при концентрации 5 мг/л на 5-11 % выше, чем в стандарте и составляло 9,6-10,1 шт. Наибольшее количество листьев было в варианте с сукцинатом натрия в концентрации 4 мг/л – 11,3 шт., в вариантах с янтарной кислотой и сукцинатом калия в этой же концентрации 10,5 и 10,2 листочка на растение.

В варианте с концентрацией янтарной кислоты - 5 мг/л каллусообразование активнее идет. Каллус образовывался у 17 % эксплантов. В стандартном варианте

с 6-БАП каллус был у 27,8 % растений. В остальных вариантах применения БАВ каллусообразование отсутствует.

Витрифицированные побеги встречались только в стандартном варианте с 6-БАП, количество которых не превышало 5 % от общего количества растений.

Хорошее общее состояние микропобегов сливы также отмечено в вариантах с концентрацией веществ – 4 мг/л. В варианте с янтарной кислотой состояние побегов оценивалось на 4,5 балла, с сукцинатом натрия и калия 4,2 и 4,0 балла соответственно, на среде с 6-БАП 4,1 балла.

По всем показателям, характеризующим состояние мериклонов, лучшим оказался вариант с исследуемыми веществами в концентрации 4 мг/л, близкий и даже превышающий по некоторым показателям стандартный вариант с 6-БАП - 1 мг/л.

Поэтому для дальнейших исследований был выбран вариант наиболее близкий по основным показателям к стандарту (6-БАП): для всех исследуемых веществ это вариант с БАВ группы янтарной кислоты в концентрации 4 мг/л.

3.5.5 Раздельное применение БАВ на основе янтарной кислоты и стандартных ростовых веществ

На этапе мультипликации пяти сортов сливы домашней проведена оценка эффективности раздельного внесения экспериментальных веществ, когда в питательную среду добавляли только одно из биологически активных веществ в выбранной концентрации 4 мг/л. В качестве стандартного варианта выбрана композиция из 6-БАП 1 мг/л и ГК 0,5мг/л.

В результате микроразмножения сливы установлено, что биологически активные вещества: янтарная кислота, сукцинаты калия и натрия, стимулируют пролификацию побегов сливы (табл. 24).

Наиболее высокий коэффициент размножения отмечен на среде с янтарной кислотой, в среднем он составляет 1:2,2, на средах с сукцинатами натрия и калия - 1:1,8 и 1:1,9.

На среде со стандартными ростовыми веществами коэффициент размножения почти в 2 раза выше – 1:3,6. В третьем пассаже коэффициент размножения на среде с янтарной кислотой самый высокий и составляет, в среднем по сортам, 1:3,0, на стандартной среде с 6-БАП 1:3,8.

Таблица 24 – Коэффициенты размножения эксплантов различных сортов сливы на средах с БАВ группы янтарной кислоты, 2013-2015 гг.

Сорт	Коэффициенты размножения в пассажах					
	1	2	3	4	5	Х ср.
6-БАП 1 мг/л (стандарт)						
Стенлей	2,9	4,0	4,5	4,2	4,6	4,0
Кабардинская ранняя	2,5	3,3	4,0	3,8	4,3	3,6
Блюфри	3,0	3,8	4,3	3,9	4,0	3,8
Анна Шпет	2,5	3,1	3,0	2,9	3,2	2,9
Чачакская поздняя	1,8	3,2	3,4	3,8	3,5	3,1
В среднем:	2,6	3,5	3,8	3,7	3,9	3,6
Янтарная кислота, 4 мг/л						
Стенлей	2,0	2,6	3,1	2,2	1,6	2,3
Кабардинская ранняя	1,9	2,4	2,9	2,0	1,3	2,1
Блюфри	2,3	3,0	3,5	2,4	1,8	2,6
Анна Шпет	1,2	2,0	2,7	2,6	1,9	2,1
Чачакская поздняя	1,6	2,2	2,6	2,0	1,4	2,0
В среднем:	1,8	2,4	3,0	2,2	1,6	2,2
Сукцинат калия, 4 мг/л						
Стенлей	1,7	2,3	2,5	1,9	1,4	2,0
Кабардинская ранняя	1,5	1,9	2,2	1,6	1,2	1,7
Блюфри	1,6	2,0	2,1	1,7	1,4	1,8
Анна Шпет	1,4	1,8	2,0	1,5	1,3	1,6
Чачакская поздняя	1,2	1,5	1,9	2,0	1,7	1,7
В среднем:	1,5	1,9	2,1	1,7	1,4	1,8
Сукцинат натрия, 4 мг/л						
Стенлей	1,9	2,3	2,2	1,8	1,9	2,0
Кабардинская ранняя	1,4	1,7	2,0	2,1	1,6	1,8
Блюфри	1,8	2,2	2,4	2,1	1,7	2,0
Анна Шпет	1,6	1,9	2,1	2,1	1,8	1,9
Чачакская поздняя	1,5	1,8	2,2	1,9	1,6	1,8
В среднем:	1,6	2,0	2,2	2,0	1,7	1,9

Лучше всего размножаются сорта Стенлей, Кабардинская ранняя и Блюфри. Коэффициенты размножения на среде с янтарной кислотой варьируют в пределах 1:2,9-1:3,5, на стандартной среде 1:4-1:4,5. У сортов Анна Шпет и Чачаская поздняя коэффициент размножения составлял на среде с янтарной кислотой 1:2,6 и 1:2,7, на стандартной среде 1:3,0 и 1:3,4 (табл. 24).

Изучив изменение коэффициентов размножения в динамике по пассажам, мы наблюдаем, что на средах с БАВ происходит постепенное увеличение коэффициента размножения до третьего пассажа, а затем – снижение. В контрольном варианте постепенное повышение коэффициента размножения идет с первого по пятый пассаж (рис. 11).

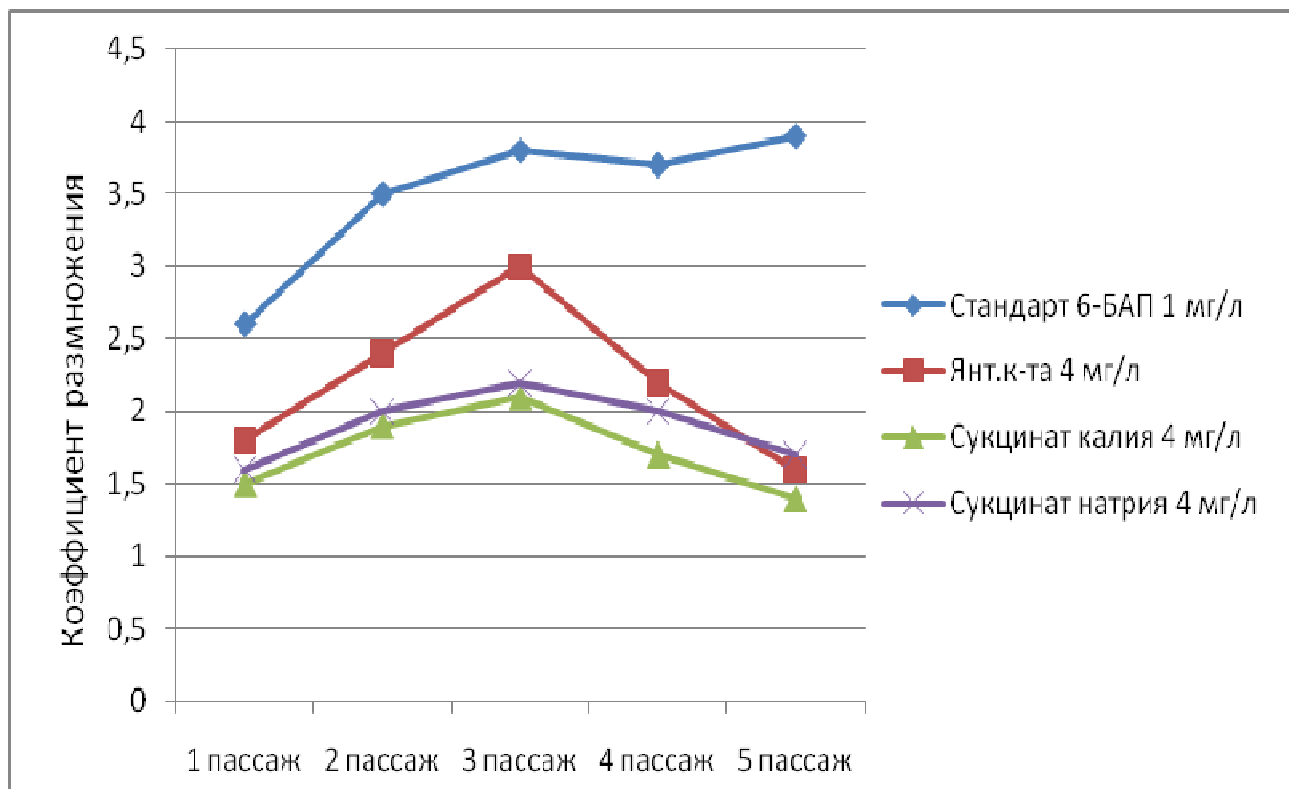


Рисунок 11 – Динамика изменения коэффициента размножения эксплантов сливы домашней на средах с БАВ на основе янтарной кислоты (в среднем)

Таким образом, накопление янтарной кислоты в растениях и перенасыщение ею снижают положительное влияние БАВ. У сукцинатов натрия и

калия это явление также отмечается, но в меньшей степени, вероятно, это связано с меньшей концентрацией янтарной кислоты в препаратах.

Тем не менее, БАВ на основе янтарной кислоты имеют стимулирующее влияние на процесс пролиферации и могут быть использованы при микроклональном размножении сливы домашней.

Следующий показатель, характеризующий эффективность БАВ, – это влияние на рост побегов. В связи с тем, что укореняемость побегов напрямую зависит от их размера, высота побега является еще одним важным критерием эффективности микроразмножения (табл. 25).

Таблица 25 – Влияние БАВ группы янтарной кислоты на рост микропобегов сливы домашней, 2013-2015 гг.

Вариант	Длина микропобегов, мм					
	Стен-лей	Кабардин-ская ранняя	Блюффри	Анна Шпет	Чачак-ская поздняя	Сред-нее
Стандарт, БАП 1 мг/л, ГК 0,5 мг/л	15,0	11,1	15,2	14,2	15,8	14,3
Янтарная кислота, 4 мг/л	15,4	11,8	14,8	13,8	16,1	14,4
Сукцинат калия, 4 мг/л	19,3	14,7	18	16,9	17,9	17,4
Сукцинат натрия, 4 мг/л	18,5	14,3	17,4	17,3	17,4	17,0
НСР ₀₅	2,34	2,13	2,0	2,16	1,6	-

Установлено, что наиболее влияние на длину микропобегов сливы домашней оказывают сукцинат калия и сукцинат натрия. Длина побегов в среднем по сортам составляет 17,4 мм и 17,0 мм, на среде с янтарной кислотой длина побегов – 14,4 мм, на уровне стандартного варианта – 14,3 мм. Выявлены некоторые сортовые особенности: у сортов Стенлей, Блюффри, Анна Шпет, Чачакская поздняя образуются более длинные побеги, чем у сорта Кабардинской ранней. На средах с сукцинатами натрия и калия длина побегов у сорта

Кабардинская ранняя составляет в среднем 14,3-14,7 мм, у сорта Анна Шпет 16,9-17,3 мм, у сорта Чачакская поздняя 17,4-17,9 мм, у сорта Блюфри 17,4-18,0 мм, у сорта Стенлей 18,5-19,3 мм.

Статистическая обработка результатов исследований подтвердила существенность влияния исследуемых веществ, а также генотипа экспланта и взаимодействия этих факторов (табл. 26).

Таблица 26 – Дисперсионный анализ оценки влияния БАВ группы янтарной кислоты на длину микропобегов сливы домашней, 2013-2015 гг.

Изменчивость	Степени свободы	Средний квадрат	Критерий Фишера	Дисперсия	Доля в общей дисперсии
Между годами	2	2,86	9,8*	0,04	0,6
Между сортами	4	92,62	317,5*	2,56	37,2
Между вариантами	3	159,86	548,1*	3,55	51,6
«Год × сорт»	8	0,65	2,2*	0,03	0,4
«Год × вариант»	6	0,13	0,5	0,00	0,0
«Сорт × вариант»	12	4,08	14,0*	0,42	6,1
«Год × сорт × вариант»	24	0,20	0,7	0,00	0,0
Остаточная	120	0,29	-	0,29	4,1

*-значения критерия Фишера, превосходящие стандартное для 5 %-ного уровня значимости.

Доля влияния исследуемых БАВ составляет 51,6 %, генотипа – 37,2 %, а их взаимодействия – 6,1 %. Влияние сукцината калия и натрия на рост микропобегов сливы в культуре *in vitro* является статистически достоверным.

В варианте с сукцинатом натрия 78 % микропобегов сливы имеют длину более 15 мм, в варианте с сукцинатом калия – 83 %, в варианте с янтарной кислотой количество побегов, достигших 15 мм, составило 66 %, по сравнению с контрольным вариантом БАП+ГК – 52 % (рис. 12).

Выявленная особенность влияния сукцинатов калия и натрия на рост микропобегов сливы домашней при микроразмножении позволяет использовать

данные вещества на этапе, предшествующему ризогенезу, для получения побегов длиной более 15-20 мм, укоренение которых проходит более эффективно.

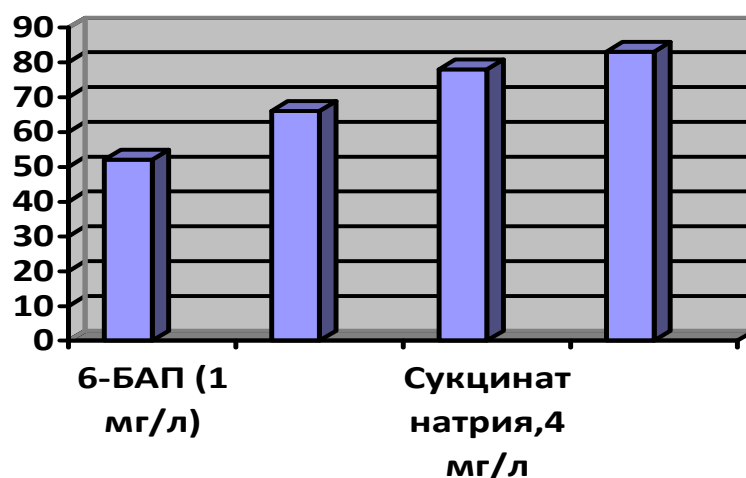


Рисунок 12 – Процент выхода стандартных микропобегов сливы домашней на этапе предшествующему укоренению (2013-2015 гг.)

Еще одним важным показателем эффективности использования БАВ в клональном микроразмножении можно назвать их влияние на облиственность растений. В нашем эксперименте мы учитывали количество образующихся листьев на одном растении (табл. 27).

Выявлено, что при внесении в среду янтарной кислоты в количестве 4 мг/л листьев на микропобег образуется больше. В среднем на одном растении насчитывается 9,2 листовых пластинок по сравнению со стандартом – 7 шт. На средах с сукцинатом калия и натрия, на микропобегах сливы формируются, соответственно, по 6,5 и 6 листьев.

Стимулирующее влияние янтарной кислоты на листообразование сливы в культуре *in vitro* является статистически достоверным для большинства сортов. Поэтому добавление в питательную среду янтарной кислоты благоприятно отражается на качестве микропобегов сливы.

Таблица 27 – Среднее количество листочков на микрорастение сливы домашней при культивировании их с применением БАВ группы янтарной кислоты, 2013-2015 гг. (шт.)

Вариант	Стен-лей	Кабардин-ская ранняя	Блю-фри	Анна Шпет	Чачакская поздняя	Среднее
Стандарт - БАП- 1мг/л, ГК - 0,5 мг/л	6,1	6,3	7,5	6,8	8	7,0
Янтарная кислота, 4 мг/л	10,2	8,7	8,9	9,2	9,1	9,2
Сукцинат калия, 4 мг/л	6,4	5,9	7,1	6,3	7	6,5
Сукцинат натрия, 4 мг/л	6,2	5,7	6,2	6	5,8	6,0
НСР ₀₅	2,24	1,87	1,69	1,92	1,89	-

К негативным явлениям микроклонального размножения относится хлороз микропобегов, следствие которого сказывается на количестве и качестве микрорастений (табл. 28).

В наших исследованиях в стандартном варианте хлоротическую окраску листьев имели 10 % микропобегов у сорта Блюфри, у сорта Чачакская поздняя 13 %, у Кабардинской ранней 20 %, у Анны Шпет 22 % и у сорта Стенлей 27 %.

На среде с янтарной кислотой количество хлоротичных побегов существенно ниже и составляет у сортов Стенлей, Анна Шпет и Чачакская поздняя – 5 %, у сортов Блюфри и Кабардинская ранняя 6 % и 7 % соответственно. На средах с сукцинатами калия уровень хлороза микропобегов сливы составляет: у сорта Кабардинская ранняя - 5%, у Блюфри - 9 %, у Стенлей, Анна Шпет и Чачакская поздняя по 10 %. На среде с сукцинатом натрия от 4 % у сорта Стенлей, 7 % у Анны Шпет, до 11 % у Чачакской поздней и 12 % у Кабардинской ранней и Блюфри.

На питательных средах с янтарной кислотой, сукцинатами калия и натрия витрификация тканей микропобегов отсутствует полностью, тогда, как в стандартном варианте (6-БАП – 1 мг/л, ГК – 0,5 мг/л) появлялись

витрифицированные побеги. Уровень витрификации микропобегов составил у сорта Стенлей 9 %, у сорта Анна Шпет 10 %, у Кабардинской ранней 12 % и у сортов Блюффри и Чачакская поздняя по 15 % (табл. 28).

Таблица 28 – Влияние БАВ группы янтарной кислоты на состояние микропобегов сливы домашней, 2013-2015 гг.

Вариант	Хлороз, %	Витрификация, %	Общее состояние растений 5 балльной шкале
Стенлей			
6-БАП - 1 мг/л +ГК – 0,5 мг/л (стандарт)	27	9	4,2
Янтарная кислота – 4 мг/л	5	0	4,4
Сукцинат калия – 4 мг/л	10	0	4,3
Сукцинат натрия – 4 мг/л	4	0	4,2
Кабардинская ранняя			
6-БАП - 1 мг/л +ГК – 0,5 мг/л (стандарт)	20	12	4,2
Янтарная кислота – 4 мг/л	7	0	4,7
Сукцинат калия – 4 мг/л	5	0	4,5
Сукцинат натрия – 4 мг/л	12	0	4,3
Блюффри			
6-БАП - 1 мг/л +ГК – 0,5 мг/л (стандарт)	10	15	4,3
Янтарная кислота – 4 мг/л	6	0	4,4
Сукцинат калия – 4 мг/л	9	0	4,2
Сукцинат натрия – 4 мг/л	12	0	4,3
Анна Шпет			
6-БАП - 1 мг/л +ГК – 0,5 мг/л (стандарт)	22	10	4,1
Янтарная кислота – 4 мг/л	5	0	4,5
Сукцинат калия – 4 мг/л	10	0	4,3
Сукцинат натрия – 4 мг/л	7	0	4,3
Чачакская поздняя			
6-БАП - 1 мг/л +ГК – 0,5 мг/л (стандарт)	13	15	4,0
Янтарная кислота – 4 мг/л	5	0	4,6
Сукцинат калия – 4 мг/л	10	0	4,2
Сукцинат натрия – 4 мг/л	11	0	4,0

При использовании БАВ группы янтарной кислоты уровень хлороза ниже, чем в стандартном варианте, они не вызывают дисбаланс гормонального состава среды, не приводят к появлению витрификации (гипергидроза) побегов.

Использование БАВ на основе янтарной кислоты оказывает положительное влияние на общее состояние микропобегов сливы домашней, растения имеют более насыщенную зеленую окраску, их общее состояние оценивается в пределах 3,9 - 4,7 баллов (табл. 28).

Таким образом, установлено, что исследуемые БАВ, оказывают положительное влияние на микроразмножение сливы домашней (рис. 13). Экзогенная янтарная кислота и ее соли включаются в метаболизм эндогенной янтарной кислоты и стимулируют в растениях процессы роста и развития растений.



а

б

в

г

Рисунок 13 – Микропобеги сливы домашней сорта Стенлей на средах с различными веществами: а) янтарная кислота; б-БАП+ГК (стандарт); в) сукцинат калия; г) сукцинат натрия.

3.5.6 Применение БАВ группы янтарной кислоты совместно со стандартными ростовыми веществами

В процессе микроразмножения сливы домашней сорта Стенлей изучено влияние БАВ группы янтарной кислоты при их одновременном внесении в питательную среду со стандартными ростовыми веществами (табл. 29).

Таблица 29 - Анализ микропобегов сливы домашней сорта Стенлей на среде со стандартными ростовыми веществами и БАВ группы янтарной кислоты, 2015-2017 гг.

Вариант	Коэффициент размножения, ед.	Длина микропобегов (высота) в мм	Число листьев, шт.	Хлороз, %	Витрификация, %	Общее состояние растений в баллах по 5 б. шкале
6-БАП 1 мг/л, ГК 0,5 мг/л (стандарт)	3,7	20,9	7,9	27	9	4,2
6-БАП 1 мг/л, ГК 0,5 мг/л + янтарная кислота 4 мг/л	2,8	22,1	10,4	9	0	4,6
6-БАП 1 мг/л, ГК 0,5 мг/л + сукцинат калия 4 мг/л	2,3	25,4	8,1	12	0	4,1
6-БАП 1 мг/л, ГК 0,5 мг/л + сукцинат натрия 4 мг/л	2,4	24,7	7,7	15	0	4,2
НСР ₀₅		2,32	1,79			

На стандартной среде с 6-БАП и ГК коэффициент размножения в среднем за один пассаж был 1:3,7. При добавлении к стандартным веществам БАВ группы янтарной кислоты коэффициент размножения был в варианте с янтарной кислотой – 1:2,8, с сукцинатом калия – 1:2,3, с сукцинатом натрия – 1:2,4. Данный результат может свидетельствовать о различной природе ростовой активности 6-БАП (1 мг/л), и изучаемых биологически активных веществ и некотором

антагонистическом влиянии препаратов на процессы мультипликации при совместном их использовании.

В ходе исследований установлено, что наибольшее количество листьев сформировалось в варианте с янтарной кислотой 10,4 шт., по сравнению со стандартом 6,1 шт. На средах с добавлением сукцината калия и сукцината натрия на микропобегах формируется по 8,3 и 7,7 листовых пластинок соответственно. Вместе с тем отмечена обратная зависимость: на средах с сукцинатом калия и натрия микропобеги сливы имеют более сильный рост и вырастают до 25,4 и 24,7 мм в длину, по сравнению со стандартом 20,9 мм и янтарной кислотой 22,1 мм (табл. 29).

Влияние янтарной кислоты на листообразование сливы в культуре *in vitro* является статистически достоверным ($НСР_{05} = 2,32$), как и влияние сукцинатов калия и натрия на рост микропобегов ($НСР_{05} = 1,79$).

Витрификация отмечена только в стандартном варианте (6-БАП - 1 мг/л + ГК - 0,5 мг/л) у 9 % микропобегов сливы. В вариантах с добавлением испытуемых препаратов: янтарная кислота, сукцинат калия, сукцинат натрия, стекловидные побеги не встречались.

По результатам проведенных исследований хлороз наблюдался у 27 % микропобегов в стандартном варианте, в вариантах с БАВ (янтарная кислота, сукцинат натрия и сукцинат калия) процент хлоротичных растений достигал 9; 12; 15 % соответственно.

Внесение в питательную среду янтарной кислоты оказало благоприятное воздействие на общее состояние микропобегов сливы. Так, общее состояние растений в данном варианте по 5 балльной шкале составило 4,6 балла по сравнению со стандартом – 4,2 балла. В вариантах с сукцинатами калия и натрия общий балл был на уровне стандарта и составлял 4,1 и 4,2 балла соответственно.

В результате исследований от ожидаемого эффекта аккумуляирования ростовой активности препаратов 6-БАП и солей янтарной кислоты, выражающегося в коэффициенте размножения, наблюдалось его снижение на 20-38 %. В ходе исследований установлено, что добавление к стандартным

веществам БАВ на основе янтарной кислоты способствует развитию листового аппарата и росту микропобегов, но снижает эффективность мультипликации.

Получив результаты изучения ростовых реакций эксплантов сливы сорта Стенлей на питательных средах, содержащих экспериментальные вещества, пришли к выводу, что БАВ группы янтарной кислоты оказывают положительное влияние на рост и развитие микрорастений сливы домашней, улучшают общее состояние микропобегов, в т.ч. снижают уровень витрификации и хлороза тканей микропобегов. Сукцинат натрия и сукцинат калия в концентрации 4 мг/л оказывают влияние на ростовые процессы микропобегов, поэтому могут быть использованы в пассаже предшествующему укоренению на этапе элонгации, а янтарная кислота (4 мг/л) оказывает больше влияние на образование листового аппарата.

3.5.7 Эффективность использования препаратов группы янтарной кислоты на этапе ризогенеза микропобегов сливы домашней *in vitro*

Для изучения укореняемости побегов сливы различных сортов отбирались растения, достигшие размера 20 мм и более.

На этапе ризогенеза микропобегов сливы домашней БАВ группы янтарной кислоты вводились в питательную среду $\frac{1}{2}$ Мурасиге-Скуга в концентрации 4 мг/л дополнительно к стандартно используемой ИМК – 0,5 мг/л.

Оценку эффективности исследуемых веществ проводили по следующим показателям: процент растений с корнями, количество корней, наличие каллуса, суммарная длина корней, количество листьев, длина побега.

Установлено, что введение в питательную среду БАВ группы янтарной кислоты в целом улучшает процессы корнеобразования. Укореняемость микрорастений сливы в вариантах опыта была на 5-13 % выше, чем в контроле в зависимости от сорта. Наибольший процент укорененных растений отмечен в варианте с ИМК и сукцинатом натрия у сортов Кабардинская ранняя (86 %), Стенлей (90 %), Блюфри (93 %) (табл. 30).

Таблица 30 – Влияние препаратов группы янтарной кислоты на рост и корнеобразование растений, 2013-2015 гг.

Вариант компонентов среды	Укоренение, %	Число корней, шт.	Длина корней, см	Количество листьев, шт	Высота растений, см
Стенлей					
ИМК 0,5 мг/л (стандарт)	82	2,9	6,5	6,7	3,9
Янтарная кислота 4 мг/л + ИМК 0,5 мг/л	85	2,4	6,2	10,4	4,1
Сукцинат калия 4 мг/л + ИМК 0,5 мг/л	80	2,7	6,0	9,0	4,5
Сукцинат натрия 4 мг/л + ИМК 0,5 мг/л	90	3,1	7,5	9,5	4,4
Кабардинская ранняя					
ИМК 0,5 мг/л (стандарт)	73	2,4	5,4	7,4	3,7
Янтарная кислота 4 мг/л + ИМК 0,5 мг/л	82	2,5	5,2	10,7	3,5
Сукцинат калия 4 мг/л + ИМК 0,5 мг/л	79	2,2	5,6	9,8	4,6
Сукцинат натрия 4 мг/л + ИМК 0,5 мг/л	86	2,6	6,8	10,3	4,4
Блюффри					
ИМК 0,5 мг/л (стандарт)	87	2,8	6,7	8,5	4,2
Янтарная кислота 4 мг/л + ИМК 0,5 мг/л	90	2,7	7,3	11,3	4,1
Сукцинат калия 4 мг/л + ИМК 0,5 мг/л	85	2,4	7,1	10,7	4,6
Сукцинат натрия 4 мг/л + ИМК 0,5 мг/л	93	3,3	8,2	9,9	4,3
Анна Шпет					
ИМК 0,5 мг/л (стандарт)	73	2,4	6,2	6,8	3,8
Янтарная кислота 4 мг/л + ИМК 0,5 мг/л	78	2,6	6,4	9,1	3,4
Сукцинат калия 4 мг/л + ИМК 0,5 мг/л	76	2,3	6,1	8,3	4,2
Сукцинат натрия 4 мг/л + ИМК 0,5 мг/л	81	2,8	6,7	7,9	3,9
Чачакская поздняя					
ИМК 0,5 мг/л (стандарт)	70	2,4	6,0	7,0	4,3
Янтарная кислота 4 мг/л + ИМК 0,5 мг/л	68	2	5,6	9,4	4,5
Сукцинат калия 4 мг/л + ИМК 0,5 мг/л	72	2,2	6,5	8,8	4,8
Сукцинат натрия 4 мг/л + ИМК 0,5 мг/л	78	2,6	6,9	9,0	4,6

У сортов Анна Шпет и Чачакская поздняя доля укорененных побегов ниже, чем у остальных сортов, от 70 до 81 %, а разница между вариантами составляет 5-8 %. У сортов Кабардинская ранняя, Чачакская поздняя, Анна Шпет увеличение количества укорененных растений отмечено и в вариантах с янтарной кислотой, и с сукцинатом калия на 5-9 % относительно контроля.

Сукцинат натрия, в общем, оказывает положительное влияние на растения в период ризогенеза. По показателям: количество образовавшихся корней, длина корней, высота микрорастений и количество листьев на них данный вариант превосходит контроль. Доля растений с 3 корешками возрастает, и средний показатель увеличивается на 8-18 %. У сорта Стенлей с 2,9 до 3,1 шт., Кабардинская ранняя и Чачакская поздняя с 2,4 до 2,6 шт. У сортов Анна Шпет и Блюффри на 17-18 %, с 2,4 до 2,8 шт. и с 2,8 до 3,3 шт. (табл. 30).

Соответственно возрастает суммарная длина корней на 8-26 % в зависимости от сорта. У сорта Анна Шпет длина корней больше, чем в контроле на 0,5 см, у Стенлей и Чачакская поздняя на 1,0 и 0,9 см, у Кабардинской ранней и Блюффри на 1,4 и 1,5 см.

Высота растений в зависимости от сорта выше на 0,4-0,7 см, количество листьев на 1,1-2,9 шт.

Также положительное влияние на рост растений отмечено в варианте с сукцинатом калия. Высота растений выше, чем в контроле в зависимости от сорта на 0,4-0,9 см, а число листьев больше на 1,5-2,4 шт. Максимальный прирост побегов отмечен у сортов Стенлей и Кабардинская ранняя до 4,5 и 4,6 см (контроль 3,9 и 3,7 см) (табл. 30).

Лучшим вариантом для увеличения биомассы растений является вариант с янтарной кислотой. В данном варианте на одно растение образуется листьев на 2,4-3,7 шт. (33-55 %) больше, чем в контрольном варианте. У сортов Анна Шпет и Чачакская поздняя в среднем на одном растении в варианте с янтарной кислотой насчитывается 9,1 и 9,4 листовые пластинки, а в контроле 6,8 и 7,0. У сорта Блюффри в контроле 8,5 листа, а в варианте с янтарной кислотой 11,3. Сорта Стенлей и Кабардинская ранняя оказались наиболее отзывчивы на внесение

янтарной кислоты, у микрорастений образовывалось по 10,4 и 10,7 листовые пластинки, относительно контроля 6,7 и 7,4 шт. (табл. 30).

Растения, полученные в варианте с добавлением препаратов группы янтарной кислоты, имели следующие качественные отличия от контроля: количество листьев, размер листовых пластинок более крупный, листья имели интенсивную зеленую окраску (рис. 14).



а



б



в



г

Рисунок 14 – Укоренённые микрорастения сливы сорта Стенлей:

а – ИМК + сукцинат натрия; б – ИМК + сукцинат калия;

в – ИМК + янтарная кислота; г – ИМК.

Выявленные зависимости носят закономерный характер, в т.ч. статистически обоснованный. Статистическая обработка результатов исследований подтвердила существенность влияния генотипа экспланта и

действия БАВ, а также взаимодействия «сорт × вариант» на исследуемые параметры (табл. 31).

Таблица 31 - Результаты дисперсионного анализа оценки влияния БАВ группы янтарной кислоты на рост и корнеобразование растений сливы домашней на этапе ризогенеза, 2013-2015 гг.

Изменчивость	Степени свободы	Средний квадрат	Критерий Фишера	Дисперсия	Доля в общей дисперсии, %
Количество корней					
Между годами	2	0,469	5,02*	0,0063	2,8
Между сортами	4	1,744	18,70*	0,0458	20,1
Между вариантами	3	2,725	29,21*	0,0584	25,6
«Год × сорт»	8	0,173	1,86	0,00	0,0
«Год × вариант»	6	0,089	0,96	0,00	0,0
«Сорт × вариант»	12	0,317	3,40*	0,0248	10,1
«Год × сорт × вариант»	24	0,052	0,55	0,00	0,0
Остаточная	120	0,093	-	0,093	41,4
Длина корней					
Между годами	2	0,940	3,98*	0,0117	1,3
Между сортами	4	11,686	49,40*	0,318	34,9
Между вариантами	3	12,593	53,24*	0,2745	30,1
«Год × сорт»	8	0,439	1,85	0,00	0,0
«Год × вариант»	6	0,375	1,58	0,00	0,0
«Сорт × вариант»	12	0,869	3,68*	0,0702	7,7
«Год × сорт × вариант»	24	0,318	1,34	0,00	0,0
Остаточная	120	0,237	-	0,237	26
Количество листьев					
Между годами	2	0,60	2,36	0,00	0,0
Между сортами	4	24,03	94,46*	0,66	22,2
Между вариантами	3	68,59	269,55*	1,5186	51,1
«Год × сорт»	8	3,23	12,68*	0,2483	8,3
«Год × вариант»	6	0,36	1,41	0,00	0,0
«Сорт × вариант»	12	1,37	5,38*	0,1244	4,2
«Год × сорт × вариант»	24	0,77	3,01*	0,1733	5,8
Остаточная	120	0,25	-	0,25	8,4
Высота побега					
Между годами	2	0,028	0,22	0,00	0,0
Между сортами	4	2,875	21,76*	0,0762	22,4
Между вариантами	3	5,247	39,72*	0,1137	33,4
«Год × сорт»	8	0,133	1,00	0,00	0,0
«Год × вариант»	6	0,176	1,33	0,00	0,0
«Сорт × вариант»	12	0,299	2,27*	0,0186	5,5
«Год × сорт × вариант»	24	0,127	0,96	0,00	0,0
Остаточная	120	0,132	-	0,132	38,7

Доля влияния исследуемых веществ на количество образующихся корней составила 25,6 %. Влияние генотипа сорта на этот же показатель равен 20,1 %. Доля их совместного влияния – 10,1 %.

На суммарную длину корней также оказывают влияние генотип сорта и исследуемые биологически активные вещества. Доля влияния генотипа – 34,9 %, БАВ – 30,1 %.

Статистически обосновано влияние исследуемых веществ на развитие листового аппарата растений, доля влияния этого фактора составляет – 51,1 %. Доля влияния генотипа – 22,2 %.

Влияние БАВ на рост растений, также статистически достоверно. Доля влияния достигает 33,4 %, доля влияния генотипа сорта – 22,4 %, доля их совместного влияния 5,5 % (табл. 31).

В заключении можно сделать вывод, что на этапе ризогенеза совместное использование ИМК (0,5 мг/л) и БАВ группы янтарной кислоты повышает процент укорененных растений на 5-13 %.

Введение сукцината натрия в концентрации 4 мг/л положительно сказывается на эффективности ризогенеза, укореняемость микропобегов выше на 6-13 %, количество образующихся корней относительно контроля на 8-18 %, их суммарная длина на 8-26 % в зависимости от сорта.

3.6. Экономическая эффективность усовершенствованного приёма клонального микроразмножения сливы домашней с использованием янтарной кислоты, сукцинатов калия и натрия

В системе производства сертифицированного посадочного материала плодовых культур получение базисных растений является наиболее трудоемким и материальнозатратным процессом (Методические указания, 2009).

Расчёт экономической эффективности производства посадочного материала с использованием метода клонального микроразмножения приводим на примере

сорта сливы Стенлей (табл. 32, 33). Производственные затраты рассчитывали с помощью методических указаний «Методическое и аналитическое обеспечение исследований по садоводству» (2010).

К материальным затратам отнесены: стоимость лабораторной посуды, инструментов, химических реактивов, амортизационные отчисления за использование оборудования, коммунальные расходы (электроэнергия, теплоэнергия, водоснабжение, канализация), общехозяйственные затраты, зарплата сотрудников. Количество сотрудников лаборатории – один человек, со среднемесячной заработной платой 20000 руб. Тариф за электроэнергию – 7,04 руб. за 1 кВт. Количество потребляемых кВт рассчитывали в зависимости от потребляемой мощности приборов (дистиллятор, стерилизатор, магнитная мешалка, весы, сушильный шкаф, ламинар-бокс, стелаж со светильниками). Стоимость услуг водоснабжения по тарифу ООО «Краснодарводоканал»: на холодную воду – 30,73 руб/ 1 м³, канализование – 22,11 руб. за 1 м³.

Расчёт экономической эффективности выращивания посадочного материала сливы домашней с использованием усовершенствованного метода клонального микроразмножения представлен в таблицах 32 и 33.

Таблица 32 – Сравнение показателей стандартной и предлагаемой технологии

Показатели	Традиционный Способ	Рекомендуемый приём
Затраты на стимуляторы роста	37,5 руб.	16,2 руб.
Срок введения в культуру <i>in vitro</i>	Приживаемость эксплантов в марте – 44,9 %	Приживаемость эксплантов в мае – 83,7 %
Введение в среду сукцината калия в пассаж, предшествующий укоренению	Выход растений, готовых к укоренению 32 %	Повышение выхода растений высотой до 2 см, готовых к укоренению до 83 %.
Добавление к 0,5 мг/л ИМК 4 мг/л сукцината натрия	82 % укорененных растений	90 % укорененных растений, повышение качественных показателей растений.

Для приготовления 1 л питательной среды в стандартной технологии (этап мультипликации микропобегов) необходим 1 мг БАП (3,4 руб.), 0,5 мг ГК (3,9 руб.) итого 7,5 руб. на ростовые вещества.

При введении эксплантов сливы домашней сорта Стенлей в культуру *in vitro* в мае, регенерация эксплантов на 38,8 % выше, чем в марте (стандарт). В усовершенствованной методике используется совместное применение биологически активных веществ группы янтарной кислоты в концентрации 4 мг/л со стандартной композицией регуляторов роста (6-БАП, ГК, ИМК). На этапе пролиферации в пассаже, предшествующему этапу ризогенеза, рекомендуется вводить в среду сукцинат калия для получения большего количества качественных растений, готовых к укоренению. На этапе ризогенеза к стандартно используемой ИМК (0,5 мг/л) следует добавлять сукцинат натрия (4 мг/л) для повышения укореняемости растений и их качества.

Таблица 33 – Экономическая эффективность производства микрорастений сливы домашней

Показатели	Традиционный способ	Рекомендуемый прием	Отклонение, +/-
Материальные затраты на производство, руб./шт, всего,	26,9	18,8	-8,1
в том числе: компоненты питательной среды, руб.	14,9	10,2	-4,7
стимуляторы роста, руб.	0,5	0,04	-0,46
электроэнергия, вода и др.	11,5	8,6	-2,9
Амортизация оборудования, руб.	23,0	16,3	-7,3
Прочие расходы	172,2	107,0	-65,2
Себестоимость производства, руб./шт	222,1	142,1	-80
Цена реализации, руб./шт	300	250	-50
Прибыль от реализации, руб./шт	77,9	107,9	+30
Рентабельность производства, %	35,1	75,9	+40,8

При оптимизации некоторых элементов клонального микроразмножения сливы домашней, за счёт использования БАВ группы янтарной кислоты, повышающих эффективность отдельных этапов клонального микроразмножения сливы домашней и снижающих затраты, в целом снижается себестоимость производства единицы оригинального посадочного материала на 80 руб. (36 %), которая составляет 142,1 руб/шт и повышается рентабельность производства на 40,8 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что в Краснодарском крае вирус шарки сливы представлен 3 штаммами: *PPV-D*, *PPV-M*, *PPV-W*, наибольшая частота встречаемости выявлена у штамма *PPV-D*.
2. Разработан метод картограмм для графического отображения особенностей распространения вируса шарки сливы в границах определенного участка. Были выделены основные очаги инфекции, распространение вируса в насаждении происходит, преимущественно, между деревьями вдоль ряда, ежегодно распространение вируса шарки в насаждении увеличивается на 3,3-5,3 %.
3. Установлено, что полевой устойчивостью к вирусу шарки сливы обладают отечественные сорта сливы Предгорная и Балкарская, толерантность к вирусу имеют сорта сливы Кабардинская ранняя, Стенлей, Ренклюд Альтана, Чернослив адыгейский, Мелитопольская, Кубанский карлик, Прикубанская, Чачакская поздняя.
4. Установлено, что для санации эксплантов сливы домашней при клональном микроразмножении раствор гипохлорита натрия (1:9) в экспозиции 8 минут позволяет получить 58-75 % жизнеспособных эксплантов, и при проведении работ по стерилизации эксплантов является более безопасным и экологичным.
5. Установлено, что наиболее благоприятным сроком интродукции эксплантов сливы исследуемых сортов домашней в культуру *in vitro* является период активного роста побегов – 1-2 декады мая, когда эффективность регенерации микропобегов наиболее высокая – 62-84 %.
6. Выявлено, что БАВ группы янтарной кислоты при клональном микроразмножении сливы проявляют цитокининовую активность. При использовании янтарной кислоты, сукцината калия и сукцината натрия в концентрации 4 мг/л коэффициент размножения (за 3 пассажа) составляет у янтарной кислоты 1:7,4, сукцината натрия 1:6,9 и сукцината калия 1:6,2. На среде с добавлением стандартно используемого цитокинина 6-БАП коэффициент размножения равен 1:9. Количество листьев, образующихся на средах с БАВ,

превышает контрольный вариант на 12-25 % и достигает 10,2–11,3 шт. на растение (в контроле 9,1 шт.). Длина микропобегов достигает 11,7-14,7 мм, что на 22-24 % ниже, чем в контрольном варианте (11,8 мм).

7. Установлено, что на средах с БАВ группы янтарной кислоты происходит постепенное увеличение коэффициента размножения до третьего пассажа, а затем он снижается. В контрольном варианте постепенное повышение коэффициента размножения идет с первого по пятый пассаж.

8. Выявлено, что при использовании янтарной кислоты, сукцината калия и сукцината натрия в качестве ростового вещества отдельно от стандартных ростовых веществ, коэффициент размножения выше, в среднем на 32 %, чем при совместном их применении.

9. Установлено, что на рост микропобегов сливы *in vitro* в большей степени влияют сукцинат калия и сукцинат натрия в концентрации 4 мг/л, способствующие увеличению длины микропобегов на 19-22 %.

10. Выявлено, что добавление в питательную среду янтарной кислоты в концентрации 4 мг/л способствует увеличению количества листьев на микропобегах сливы домашней на 32-37 % и составляет в среднем 9,2 шт.

11. Установлено, что сукцинат натрия в концентрации 4 мг/л оказывает положительное влияние на эффективность ризогенеза сливы, укореняемость побегов увеличивается на 6-13 %, повышается количество корней на 8-18 %, их суммарная длина увеличивается на 8-26 %.

12. Установлено, что при микроразмножении сливы домашней увеличению рентабельности производства мериклонов в среднем на 40,8 % способствует введение эксплантов в культуру *in vitro* в 1-2 декаде мая, использование в качестве стерилизатора раствора йодида ртути (0,1 %-й р-р), применение препаратов группы янтарной кислоты в концентрации 4 мг/л на этапах микроразмножения, сукцината натрия в концентрации 4 мг/л на этапе ризогенеза.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ

научно-исследовательским учреждениям и специализированным лабораториям, выпускающим безвирусный посадочный материал

При закладке новых промышленных насаждений сливы домашней использовать сорта с полевой устойчивостью Предгорная, Балкарская и толерантные к вирусу шарки сорта Кабардинская ранняя, Стенлей, Ренклюд Альтана, Чернослив адыгейский, Мелитопольская, Кубанский карлик, Прикубанская, Чачакская поздняя.

Применять метод картограмм для анализа распространения вируса шарки сливы (определения очагов, тенденций к расширению ареала, направления распространения вируса шарки сливы в насаждении), с целью принятия мер по ограничению распространения вируса.

При клональном микроразмножении сортов сливы Стенлей, Кабардинская ранняя, Блюфри, Анна Шпет и Чачакская поздняя рекомендуется:

- тестирование исходных растений методом ПЦР в условиях Краснодарского края проводить в мае-июне;
- изолирование эксплантов сортов сливы домашней в культуру *in vitro* проводить в период интенсивного роста побегов в 1 декаде мая;
- использовать в качестве стерилизующего агента 0,1 % раствор HgJ_2 (30 секунд), или как менее токсичный для человека раствор гипохлорита натрия (1:9, 8 минут);
- БАВ группы янтарной кислоты использовать на этапе мультипликации микропобегов сливы домашней в концентрации 4 мг/л, не более 3 пассажей;
- вводить сукцинаты калия или натрия в концентрации 4 мг/л на этапе, предшествующему укоренению;
- добавлять сукцинат натрия в концентрации 4 мг/л дополнительно к ИМК на этапе укоренения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агафонов, Н.В. Применение регуляторов роста для укоренения, размножения и повышения продуктивности плодовых и ягодных культур / Н.В. Агафонов, З.Н. Алинтаев, К.В. Дмитриева [и др.] // Применение регуляторов роста растений в с.-х. производстве: сб. науч. трудов ЦИНАО. – М., 1985. – С. 83-94.
2. Агроклиматические ресурсы Краснодарского края. – Л.: Гидрометеиздат, 1975. – 276 с.
3. Агromетeоролoгичeский бюллeтeнь. – Краснодар: Гидрометцентр, 2011.
4. Агromетeоролoгичeский бюллeтeнь. – Краснодар: Гидрометцентр, 2012.
5. Агromетeоролoгичeский бюллeтeнь. – Краснодар: Гидрометцентр, 2013.
6. Агromетeоролoгичeский бюллeтeнь. – Краснодар: Гидрометцентр, 2014.
7. Агроклиматический справочник по Краснодарскому краю. – Краснодар: Краснодарское книжное изд-во, 1961. – 466 с.
8. Алексеенко, Л.В. Особенности размножения нейтральнoднeвныx и рeмoнтaнтныx сортоv земляники *in vitro*: авторeф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.07/ Алексеенко Лилия Владимировна. – М., 1998. – 20 с.
9. Андреев, А.В. Эпидемиология вируса шарки сливы в Молдавии / А.В. Андреев, А.И. Полинковский, Т.Д. Вердеревская, Б.Н. Верещагин // Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых, ягодных культур и винограда в Молдавии. – Кишинев. Молдавский научно-исследовательский институт плодoводствa НПО «Колдру», 1983. – С. 3-13.
10. Атлас лучших сортов плодовых и ягодных культур Краснодарского края. Т.2. Косточковые культуры. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии, 2009. – 134 с.
11. Бартиш, И.В. Микроклональное размножение груши (*Pyrus communis* L.) *in vitro* / И.В. Бартиш, С.М. Меркулов, В.И. Корховой, В.П. Копань // Физиология и биохимия культурных растений. – 1994. – №1. – С. 84-90.

12. Беседина, Е.Н. Усовершенствование метода клонального микроразмножения подвоев яблони *in vitro*: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.08 / Беседина Екатерина Николаевна. – Краснодар, 2015. – 142 с.
13. Бивол, Т.Ф. Выявление сортов и форм плодовых культур, устойчивых и толерантных к основным хозяйственно важным вирусам и микоплазмам / Т.Ф. Бивол, Е.А. Кукурузак, Х. Кеглер, Ю. Шмидт // Вирусные, микоплазменные и бактериальные болезни плодовых культур и винограда в Молдавии. – Кишинев. Молдавский научно-исследовательский институт пловодства НПО «Колдру», 1980. – С. 132-142.
14. Благовещенский А.В. Теоретические основы действия янтарной кислоты на растения. – М.: Наука. – 1968. – 118 с.
15. Бленда, В.Ф. Фитогормональная оптимизация сред при регенерации черешни *in vitro* / В.Ф. Бленда, Ф.Л. Калинин, Е.Д. Кириленко // Культура клеток и биотехнология: Тез. науч. конф. – Кишинёв: Штиица, 1983. – С. 116.
16. Богданов, Р.Е. Биологические особенности и хозяйственная ценность сортов и форм сливы для производства и селекции: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Богданов Роман Евгеньевич. – Мичуринск, 2003. – 175 с.
17. Бунцевич, Л.Л. Заболевания плодовых культур вирусной и микоплазменной этиологии в Краснодарском крае / Л.Л. Бунцевич, Н.В. Попова // Состояние и проблемы садоводства России: сб. науч. трудов. – Новосибирск, 1997. – Ч. 2. – С. 124-127.
18. Бунцевич, Л.Л. Изучение восприимчивости различных сортов сливы к вирусу шарки / Л.Л. Бунцевич // Плодоводство и ягодоводство России. – 2004. – Т. XI. – С. 361-364.
19. Бунцевич, Л.Л. Вирусные и вирусоподобные болезни плодовых культур и оздоровление растений способом клонального микроразмножения *in vitro* / Л.Л. Бунцевич, М.В. Захарова, М.А. Костюк, Ю.П. Данилюк. // Проблемы интенсивного садоводства: сб. науч. тр. – Краснодар: СКЗНИИСиВ. – 2010. – С. 191-193.

20. Бунцевич, Л.Л. Метод картограмм в описании переноса визуально выявляемых вирусов / Л.Л. Бунцевич, М.А. Костюк, Ю.П. Данилюк // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – 2010. – № 6. – С. 94-103. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/archive/6/>.
21. Бунцевич, Л.Л. Морфофизиологические особенности формирования урожайности яблони домашней (*Malus domestica* Borkh.) / Л.Л. Бунцевич. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии, 2012. – 107 с.
22. 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.
23. Бунцевич, Л.Л. Мониторинг вируса шарки сливы с помощью метода картограмм / Л.Л. Бунцевич, М.А. Костюк, Е.Н. Беседина // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – 2014. – №29 (05). – Режим доступа: <http://journalkubansad.ru/pdf/14/05/09.pdf>.
24. Бунцевич, Л.Л. Оздоровление плодовых и ягодных культур от вирусных инфекций меристемным методом *in vitro* / Л.Л. Бунцевич, М.А. Костюк // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – 2016. – № 40 (04). – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/16/04/07.pdf>.
25. Бунцевич, Л.Л. Влияние вируса шарки сливы (PPV) на содержание пигментов, белка, лигнина, воды в тканях листьев сливы домашней / Л.Л. Бунцевич, А.Т. Киян, Н.И. Ненько, М.А. Винтер, В.В. Шестакова // Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс]. – 2017. – № 127. – С. 432-441. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2017/03/pdf/29.pdf>
26. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М., ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
27. Бызова, Н.А. Взаимодействие вируса шарки сливы с антителами, конъюгированными с коллоидным золотом, и разработка иммунохроматографической тест-системы для детекции вируса / Н.А. Бызова,

- И.В. Сафенкова, С.Н. Чирков [и др.] // Биохимия. – 2010. – Т. 75. – № 11. – С. 1583-1595.
28. Вальков, В.Ф. Почвоведение (Почвы Северного Кавказа): учебник для ВУЗов / В.Ф. Вальков, Ю.А., Штомпель, В.И. Тюльпанов. – Краснодар: Сов. Кубань, 2002. – 728 с.
29. Вартапетян, А.Б. Полимеразная цепная реакция // Молекулярная биология. – 1991. – Т. 25, вып. 4. – С. 926-933.
30. Вердеревская, Т.Д. Вирусные и фитоплазменные заболевания плодовых культур. – Кишинев: Штиинца, 1981. – 176 с.
31. Вердеревская, Т.Д. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда / Т.Д. Вердеревская, В.Г. Маринеску. – Кишинев: Штиинца, 1985. – 311 с.
32. Верзилин, А.В. Оздоровление и клональное микроразмножение слаборослых подвоев яблони: монография / А.В. Верзилин, В. А. Минаев, А.М. Тарасов. – Мичуринск: МГПИ, 2007. – 146 с.
33. Витковский, В.Л. Плодовые растения мира. – СПб.: Издательство «Лань», 2003. – 595 с.
34. Власов, Ю.И. Закономерности развития вирусных эпифитотий / Ю.И. Власов // Научные труды ВАСХНИЛ. – М.: Колос. – 1974. – с.160.
35. Власов, Ю.И. Сельскохозяйственная вирусология: учебники и учеб. пособия для высш. с.-х. учеб. заведений / Ю.И. Власов, Э.И. Ларина. – М.: Колос, 1982. – 239 с.
36. Вовк, В.В. Оптимизация селекционного процесса и ускоренное размножение межвидовых ремонтантных форм малины методом *in vitro*: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05/ Вовк Владимир Владимирович. – Брянск, 2000. – 20 с.
37. Воробьев, Б.Н. Родословная сливы / Б.Н. Воробьев // Флора. – 2001. – № 3. – С. 36-40.

38. Высоцкий, В.А. Морфогенез и клональное микроразмножение растений / В.А. Высоцкий // Культура клеток растений и биотехнология: сб. науч. тр. – М.: Наука. – 1986. – С. 91-102.
39. Высоцкий, В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.07 / Высоцкий Валерий Александрович. – М., 1998. – 44 с.
40. Высоцкий, В.А. Повышение эффективности культуры изолированных зародышей плодовых растений / В.А. Высоцкий // Материалы конф. «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». – М., 2000. – С. 148-149.
41. Гавриленко, В.Ф. Большой практикум по физиологии растений / В.Ф. Гавриленко, М.Е. Ладыгина, Л.М. Хандобина // М.: Высш. школа, 1975. – 380 с.
42. Гатина, Э.Ш. Болезни и вредители сливы в Молдавии. – Кишинев: «Штиинца», 1989. – С. 95-103.
43. Гранда, Х. Р.К. Микрклональное размножение хризантем / Х.Р.К. Гранда // Изв. ТСХА. – 2009. – № 1. – С. 145- 148.
44. Гущина, Е.Н. Использование янтарной кислоты в качестве стимулятора роста при выращивании саженцев облепихи / Е.Н. Гущина, Л.Д. Шаманская // Достижения науки и техники АПК. – 2009. – №. 7. – С. 12-14.
45. Деменко, В.И. Микрклональное размножение садовых растений: Учебное пособие для студентов по специальности 310300 - "Плодоовощеводство и виноградарство" / В.И. Деменко // - Москва: ФГОУ ВПО РГАУ – МСХА, 2007. – 55 с.
46. Деримедведь, Л.В. Бады на основе янтарной кислоты. Фармакологический анализ / Л.В. Деримедведь, В.А. Тимченко // Провизор [Электронный ресурс]. – НФАУ, 2002. – Вып. 13. – Режим доступа: http://www.provisor.com.ua/archive/2002/N13/art_39.php25
47. Диагностика вирусов семечковых и косточковых культур методами ИФА и ПЦР: метод. указания / М.Т. Упадышев, Н.Н. Мельникова, А.Д. Петрова, О.Ю.

- Суркова, К.В. Метлицкая, П.А. Походенко, И.И. Саунина. – М.: ВСТИСП, 2008. – 35 с.
48. Диагностика ряда карантинных фитопатогенов методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов при помощи диагностических наборов производства ООО «АгроДиагностика». Методические указания. ФГУ Всероссийский центр карантина растений. – М.: 2009. – 28 с.
49. Добржанская, Е.О. Диагностика вируса шарки сливы методом полимеразной цепной реакции / Е.О. Добржанская, Ю.Н. Приходько, С.Н. Чирков // Доклады РАСХН. – 2001. – №2. – С. 11-12.
50. Долгов, С.В. Биотех-слива устойчивая к вирусу шарки / С.В. Долгов, Т.А. Серова, А.П. Фирсов // Плодоводство и ягодоводство России. – 2011. – Т.26. – С. 335-341.
51. Дорожкин, Н.А. Проблемы иммунитета сельскохозяйственных растений к болезням / Н.А. Дорожкин, С.И. Бельская, Е.А. Волуевич [и др.]. – Мн.: Наука и техника. – 1998. – 248 с.
52. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
53. Дубровская, О.Ю. Биохимический состав плодов сортов и форм сливы и выделение лучших генотипов для селекционного использования и переработки: дис. ... канд. с.-х. наук / О.Ю. Дубровская. – Мичуринск-наукоград, 2015. – 130 с.
54. Ерёмин, Г.В. Слива / Г.В. Еремин, В.Л. Витковский. - М.: Колос. – 1980. – 255 с.
55. Ерёмин, Г.В. Слива: уход, размножение, сорта, борьба с вредителями и болезнями. – Ростов н/Д: Феникс, 2000. – 160 с.
56. Ерёмин, Г.В. Слива и алыча. – ФОЛИО-АСТ. – 2003. – 302 с.
57. Журавель, А.М. Слива / А.М. Журавель, М.П. Рапча, А.С. Короид, С.В. Грицкан, М.К. Магер. – Кишинэу: А. Ş.М. – 2007. – 236 с.
58. Заремук, Р.Ш. Формирование сортимента для создания высокопродуктивных насаждений сливы на юге России / Р.Ш. Заремук. – Краснодар. – 2006. – 256 с.

59. Заремук, Р.Ш. Формирование современного сортимента для создания высокопродуктивных насаждений сливы на юге России: дис. ... канд. с.-х.: 06.01.07 / Заремук Римма Шамсудиновна. – Краснодар, 2007. – 375 с.
60. Заремук, Р.Ш. Перспективные сорта и гибриды сливы домашней для Юга России / Р.Ш. Заремук, С.В. Богатырева // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – 2010. – № 2 (1) . – С.88-94. Режим доступа: <http://journalkubansad.ru/pdf/10/01/10.pdf> (дата обращения: 15.06.2014 г.)
61. Зонтиков, Д.Н Оценка способа стерилизации и минерального состава питательных сред на эффективность культивирования *Populus tremula L.* в условиях *in vitro* / Д.Н Зонтиков, С.А. Зонтикова, Р.В Сергеев [и др.] // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета [Электронный ресурс]. – 2013. – № 91 (07). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2013/07/pdf/91.pdf>
62. Иванова-Ханина, Л.В. Оптимизация условий введения в малины и ежевики в культуру *in vitro* / Л.В. Иванова-Ханина // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета [Электронный ресурс]. – 2014. – № 101 (07). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2014/01/pdf/65.pdf>
63. Инструкция № 01/11 по применению средства дезинфицирующего с моющим эффектом «Абактерил» производства фирмы ООО «Рудез», Россия для целей дезинфекции, предстерилизационной очистки, в ЛПО, дезинфекции на предприятиях коммунально-бытового обслуживания, в учреждениях образования, культуры, отдыха, спорта, детских пенитенциарных и социального обеспечения / А.Г. Афиногенова, Г.Е. Афиногенов, Т.Я. Богданова (РНИИТО); О.В. Фукалова (ООО «Рудез»). – ИЛЦ ФГУ «РНИИТО им. Р. Р. Вредена» Минздравсоцразвития России, 2011. – 52 с.
64. Инструкция по выявлению, локализации и ликвидации очагов «оспы» слив. – М.: Колос, 1968 г. – С. 3-4.
65. Исаева, И.С. Органогенез плодовых растений / И.С. Исаева. – М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 1977. – 33 с.

66. Калашян, Ю.А. Изучение вируса шарки в пораженных клетках растений - хозяев методом электронной микроскопии / Вирусные болезни плодово-ягодных культур и винограда в Молдавии. – Выпуск II. – Кишинев: «Картя Молдовеняскэ», 1973. – С. 17-21.
67. Калинин, Ф.Л. Технология микроклонального размножения растений / Ф.Л. Калинин, Г.П. Кушнир, В.В. Сарнацкая. – Киев: Наукова Думка, 1992. – 213 с.
68. Кальченко, Е.Ю. Подбор сортов и подвоев для размножения сливы на юге Центрального Черноземья: дис. ... канд. с.-х. наук / Е.Ю. Кальченко. – Воронеж, 2014. – 179 с.
69. Кеглер, Х. К вопросу об устойчивости сливы к вирусу шарки (Plum rox Virus) / Х. Кеглер, Е. Бауэр, Т.Д. Вердеревская, М. Грюнтзич // Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых, ягодных культур и винограда в Молдавии. – Кишинев: Молдавский научно-исследовательский институт плодоводства НПО «Колдру», 1983. – С. 142-146.
70. Келдыш, М.А. Вирусы, виroidы и микоплазмы растений: учебное пособие / М.А. Келдыш, Ю.И. Помазков. – М.: Изд-во РУДН, 2003. – 157 с.
71. Коваленко, Н.Н. Совершенствование этапов клонального микроразмножения сливы домашней / Н.Н. Коваленко, Н.И. Медведева // Современное садоводство [Электронный ресурс]. – 2015. – № 2. – С. 99-104. – Режим доступа: <http://journal.vniispk.ru> (Дата обращения: 26.01.2016 г.).
72. Клональное микроразмножение растений: Учеб.-метод. пособие / О.А. Тимофеева, Ю.Ю. Невмержицкая. – Казань: Казанский университет, 2012. – 56 с.
73. Корзина, Н.В. Регуляторы роста и их влияние на ризогенез микропобегов черешни (*Prunus avium* L.) *in vitro* / Н.В. Корзина // Бюллетень никитского ботанического сада. – 2009. – Вып. 98. – С. 13-16.
74. Корнацкий С.А. Микроразмножение сортов сливы / С.А. Корнацкий // Проблемы интенсификации современного садоводства. – Мичуринск, 1990. – С. 164-165.

75. Корнацкий, С.А. Особенности клонального микроразмножения сливы в системе производства оздоровленного посадочного материала: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.07 / Корнацкий Сергей Аркадьевич. – М., 1991. – 24 с.
76. Корнацкий, С. А. Проблемы клонального микроразмножения косточковых культур / С. А. Корнацкий, В. А.Высоцкий, В. Г. Трушечкин // Достижения в плодоводстве в Нечерноземной зоне РСФСР: Сб. науч. трудов. – М., 1991. – С. 104-116.
77. Красинская, Т.А. Микроразмножение различных форм *Cerasus Mill in vitro* / Т.А. Красинская, Н.В. Кухарчик // Плодоводство / ИП НАН Беларуси. – Самохваловичи, 2004. – Т. 16. – С. 26-31.
78. Кузьмина Н. Микроклональное размножение и оздоровление растений [Электронный ресурс] / Н. Кузьмина // Биотехнология (электронный учебник). – 2010. – Режим доступа: http://www.biotechnolog.ru/pcell/pcell6_1.htm (Дата обращения: 23.03.2012 г.).
79. Кулешова, Ю.Г. Вирус шарки сливы на территории Российской Федерации / Ю.Г. Кулешова, Е.Т. Рынза // Защита и карантин растений. – 2010. – №10. – С. 35-36.
80. Куликов, И.М. Пути оздоровления садовых культур от вирусов / И.М. Куликов, М.Т. Упадышев // Защита и карантин растений. – 2015. – №1. – С. 10-12.
81. Кухарчик, Н.В. Культура *in vitro* в размножении и оздоровлении плодовых и ягодных растений / Н.В. Кухарчик, С.Э. Семенас, Е.В. Колбанова // Актуальные проблемы освещения достижений науки в промышленном плодоводстве: материалы междунар. науч. произв. конф. (Самохваловичи, 21-22 августа 2002 г.). – Минск, 2002. – С. 107-113.
82. Лакин, Г.Ф. Биометрия. – М., 1990. – 352 с.
83. Ланская, Л. Е. Роль экспланта сливы при введении в культуру *in vitro* / Л. Е. Ланская // Мичуринск: материалы 8 Международной научно-методической конференции «Интродукция нетрадиционных и редких растений». – 2008. – С. 211-213.

84. Ланская, Л.Е. Культивирование сливы *in vitro* в целях создания маточных насаждений / Л.Е. Ланская // Материалы конф. Актуальные проблемы садоводства России и пути их решения. – 2007. – Режим доступа: http://vniispk.ru/news/konferenciya_2007/article.php?id=61. (Дата обращения: 20.10.2010 г.).
85. Лапинская, М.П. Клональное микроразмножение промышленных сортов гладиолуса: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.07/ Лапинская Мария Петровна. – М., 1998. – 19 с.
86. Лахматова, И.Т. Устойчивость сливы к вирусу шарки: дис. ... доктора с.-х. наук / И.Т. Лахматова. – Кишинев, 1995. – с.
87. Леонтьев-Орлов, О.А. Разработка клонального микроразмножения яблони: автореф. дис....канд. с.-х. наук.: 06.01.07 / Олег Анатольевич Леонтьев-Орлов. – М., – 1986. – 24 с.
88. Леонтьев-Орлов, О.А. Особенности культивирования изолированных апексов яблони *in vitro* / О.А. Леонтьев-Орлов, В.Г. Трушечкин, В.А. Высоцкий // Плодоводство в Нечерноземной полосе: сб. науч. тр. – М., 1988. – С. 21-30.
89. Ломовская, Л.В. Методы оздоровления и размножения перспективных форм груши *in vitro* / Л.В. Ломовская // Селекция и сортовая агротехника плодовых культур: сб. науч. тр. – Орёл, 2004. – С. 107-113.
90. Луговской, А.П. Технология комбинационной и клоновой селекции сортов плодовых культур // А.П. Луговской, С.Н. Артюх, Е.М. Алехина [и др.]. В кн.: Интенсивные технологии возделывания плодовых культур. – Краснодар, 2004. – С. 127-203.
91. Магомедов, У.Ш. Экономический ущерб от карантинных вредных организмов в России / У.Ш. Магомедов, Е.С. Мазурин, М.К. Миронова // Карантин растений. Наука и практика. – 2013. – № 2(4). – С.8-12.
92. Майорова, Ю.А. Оптимизация этапов клонального микроразмножения гибридов вишни на основе применения новых биологически активных веществ: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.01.07 / Майорова Юлия Алексеевна. – Краснодар, 2009. – 25 с.

93. Малиновский, В.И. Механизмы устойчивости растений к вирусам. – Владивосток: Дальнаука, 2010. – 324 с.
94. Матушкина, О.В. Особенности клонального микроразмножения ягодных культур / О.В. Матушкина, И.Н. Пронина // Пути интенсификации садоводства и селекция плодовых и ягодных культур. – Тула: Приокское книжное издательство, 1989. – С. 167-170.
95. Матушкина, О.В. Оптимизация процессов регенерации при размножении клоновых подвоев и сортов яблони и груши *in vitro*: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.07 / Матушкина Ольга Васильевна. – Мичуринск, 2008. – 155 с.
96. Матушкина, О.В. Размножение плодовых культур *in vitro*: проблемы и перспективы / О.В. Матушкина, И.Н. Пронина // Агро XXI. – 2011. – №7-9. – С. 15-16.
97. Матушкина, О.В. Витрификация побегов *in vitro*: анатомическое строение и возможные пути решения проблемы / О.В. Матушкина, И.Н. Пронина, Е.Н. Ткачёв // Достижения науки и техники АПК. – 2012. – №9. – С. 58-60.
98. Мацнева, О.В. Оптимизация сроков введения земляники в культуру *in vitro* О.В. Мацнева, Л.В. Ташматова // Современное садоводство [Электронный ресурс]. – 2018. – №2. – С. 78-83. – Режим доступа: <http://journal.vniispk.ru/pdf/2018/2/38.pdf> (Дата обращения: 26.07.2018 г.).
99. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / под ред. Е.Н. Джигадло. – Орёл: ГНУ ВНИИСПК, 2005. – 50 с.
100. Методические рекомендации по определению эффективности сельскохозяйственного производства / Под ред. Академика РАСХН В.Р. Боева. – Всероссийский научно-исследовательский институт экономики сельского хозяйства (ВНИЭСХ). – Москва, 1996. – 67с.
101. Методические указания по химико-технологическому сортоиспытанию овощных, плодовых и ягодных культур для консервной промышленности. – Москва, 1993.

102. Милехин, А. В. Технология микрклонального размножения хризантемы в условиях *in vitro* / А. В. Милехин, С. Л. Рубцов // Молодой ученый. – 2015. – №24. – С. 335-338.
103. Митрофанова, О.В. Биотехнологические системы диагностики вируса шарки сливы (PLUM POX VIRUS) и отбора толерантных сортов косточковых культур / О.В. Митрофанова, И.В. Митрофанова, С.Н. Чирков, В.Н. Ежов, Н.П. Лесникова-Седошенко // Труды Никитского ботанического сада. – 2009. – Том 131.
104. Митрофанова, О.В. Применение биотехнологических методов в оздоровлении растений и размножении безвирусного посадочного материала перспективных цветочно-декоративных культур / О. В. Митрофанова, И.В. Митрофанова, Н.П. Лесникова-Седошенко, Н.Н. Иванова // Сборник научных трудов ГНБС. – 2014. – Том 138. – С. 5-56.
105. Муратова С.А. Индукция морфогенеза в культуре соматических тканей сливы домашней: *Prunus domestica* L.: дис... канд. биол. Наук. – Мичуринск, 2002 – 186 с.
106. Муратова, С.А. Культивирование *in vitro* и регенерация из соматических тканей сливы домашней / С.А. Муратова // Материалы конференции: "Современные достижения биотехнологии в виноградарстве и других отраслях сельского хозяйства", не относящиеся к виноградарству, Новочеркасск, 29-30 июня 2005 г. / ГНУ ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко.
107. Муратова, С.А. Особенности введения в культуру *in vitro* плодовых и ягодных растений / С.А. Муратова, М.Б. Янковская, Д.Г. Шорников [и др.] // Плодоводство: Научные труды, Самохваловичи, 2005. – Т. 17. – Ч. 2. – С. 182-184.
108. Муратова, С.А. Совершенствование метода клонального микроразмножения актинидии и лимонника китайского / С.А. Муратова, Д.Г. Шорников, М.Б. Янковская, Р.В. Папихин // Современное садоводство. – 2010. – №1 (1). – С. 96-100.
109. Набиева, А.Ю. Биотехнологические приемы клонального микроразмножения перспективных сортов *Syringa vulgaris* L. для Западной

Сибири / А.Ю. Набиева // Вестник ИрГСХА. – Иркутск, 2011. – Вып. 44, ч. V. – С. 69-76.

110. Ненько, Н.И. Применение регуляторов роста в питомниководстве косточковых и семечковых культур / Н.И. Ненько, А.П. Кузнецова, А.А. Воронов, А.Н. Стародубцев, Л.А. Бадовская, В.П. Посконин // Садоводство и виноградарство. – 2009. – №4. – С. 6–9.

111. Основные методы фитопатологических исследований. Научные труды ВАСХНИЛ. Под общ. ред. с.-х. н. Чумакова А.Е. – М.: Колос, 1974. – 192 с.

112. Патент № 96116869 Российская Федерация МПК6 A01H4/00. Питательная среда для микроклонального размножения подвоев яблони / Фартзинова И.М.; заявитель и патентообладатель Горск. гос. аграр. ун-т. – № 96116869/13; заявл. 09.08.96; опубл. 27.05.98. – 4 с.

113. Патент №2141524 Российская Федерация МПК C12N5/04, A01H4/00. Питательная среда для микроклонального размножения груши / Фартзинова И.М.; заявитель и патентообладатель Горск. гос. аграр. ун-т. – № 96116867/13; заявл. 09.08.1996; опубл. 20.11.1999, Бюл. № 32. – 5 с.

114. Патент № 2096946. Российская Федерация МПК A01G1/00. Средство для одновременного повышения качества и продуктивности сельскохозяйственных культур и сокращения периода их созревания / Л.А. Бадовская, Н.И. Ненько, В.М. Латашко, В.Г. Кульневич [и др.]; заявитель и патентообладатель Кубанский государственный технологический университет; заявл. 23.02.1995; опубл. 27.11.1997. – 15 с.

115. Петрова, А.Д. Оздоровление и размножение садовых культур *in vitro* / А.Д. Петрова, М.Т. Упадышев // Садоводство и виноградарство. – 2000. – №4. – С. 12-13.

116. Помазков, Ю.И. Изучение вирусных заболеваний плодовых и ягодных растений в СССР / Сборник научных работ, том V: Выращивание безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур. – М., НИЗИСНП, 1972. – С. 5-13.

117. Попкова, К.М. Учение об иммунитете растений. – М., 1979. – 272 с.

118. Попов, Ю.Г. Культура *in vitro* меристематических верхушек стебля, как метод оздоровления и размножения растений / Ю.Г. Попов // Биологические науки. – 1975. – №6. – С. 13-24.
119. Пospelов, С.М. Оспа слив (шарка) / С.М. Долженко, З.И. Шестиперова // Основы карантина сельскохозяйственных растений. – Л.: Колос, 1978. – С. 106-108.
120. Походенко, П.А. Вирусные болезни на сливе и их диагностика методами ИФА и ПЦР / П.А. Походенко, М.Т. Упадышев // Садоводство и виноградарство. – 2008 а. – №5. – С. 22-24.
121. Походенко, П.А. Диагностика вируса шарки сливы на косточковых культурах / П.А. Походенко, М.Т. Упадышев. Защита и карантин растений. – 2008 б. – №7. – С. 25-26.
122. Приходько, Ю.Н. Распространенность вирусных болезней косточковых культур в Европейской части России / Ю.Н. Приходько, С.Н. Чирков, К.В. Метлицкая, Л.В. Цубера // Сельскохозяйственная биология. – 2008. – №1. – С. 26-32.
123. Приходько, Ю.Н. Изучение штаммов вируса шарки сливы / Ю.Н. Приходько, Е.С. Мазурин, Т.С. Живаева, Ю.А. Шнейдер, Е.Е. Соколова // Защита и карантин растений. – 2011. – №11. – С.29-32.
124. Приходько, Ю.Н. Выявление в Российской Федерации нового штамма вируса шарки слив – Cherry Russian (PPV-CR) / Ю.Н. Приходько, Т.С. Живаева, Ю.А. Шнейдер [и др.] // Карантин растений. – 2013. – № 2 (4). – С. 18-26.
125. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. - Орел: Изд-во Всероссийского НИИ селекции плодовых культур, 1999. – 608 с.
126. Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур. – Мичуринск, 1973. – 495 с.
127. Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур. – Мичуринск, 1980. – 532 с.

128. Пугачёв, Р.М. Особенности размножения растений рода *Prunus* L. в культуре *in vitro*: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Роман Михайлович Пугачёв. – Горки, 2003. – 18 с.
129. ПЦР / Классическая и молекулярная биология [Электронный ресурс]. – 2002. – Режим доступа: <http://molbiol.ru> (Дата обращения: 23.03.2011 г.).
130. Райков, И.А. Совершенствование клонального микроразмножения межвидовых форм смородины чёрной и малины ремонтантного типа: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Райков Игорь Александрович. – Брянск, 2012. – 19 с.
131. Ратушняк, Л.К. Распространение и диагностика вируса шарки сливы на юге Украины: автореф. дис... канд. биол. наук: 06.01.11 / Л.К. Ратушняк; Нац. аграр. ун-т. – К., 2004. – 19 с. – укр.
132. Реунов, А.В. Вирусный патогенез и защитные механизмы растений. – Владивосток: Дальнаука, 1999. – 175 с.
133. Роговая, В.В. Особенности микроклонального размножения косточковых культур в условиях *in vitro*/ В.В. Роговая, М.А. Гвоздев // Известия Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена. – 2005. – Выпуск № 13. – Т. 5. – С. 239-302.
134. Рункова, Л.В. Действие цитокининов на декоративные растения / Л.В. Рункова // Стимуляторы и ингибиторы ростовых процессов. – М.: Наука, 1988. – С. 110-123.
135. Рязанцев, Д. Диагностика карантинных фитопатогенов методом ПЦР в формате FLASH / Д.Ю.Рязанцев, Д.Д. Абрамов, С.К. Завриев // Сельскохозяйственная биология. – 2009. – № 3. – С. 114-117.
136. Савельев, Н.И. Биохимический состав плодов и ягод и их пригодность для переработки / Н.И. Савельев, В.Г. Леонченко, В.Н. Макаров, Е.В. Жбанова, Т.А. Черенкова. – Мичуринск: Изд-во ГНУ ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина Россельхозакадемии, 2004. – 124 с.

137. Самарина, Л.С. Разработка приёмов культивирования цитрусовых *in vitro* / Л.С. Самарина, Т.М. Коломиец, Н.С. Налбантова // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2012. – №1 (46). – С.175-179.
138. Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве / Е.А. Егоров, Г.В. Еремин, Е.В. Ульяновская и [др.]. – Краснодар, 2012. – 569 с.
139. Соколов, Р.Н. Введение в культуру *in vitro* некоторых редких и исчезающих видов флоры Западного Кавказа / Р.Н. Соколов, Т.М. Коломиец, В.И. Малярская // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета [Электронный ресурс]. – 2013. – № 94 (10). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/13.pdf>
140. Соловых, Н.В. Индукция морфогенеза из соматических тканей растений рода *Rubus* / Соловых Н.В., Муратова С.А. – Вестн. МичГАУ, 2010. – №2. – С. 104-110.
141. Сукцинаты натрия, калия и кальция / Товароведение и экспертиза товаров [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.znaytovar.ru/new3140.html>. (Дата обращения: 4.04.2017).
142. Тараковская, Е.Р. Физиология растений. – 2013. – Т. 60. – № 2. – С. 166-174.
143. Технологии микроразмножения *in vitro*: Учеб.-метод. пособие / С.Н. Тимофеева, Ю.В. Смолькина, Н.В. Апанасова, О.И. Юдакова. – Саратов: Саратовский государственный университет, 2016. – 38 с.
144. Тихонова, К.О. Распространенность, вредоносность вирусных болезней и эффективные методы оздоровления малины: дисс...канд. биол. наук: 06.01.07 / К.О. Тихонова. – М., 2016. – 128 с.
145. Туровская, Н.И. Особенности регенерации апикальной меристемы клоновых подвоев яблони / Н.И. Туровская // Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и цветоводстве: сб.науч.тр. ВНИИС им. И.В. Мичурина. – Мичуринск, 1989. – С. 13-17.

146. Туровская, Н.И. Микроразмножение яблони и груши / Н.И. Туровская // Садоводство и виноградарство. – 1994. – № 1. – С. 10-12.
147. Тутберидзе, Ц.В. Особенности микроразмножения сливы *in vitro* / Ц.В. Тутберидзе, В.Н. Михайлюк // Материалы междунар. науч.– практ. конф. «Садоводство и виноградарство 21 века»; Краснодар, 7-10 сентября 1999 г. / ВНИИСиВ – Краснодар, 1999 – Ч.3. – С. 103-104.
148. Упадышев, М.Т. Новый способ оздоровления плодовых и ягодных культур от вирусов методом магнитотерапии / М.Т. Упадышев, В.И. Донецких // Доклады РАСХН. – 2008. - №4. – С. 12-15.
149. Упадышев, М.Т. Хемотерапия вирусов плодовых и ягодных культур *in vitro* / М.Т. Упадышев, Ю.Н. Приходько, А.Д. Петрова, Л.В. Цубера, Н.Н. Мельникова, О.Ю. Суркова. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2009. – 72 с.
150. Упадышев М.Т. Современная классификация вирусов плодовых, ягодных культур и винограда // Садоводство и виноградарство. – 2010. – №2. – С. 40-44.
151. Упадышев, М.Т. Вирусные болезни и современные методы оздоровления плодовых и ягодных культур: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.07 / Упадышев Михаил Тарьевич. – М., 2011. – 46 с.
152. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений / под ред. Н.Н. Третьякова. М.: Колос, 2005. – 639 с. ISBN 5-10-002915-3
153. Фукс, Э. Методы обнаружения и диагностики фитопатогенных вирусов и микоплазмоподобных организмов / Э. Фукс, Х. Кеглер // Методы определения болезней и вредителей. – М.: Агропромиздат, 1987. – С. 26.
154. Челяев, Д.Н. Регенерационный потенциал элитных форм малины в культуре *in vitro*: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Челяев Дмитрий Николаевич. – Брянск, 2012. – 22 с.
155. Чирков, С.Н. Иммунохимическая и молекулярная диагностика вирусных инфекций растений / автореф. док. биол. наук: 03.00.06, 03.00.23 / Чирков Сергей Николаевич. – М., 2009. – 52 с.
156. Чирков, С.Н. Испытания отечественных иммунохроматографических тест-полосок для экспресс-диагностики вируса шарки сливы / С.Н.Чирков, Н.А.

- Бызова, А.А. Шевелева, И.В. Митрофанова, Ю.Н. Приходько, Б.Б. Дзантиев, И.Г. Атабеков // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – №1. – С. 110-116.
157. Чирков, С.Н. Генетическое разнообразие и структура популяции вируса оспы (шарки) сливы в России / С.Н. Чирков, Ю.Н. Приходько // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50. – № 5. – С. 529-539.
158. Шахов, В.В. Сравнительная характеристика сроков введения эксплантов черной смородины (*Ribes nigrum* L.) в культуру *in vitro* / В.В. Шахов, Л.В. Ташматова, О.В. Мацнева // Современное садоводство - Contemporary horticulture [Электронный ресурс]. – 2017. – №4. – С. 102-105. – Режим доступа: <http://journal.vniispk.ru/pdf/2017/4/39.pdf> (Дата обращения: 14.01.2018).
159. Шипунова, А. А. Клональное микроразмножение плодовых растений: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / А.А.Шипунова. – М., 2003. – 24 с.
160. Шорников, Д.Г. Совершенствование технологии размножения редких садовых растений в культуре *in vitro* и оценка их потенциала устойчивости к абиотическим стрессорам: диссертация канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Шорников Денис Геннадьевич. – Мичуринск. – 2008. – 192 с.
161. Щеглов, С.Н. Биометрический анализ селекционно-генетических исследований // Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2012. – С. 65-84.
162. Щербаков, Н.А. Слива/ Н.А. Щербаков, В.Е. Дерибизов. – г. Краснодар: фирма «Алев», 2012 г. – 28 с.
163. Яндекс / Словари [Электронный ресурс]. – БСЭ, 1969-1978. – Режим доступа: <http://slovari.yandex.ru/.html>. Янтарная кислота. <http://alcala.ru/bse/izbrannoe/slovar-IA/JA10422.shtml>
164. 6-Benzylaminopurine / Sigma-Aldrich [Электронный ресурс]. – 2017. – Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=6-Benzylaminopurine&interface=Product%20Name&N=0+&mode=mode%20matchpartialmax&lang=en®ion=RU&focus=productN=0%20220003048%2019853286%2019853229> (Дата обращения: 4.04.2018).

165. Arena Miriam, E. Factores and afectan la multiplication in vitro de los brotes de portainjertos de Prunus / E. Arena Miriam, H. Caso Osvaldo // Fyton. – 1992. – V. 53, № 1. – P. 29-39.
166. Atanasoff, D. Plum pox. A new virus disease / D. Atanasoff // Ann. Univ. Sofia, Fac. Agric. Silvic. – 1932. – № 11. – P. 49-69.
167. Batukaev, A.A. Studying tolerance of prune (*Prunus domestica*) to the plum pox virus (PPV) by criterion "Efficiency of microshoots' regeneration" in controlled *in vitro* conditions / A. A. Batukaev, I. M. Bamatov, M. A. Vinter // Journal of Pharmaceutical sciences and research. – 2018. – V. 10 (1). – P. 59-64. – URL: <http://www.jpsr.pharmainfo.in/issue.php?page=101> (Дата обращения: 1.02.2018 г.)
168. Baumgartnerova, H. First findings of plum pox virus in walnut trees (*Juglans regia* L) // Acta virologica. – 1996. – V. 40. – P. 59–60.
169. Baumgartnerova, H. Relationship between concentration of Plum Pox Virus and content of pigments in virus-infected symptomatic apricot leaves / H. Baumgartnerova, Slovco, N. Petrukov // Acta virologica. – 1998. – V. 42. – P. 216 – 218.
170. Benmahioul, B. Micropropagation and ex vitro rooting of pistachio (*Pistacia vera* L.) / B. Benmahioul, N. Dorion, M. Kaid-Harche, F. Daguin // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 2012. – V. 108, №2. – P. 353-358.
171. Blattny C., Heger M. Zast. Bilja, 1965, XVI (85-88), 417-418.
172. Blystad, D.- R. Survey on Plum pox virus in Norway / D.-R. Blystad, R. Knudsen, C. Spetz, S. Haugslie [et al.] // T. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kühn-Archiv, 427, 2010. – P. 351-352.
173. Borkowska, B. Activity of thidiazuron *in vitro* shoot cultures of *Prunus* sp. and *Morus alba* / B. Borkowska, W. Litwinczuk // Biol. Plantarum. – 1993. – V.35. – №1. – P. 63-67.
174. Boulila, M. Outbreak of Plum pox virus in Tunisia / M. Boulila, P. Briard, M. Ravelonandro // Journal of Plant Pathology. – 2004. – V. 86. – № 3. – P. 197-201.
175. Briciu, A. Molecular and serological differentiation of plum pox strains in three plum-growing areas situated in Transylvanian fruit central area, Romania / A. Briciu, D.

- Pamfil, D. Briciu // Bulgarian Journal of Agricultural Science. – 2012 a. – V.18 (№1). – P. 70-76.
176. Briciu, Al. Molecular differentiation of Plum pox strains in Cluj plum-growing area using RT-PCR and RFLP techniques / Al. Briciu, D. Pamfil, D. Briciu, I. Petricele, D. Curticiu, E. Balazs, I. Zagrai // Bulgarian Journal of Agricultural Science. – 2012 b. - 18 (№1). – P. 24-27.
177. Briciu, Al. Transylvanian fruit central area - Mures plum-growing area / A. Briciu, D. Pamfi, D. Briciu, I. Petricele // Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology. – 2011. – Volume 15 (1). – P. 11- 14.
178. Bünter, M. Sharka: Befallsituation in der Schweiz 2005 / M. Bünter, E. Bosshard, M. Hilbert, B. Buchmann, M.-E. Ramel, F. Schwaller, P. Gugerli // Schweizer Zeitschrift für Obst- und Weinbau. – 2006. – №11. – S. 10-12.
179. Byzova, N.A. Interaction of Plum Pox Virus with Specific Colloidal Gold-Labeled Antibodies and Development of Immunochromatographic Assay of the Virus / N. A. Byzova, I. V. Safenkova, S. N. Chirkov, V. G. Avdienko, A. N. Guseva, I. V. Mitrofanova, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev, J. G. Atabekov // Biochemistry (Moscow). – 2010. – Vol. 75. – №. 11. – P. 1393-1403.
180. Çağlayan, T. K. Susceptibility of different prunus rootstocks to natural infection by Plum Pox Virus / T. - K. Çağlayan, K. Kaya, Ç. U. Serçe, M. Gazel, F.C. Cengiz, E. Vidal, M. Cambra // 22nd 'International Conference on Virus and Other Transmissible Fruit Crop Diseases' (ICVF) Rome, June 3-8, 2012. – P. 238.
181. Cambra, M. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease / M. Cambra, N. Capote, A. Myrta, G. Llácer // OEPP/EPPO. *Bulletin*. – 2006.- – № 36. – P. 202–204.
182. Capote, N. Direct sample preparation methods for the detection of Plum pox virusby real-time RT-PCR / N. Capote, E. Bertolini, A. Olmos, E. Vidal, M.C. Martínez, M. Cambra // INTERNATIONAL MICROBIOLOGY. – 2009. – V. 12. – P. 1-6.
183. Capote, N. Interference Between D and M Types of Plum pox virus in Japanese Plum Assessed by Specific Monoclonal Antibodies and Quantitative Real-Time Reverse

Transcription-Polymerase Chain Reaction / N. Capote , M. T. Gorris , M. C. Martínez , M.a Asensio , A. Olmos, M. Cambra // *Phytopathology*. – 2006. – V. 96. – № 3. – P. 320 – 325.

184. Chirkov, S. Detection and partial molecular characterization of atypical plum pox virus isolates from naturally infected sour cherry / S. Chirkov, P. Ivanov, A. Sheveleva // *Archives Virologie*. – 2013. – V. 158(6). – P. 1383-1387.

185. Dallot, S. Mediterranean and central-eastern European countries host viruses of two different clades of plum pox virus strain M / S. Dallot, M. Glasa, D. Jevremovic, I. Kamenova, S. Paunovic, G. Labonne // *Archives of Virology*. – 2011. – V.156. – P. 539–542.

186. Damsteegt, V.D. Prunus Host Range of Plum pox virus (ppv) in the United States by Aphid and Graft Inoculation / V.D. Damsteegt, R. Scorza, A.L. Stone, W.L. Schneider, K. Webb, M. Demuth, F.E. Gildow // *Plant Disease*. – 2007. – V. 91. – №1. – P. 18–23.

187. Dolgov, S. Transgenic approach for improving resistance of plum cultivars for Sharka disease / S. Dolgov, R. Mikhailov, O. Shulga, P. Kharchenko, A. Firsov // 12 th International Symposium on Plant Virus Epidemiology, 28 January-1 February 2013. – P. 179.

188. Durdina, R. Razmnozavaje autohtone slyive tip Sitnica (*Prunus domestica* L.) micro-propagacijom *in vitro* / R. Durdina, T. Vujovic, R. Cerovic // *Vocarstvo*. – 2008. 42. – № 163-164. – C. 103-109.

189. Dzhuvinov, V. T. Investigation of Plum Pox Virus in Bulgaria for the past 70 years / V. T. Dzhuvinov, V. B. Bozhkova, S. A. Milusheva, P. S. Gercheva // *Bulg. J. Agric. Sci.* – 2007. – V. 13. – P. 265-272.

190. Einset, J.W. Cytokinin consumption by micropropagated shoots / J.W.Einset // *Comb. Proc: Intern Plant Propagators Soc.* – 1987. – V. 36. – P. 635-640.

191. Fallahpour, M. In vitro propagation of “Gisela 5” rootstock as affected by mineral composition of media and plant growth regulators / M. Fallahpour, S. M. Miri, N. Bouzari // *Journal of Horticultural Research*. – 2015. – V. 23(1). – P. 57-64.

192. Fidanci, A. Determination of in vitro propagation techniques for some clonal cherry rootstocks / A.Fidanci, M/ Burac, B. Erenoglu, M.E. Akcay // *Acta Hort.* 795. – 2008. – P. 409-412.
193. Fini, P. Plum Pox Virus situation in Emilia-Romagna region (Italy) / P. Fini, P. Grillini, A. D'Anniballe, A.R. Babini, V. Vicchi // 22st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Rome, June 3-8, 2012. – P. 143.
194. Fiore, N. Tracking Plum pox virus in Chile throughout the year by three different methods and molecular characterization of Chilean isolates / N. Fiore, C. Araya, A. Zamorano, F. González, R. Mora, J. Sánchez-Navarro, V. Pallás, I. M. Rosales / 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kühn-Archiv, 427, 2010. – P. 42.
195. Fiorono, P. Propagation of apple cultivars / P. Fiorino // *Acta Hort.* – 1983. – V. 131. – P. 95-100.
196. Fiorino, P. Propagation of Fruit Trees by Tissue Culture in Italy / P. Fiorino, F. Loreti // *Hort. Science.* – 1987. – V. 2. – P. 353-358.
197. Fira, A. New aspects regarding the micropropagation of blackberry cultivar "Thornless evergreen" / A. Fira, D. Clapa, C. Plopa // *Cluj Napoca: Bul. Univ. Agr. Sci. and Vet. Med.* – 2010. – V.67, № 1. – P. 106-114.
198. García, J.A. Proteolytic activity of the plum pox potyvirus NI_a – protein on excess of natural and artificial substrates in *Escherichia coli*/ J. A. García, J. L. Riechmann, M. T. Martín, S. Laín // *FEBS Letters.* – 1989. – Volume 257. – № 2. – P. 269-273.
199. Gibberellic acid/ Sigma-Aldrich [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=Gibberellin&interface=All&N=0+&mode=partialmax&lang=en®ion=RU&focus=product&mainQuery=Gibberellin> (Дата обращения: 15.05.2017).
200. Glasa, M. Analysis of recombinant *Plum pox virus* (PPV) isolates from Serbia confirms genetic homogeneity and supports a regional origin for the PPV-Rec subgroup / M. Glasa, S. Paunovic, D. Jevremovic, A. Myrta, S. Pittnerová, T. Candresse // *Archives of Virology.* – 2005. – V.150. – P. 2051-2060.

201. Glasa, M. Characterization of sour cherry isolates of plum pox virus from the Volga Basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus / M. Glasa, Y. Prikhodko, L. Predajňa, A. Nagyová, Y. Shneyder, T. Zhivaeva, Z. Subr, M. Cambra, T. Candresse // *Phytopathology*. – 2013. – V. 103 (9). – P. 972-979.
202. Glasa, M. Complete and partial genome sequences of the unusual *Plum pox virus* (PPV) isolates from sour cherry in Russia suggest their classification to a new PPV strain / M. Glasa, Y. Prichodko, T. Zhivaeva [et al.] // 22st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Rome, June 3-8, 2012. – P. 237.
203. Glasa, M. Plum Pox Virus/ M. Glasa, T. Candresse // *Encyclopedia of Virology* (Third Edition). – 2008. – P. 238–242.
204. Govorčin, S. Neka fizikalna i mehanicka svojstva drva šljive (*Prunus Domestica* L.) – Some Physical and Mechanical Properties of Plum Tree (*Prunus Domestica* L.) / S. Govorčin, T. Sinković, T. Sedlar, I. Ištók, M. Vukadin // *Drvna industrija*. – Vol. 63 (4). – 2012. – P. 291-295.
205. Hartmann, W. Hohenheimer Pflaumen und Zwetschenzuchtung // *Erwerbs - Obstbau*. - 1999. – 41. – №3-4. — C. 75-80.
206. Hauptmanová, A. The elimination of Plum pox virus in plum cv. Bluefree and apricot cv. Hanita by chemotherapy of in vitro cultures / Hauptmanová A., Polák J. // *Horticulturae Scientia*. (Prague). – 2011. – V.38. – №2. – P. 49–53.
207. Hill, S.A. *Methods in plant virology* // Oxford: Alden Press, 1984. – P. 66-68.
208. Hust, M. The production of a genus-specific recombinant antibody (SCFV) using a recombinant Potyvirus protease / M. Hust, E. Maiss, H.-J. Jacobsen, T. Reinard // *Journal of virological methods*. – 2002. – T. 106. – №2. – P. 225-233.
209. Jakab-Ilyefalvi, Zs. Chlorophyll content quantification in acclimated “*in vitro*” Plum plants (*Prunus domestica*, L.) / Zs. Jakab-Ilyefalvi, D. Pamfil // *Annals of RSCB*. – 2011. – Vol. XVI. - Issue 1. – P. 55-61.
210. James, D.J. Shoot and root initiation in vitro in the apple rootstock M 9 and the promotive effects of phloroglucinol / D.J. James, I.J. Thurbon // *J. Hort. Sci.* – 1981. – V. 56, № 1. – P. 15-20.

211. James, D. Detection of a New and Unusual Isolate of Plum pox virus in Plum (*Prunus domestica*) / D. James, A. Varga, D. Thompson, S. Hayes // Plant Disease. – 2003. – Volume 87. – №9. – P. 1119-1124.
212. James, D. Nucleotide sequence analysis of Plum pox virus isolate W3174: Evidence of a new strain / D. James, A. Varga // Virus Research. – 2004. –V. 110. – P. 143-150.
213. Jarošová, J. Real-time RT-PCR quantitative analysis of plant viruses in stone fruit tissues/ J. Jarošová, S. Gadiou, J.K. Kumar // 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kühn-Archiv. – 2010. – V. 427. – P. 61-64.
214. Jevremović, D. *Plum pox virus* strains: Diversity and geographica distribution in Serbia / D. Jevremović, S. Paunović // Pestic. Phytomed. (Belgrade). – 2014. – V. 29(2). – P. 97–107.
215. Jones, O.P. Propagation in vitro of five apple scion cyltivars / O.P. Jones, C.A. Pontikis, M.E. Hopgood // Hort. Sci. – 1979. – V. 54, № 2. – P. 155-158.
216. Jordović, M. Investigation of the speed and some factors of spreading plum pox virus disease / M. Jordović // Phytopath. Medit. – V.2. – 1963. – P. 167–170.
217. Kamenova, I. An overview of Plum pox virus strain variation / I. Kamenova // An Overview of Plum Pox Virus Strain Variation, Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 1997. – V. 11: 3-4. – P. 10-18.
218. Kamenova, I. *Prunus cerasifera* as a host of plum pox virus in Bulgaria / I. Kamenova // Journal of Plant Pathology. – 2008, 90 (1, Supplement), S1.15-18.
219. Kensaku, M. Molecular Epidemiology of Plum pox virus in Japan / Maejima Kensaku, Himeno Misako, Komatsu Ken, Yusuke Takinami, Masayoshi Hashimoto, Shuichiro Takahashi, Yasuyuki Yamaji, Kenro Oshima, Shigetou Namba // Phytophatology. – 2011. – V. 101. - № 5. – P. 567-574.
220. Kukharchyk, N. Virus diseases of stone fruit trees in Belarus /N. Kukharchyk, S. Kovaleva //21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kühn-Archiv, 427, 2010. – P. 38.

221. Liu, B. Episomalexpression of a hammerhead rybozyme directed against Plum Pox Virus / B. Liu, M. Tabler, M. Tsagris // *Virus Research*. – 2000. – T. 68. – №1. – P.15-23.
222. López-Moya, J.J. Serological Characterization of Hungarian Plum Pox Virus Isolates / J. J. López-Moya, D. López-Abella, J-R. Díaz-Ruíz, B. Martinez-Garcia, R. Gáborjányi // *Zeitschrift für Naturforschung*. – 1997. – №52. – P. 391-395.
223. Luo, Ya. Guoshu xuebao / Ya Luo, Haoru Tang, Xiumei Li // *J. Fruit Sci.* – 2005. – V. 22, № 1. – P. 66-68.
224. Machnik, B/ *In vitro* jakosci podklader czeresni i jabloni z kultur tkankowych w zalemosci od sposobu ich uprawy / B. Machnik, Z.S. Grzyb // *O\Prace Ints Sadown Kwiac Skierniewice*. – 1994. – V. 31. – P. 119-122.
225. Magyar-Tabori, K. Effect of cytokinin content of the regeneration media on *in vitro* rooting ability of adventitious apple shoots. / K. Magyar-Tabori, J. Dobranszki, I. Hudak // *Scientia Horticulturae*. – 2011. – № 129. – P. 910-913.
226. Manachini, B. Role of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and its secondary hosts in plum pox virus propagation / B. Manachini, P. Casati, L. Cinanni, P. Bianco // *Journal of Economic Entomology*. – 2007. - V. 100 (4). – P. 1047-1052.
227. Mavrodieva, V. Molecular characterization of PPV isolates from plum germoplasm illegally imported from Ukraine / V. Mavrodieva, R. Mock, L. Levy // *Abstracts of the 20 th International Symposium of Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops*, May 22-26, 2008, Antalya, Turkey. – P. 112.
228. Mavrodieva, V. Molecular Analysis of a Plum pox virus W Isolate in Plum Germplasm Hand Carried into the USA from the Ukraine Shows a Close Relationship to a Latvian Isolate / V. Mavrodieva, D. James, K. Williams, S. Negi, A. Varga, R. Mock, L. Levy // *Plant Disease*. – 2013. – Vol. 97. – № 1. – P. 44-52.
229. Miguel P. Embryo culture and in vitro clonal multiplication of *Prunus* ‘Capdeboscq’ rootstock / P. Miguel, R. Marcelo, L. Aparecido // *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. – 2003. – V.3 – №2 – P. 141-148.

230. Mihaljević, I. In vitro sterilization procedures for micropropagation of «Oblaćinska» sour cherry / I. Mihaljević, K. Dugalić, V. Tomaš [et al.] // Journal of Agricultural Sciences. – 2013. – Vol. 58. – №2. – P. 117-126.
231. Mikhailov, R. Pathogen-derived technologies for improving Plum Pox Virus resistance of transgenic plum (*Prunus domestica* L.) / R. Mikhailov, T. Serova, O. Shulga, A. Firsov, S. Dolgov // 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kühn-Archiv, 427, 2010. – P. 39.
232. Milisevic, T. New plum hybrids resistant to Plum pox virus from the Cacak breeding program (Serbia) / T. Milisevic, N. Milisevic // Докл. БЪЛГЮ АН. – 2011. – V.64. – №8. – С. 1213-1220.
233. Moreno, A. Quantitative estimation of plum pox virus targets acquired and transmitted by a single *Myzus persicae* / A. Moreno, A. Fereres, M. Cambra // Archives of Virology. – 2009. – V.154. – P.1391-1399.
234. Myrta, A. Existence of two serological Subclusters of Plum pox Virus Strain M / A. Myrta, D. Boscia, O. Potere [et al.] // European Journal of Plant Pathology. – 2001. – T. 107. – №8. – P. 845-848.
235. Nas, Mehmet Nuri. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts / Mehmet Nuri Nas, P.E. Read // Scientia Horticulturae. – 2004. –V. 101. – P. 189-200.
236. Neumüller, M. Die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume (*Prunus domestica* L.) gegenüber dem Scharkavirus (Plum pox virus). Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften. – Universität Hohenheim. – 2005. – 153 s.
237. Palmisano, F. An atypical albanian isolate of Plum Pox Virus could be the progenitor of the Marcus strain / F. Palmisano, D. Boscia, A. Minafra, A. Myrta, T. Candresse / 22-st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Rome, June 3-8, 2012. – P. 33.
238. Pasquini, G. Validation of a microarrays protocol for detection and genotyping of PPV reference samples / G. Pasquini // 21-st International Conference on Virus and

- other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kühn-Archiv, 427, 2010. – P. 27.
239. Paunovic, S. Reakcija nove sorte sljive Mildora na različite isolate virusa sarke / S. Paunovic, D. Jevremovic, M. Rankovic // *Vocarstvo*. – 2006. – 40. – № 3. – P. 209-217.
240. Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background Edwin F George, Michael A. Hall, Geert-Jan De Klerk Springer Science & Business Media. – 2007. – 502 p.
241. Plant Tissue Culture Media: Types, Constituents, Preparation and Selection <http://www.biologydiscussion.com/plants/plant-tissue-culture/plant-tissue-culture-media-types-constituents-preparation-and-selection>) (23.08.2017).
242. Poggi Pollini, C. / Specific detection of D- and M-isolates of plum pox virus by immunoenzymatic determination of PCR products/ C. Poggi Pollini, L. Giunchedi, R. Bissani // *Journal of Virological Methods*. – 1997. – Volume 67, Issue 2. – P. 127–133.
243. Polak, J. Distribution of Plum pox virus in the Czech Republic / J. Polak // *Plant Protection Science*. – 2002. – Vol. 38. – №3. – P. 98-102.
244. Polak, J. Hosts and symptoms of plum pox virus: Woody species other than fruit and ornamental species of prunus. - *EPPO Bull.* – 2006. –V. 36. – P. 225–226.
245. Potter, D. Phylogeny and classification of Rosaceae / D. Potter, T. Eriksson, R. C. Evans, S. Oh, J. E. E. Smedmark, D. R. Morgan, M. Kerr, K. R. Robertson, M. Arsenault, T. A. Dickinson, and C. S. Campbell // *Plant Systematics and Evolution*. – 2007. –V. 266: 5–43.
246. Predajňa, L. Evaluation of the genetic diversity of Plum pox virus in a single plum tree / L. Predajňa, Z. Šubr, T. Candresse, M. Glasa // *Virus Research*. – 2012. – Vol. 167. – P. 112-117.
247. Pua, E.C. In vitro propagation of Ottawa -3 apple rootstock / E.C. Pua, Calvin Chohg, G.L. Rousselle // *Can. J. Plant. Sci.* – 1983. –V. 63, № 1. – P. 183- 188.
248. Ragetli, H.W.J. Virus-host interactions with emphasis on certain cytopathic phenomena. *Can. J. Bot.* – 1967. – V.45. – P. 1221-1234.

249. Real-Time PCR. – 2002. – URL: <http://www.lytech.ru/Inform/pcrmethod.htm>
250. Rebenstorf, K. Eine kleine Studie zum Auftreten des Sharka-Virus (Plum pox potyvirus) in Pflaumenobstbeständen im Berliner Umland // K. Rebenstorf, C. Büttner // *Gesunde Pflanzen*. – 2004. – Vol. 56. – №1. – P. 27-31.
251. Rosenbaum, R. Plum pox virus and what it means for Michigan / R. Rosenbaum, M. Hansen, M. Bulatovic-Danilovich, B. Shane, R. Hammerschmidt, B. Tritten, M. Longstroth // Michigan State University. Special plum pox issue. August 22, 2006. – P. 1-7.
252. Rozák, J. Detection and characterization of Plum pox virus (PPV) isolates from Eastern Slovakia revealed the presence of three main viral strains / J. Rozák, L. Predajňa, Z. Gálová, M. Glasa // *Potravinárstvo*. – 2014. – Vol. 8. – №1. – P. 1-7.
253. Sadeghi, F. Optimizing culture media for in vitro proliferation and rooting of Tetra (*Prunus empyrean* 3) rootstock / F. Sadeghi, A. Yadollahi, M. Jafarkhani Kermani, M. Eftekhari // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. – 2015. – V. 13 – P. 19 – 23.
254. Salavei, A. Detection of Plum Pox Virus in region of Belarus / A. Salavei, M. Kastriskaya, N. Valasevich, N. Kukharchyk // 22nd 'International Conference on Virus and Other Transmissible Fruit Crop Diseases' (ICVF) Rome, June 3-8, 2012. – P. 242.
255. Salvador, B. Identification of Plum pox virus Pathogenicity Determinants in Herbaceous and Woody Hosts / B. Salvador, M. O. Delgadillo, P. Sáenz, J. A. García, and C. Simón-Mateo // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2008. – Vol. 21. – № 1. – P. 20 – 29.
256. Scorza, R. Control of Plum pox virus through the use of genetically modified plants/ R. Scorza, M. Ravelonandro // *EPPO Bulletin*. – 2006. – P. 337-340.
257. Shafer, J.F. Tolerance to plant disease / J.F. Shafer // *Annu Rev. Phytopathol.* – 1971. – V. 9. – P. 235-252.
258. Sheveleva, A. Complete genome sequence of a novel Plum poxvirus strain W isolate determined by 454 pyrosequencing / A. Sheveleva, A. Kudryavtseva, A. Speranskaya, M. Belenikin, N. Melnikova, S. Chirkov // *Virus Genes*. – 2013. – V. 47. – P. 385–388.

259. Sheveleva, A. Occurrence and genetic diversity of winona-like plum pox virus isolates in Russia / A. Sheveleva, P. Ivanov, Y. Prihodko et al. // *Plant Disease*. – 2012. – Vol. 96. – № 8. – P. 1135-1142.
260. Snover-Clift, K. L. First Report of Plum pox virus on Plum in New York State / K. L. Snover-Clift, P. A. Clement, R. Jablonski, R. J. Mungari, V. A. Mavrodieva, S. Negi, L. Levy // *Plant Disease*. – 2007. – Vol. 91. – №11. – P. 1512.
261. Sochor, J. Sharka: The Past, The Present and The Future / J. Sochor, P. Babula, V. Adam, B. Krska, R. Kizek // *Viruses*. – 2012. – V. 4 (11). – P. 2853-2901.
262. Spiegel, S. Detection and partial molecular characterization of two Plum pox virus isolates from plum and wild apricot in Southeast Kazakhstan / S. Spiegel, E. M. Kovalenko, A. Varga, D. James // *Plant Diseases*. – 2004. – Vol. 88, №9. – P. 973-979.
263. Stefanova, B. Vegetative and reproductive characteristics of plum cultivar Tegera in the conditions of Central Balkan Mountains / H. Dinkova, B. Stefanova, K. Dragoyski // *Vocaroo*. – 2009. – 43. – № 165-166. – C. 21-25.
264. Stone Fruits. Edited by M. Diekmann and C.A.J. Putter. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. – 1996. – № 16. – P. 30-31.
265. Szathmáry, E. Natural deletion is not unique in the coat protein (CP) of recombinant Plum pox virus (PPV) isolates in Hungary / E. Szathmáry, L. Palkovics // 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kühn-Archiv, 427, 2010. – P. 151-155.
266. Toop, B.L. *Plum (Handbook of Plant Breeding)* / B. L. Topp, D. M. Russell, M. Neumüller, M. A. Dalbó, W. Liu. – 2012. – V. 8, part 3. – P. 571-621.
267. Ulubas Serce, C. Further characterization of a new recombinant group of Plum pox virus isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey/ C. Ulubas Serce, T. Candresse, L. Svanella-Dumas [et al.] // *Virus Research*. – 2009. – Vol. 142. – P. 121-126.
268. Vitanova, I. Trends of the plum production in Bulgaria / I. Vitanova, S. Dimkova, N. Marinova, D. Ivanova // International Conference of Perspectives in European Fruit Growing. – Lednice, 2006. – P. 166.

269. Wong, W. Evaluation of resistance of transgenic C5 Plum (*Prunus domestica* L.) against four Chilean Plum Pox Virus isolates through micro-grafting / W. Wong, P. Barba, C. Álvarez, Á. Castro, M. Acuña, P. Zamora, M. Rosales, P. Dell'Orto, M.R. Moynihan, R. Scorza, H. Prieto // *Chilean Journal of Agricultural Research*. – 2010. – № 70(3). – P. 372-380.
270. Zagrai, I. Field release of transgenic plums in Romania / I. Zagrai, M. Ravelonandro, R. Scorza, N. Minoiu, L. Zagrai // *Bul. Univ. Sci. and Biotechnol.* – 2008. – 65. – № 1-2. – c. 358-365.
271. Zagrai, L. Diversiti of Plum pox virus isolates in Romania // L. Zagrai, I. Zagrai, B. Kelemen, I. Petricele, D. Pamfil, B. Ferencz, S. Preda, O. Popescu, M. Isac, A. Briciu // *Scientific Papers of the R.I.F.G. Pitesti*. – 2009. – Vol. XXV. – P. 158-162.
272. Zagrai, I. Genetic diversity of Plum pox virus Isolates in Muntenia, Romania / I. Zagrai, L. Zagrai, S. Preda, B. Kelemen, I. Petricele, O. Popescu, D. Pamfil, M. Isac // *Romanian Biotechnological Letters*. – 2010. – Vol. 15, № 3. – P. 5303-5309.
273. Zagrai, I. Overview of the investigation of transgenic plums in Romania / I. Zagrai, M. Ravelonandro, L. Zagrai, R. Scorza, N. Minoiu // *Bul. Univ. Agr. Sci. and Vet. Med. Cluj – Napoca. Hort.* – 2011. – 68. – №1. – C. 117-122.
274. Zagrai, I. Preliminary evaluation of the competitiveness of PPV-Rec and PPV-D under field conditions /I. Zagrai, L. Zagrai, G. Labonne, S. Dallot, A. Festila, I. Baías // *22st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops*. Rome, June 3-8, 2012. – P. 36.
275. Zhang, Y. Physiological modifications caused by plum pox virus in the leaves of peach and apricot tree / Y. Zhang, A.M. Simeone, P. Cappellini // *Phytopathol. Mediterr.* – 2000. – V. 39. – P. 447–450.
276. Zheng, N. Specific and efficient cleavage of fusion proteins by recombinant plum pox virus NIa protease / N. Zheng, J.d.J. Perez, Z. Zhang, E. Dominguez, J.A. Garcia, Q. Xie // *Protein Expression and Purification*. – 2008. – № 57. – P. 153-162.
277. Zou, Ying-Ning. Micropropagation of Chinese plum (*Prunus salicina* Lindl.) using mature stem segments / Ying-Ning Zou. - Cluj-Napoca: *Not. bot. horti agrobot.* - 2010. – V. 38. – № 3. – P. 214-218.

278. <http://faostat3.fao.org/compare/E>
279. <http://fitopat.ru/?p=23>
280. <http://plodogorod.com/garden/fertilizer/yantarnaya-kislota-i-primenenie-ee-dlya-rastenij.html>
281. <http://voronezh.fruitinfo.ru/news/voronegskaya-oblast-v-oblasti-poyavilis-ochagi-sharki-slivi-311512> -
282. <http://www.activestudy.info/vyrashhivanie-elitnogo-posadochnogo-materiala-i-ego-vliyanie-na-produktivnost-plodovyx-nasazhdenij/>
283. <http://www.chile.ru/fruits/plums>
284. <http://www.fsvps.ru/fsvps/structure/terorgs/krasnodar/newsDetails.html?id=80402>
285. <http://www.lechebnik.info/7-3.htm>

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Климатические условия в годы исследований 2011-2014 гг. (г. Краснодар)

Год	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Абсолют
Средняя температура, (°C)													
2011	-0,1	-1,3	4,6	10,0	17,1	22,6	27,1	23,7	19,4	11,7	1,4	5,7	11,8
2012	-0,2	-5,1	3,1	16,5	21,4	24,7	25,8	25,2	21,3	16,8	8,3	2,3	13,4
2013	4,5	5,8	7,6	14,0	21,8	23,5	24,9	25,3	16,9	11,3	9,0	0,8	13,8
2014	0,9	2,6	8,5	13,1	20,1	22,0	25,4	27,1	19,8	10,9	4,8	4,5	13,3
Максимальная температура воздуха, (°C)													
2011	13,8	10,1	19,1	23,8	28,8	31,4	39,5	34,3	30,8	30,2	10,7	16,7	39,5
2012	14,6	9,1	17,6	30,6	32,0	37,5	38,3	37,3	31,9	30,6	25,2	23,0	38,3
2013	17,7	18,9	28,2	29,8	32,1	36,1	35,9	36,5	29,0	24,2	24,8	10,9	36,5
2014	13,4	17,8	25,5	28,2	35,1	31,0	34,9	39,6	33,8	25,3	18,5	15,4	39,6
Минимальная температура воздуха, (°C)													
2011	-10,4	-12,4	-9,3	2,5	6,8	14,0	14,9	12,5	7,5	-1,7	-11,5	-1,5	-12,4
2012	-15,3	-20,8	-6,8	0,4	13,5	14,1	15,5	11,6	9,7	7,4	0,5	-10,4	-20,8
2013	-8,8	-1,8	-4,1	4,4	12,5	15,1	15,7	15,9	4,2	1,9	-1,1	-11,9	-11,9
2014	-15,0	-17,9	-2,7	-0,8	9,1	13,4	18,0	14,0	8,0	-5,0	-4,7	-8,3	-17,9
Сумма осадков, (мм)													
2011	109,6	65,8	65,9	137,7	107,2	53,5	3,1	80,6	22,0	75,8	32,1	43,4	796,7
2012	51,9	70,1	50,0	40,6	74,3	14,8	83,4	3,5	27,3	44,9	37,8	75,0	573,6
2013	41,0	34,3	79,8	20,4	17,1	85,6	96,1	34,6	106,6	75,3	35,7	70,8	697,3
2014	106,9	14,7	94,0	17,9	44,8	129,4	51,3	0,0	40,1	77,7	17,0	65,1	658,9

Состав питательных сред для микроразмножения сливы домашней *in vitro*
(введение в культуру, мультипликация, ризогенез)

Элементы среды	Мурасиге- Скуга (МС) (мг/л)	В5 (среда Гамборга) (мг/л)	Среда Уайта (мг/л)
Макроэлементы	$\text{NH}_4\text{NO}_3 - 1650$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 134$	$\text{Na}_2\text{SO}_4 - 200$
	$\text{KNO}_3 - 1900$	$\text{KNO}_3 - 2500$	$\text{KNO}_3 - 80$
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 370$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 250$	$\text{MgSO}_4 - 360$
	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - 170$	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - 150$	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 - 16,5$
	$\text{CaCl}_2 - 440$	$\text{CaCl}_2 - 150$	$\text{KCl} - 65;$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 - 200$
Микроэлементы	$\text{H}_3\text{BO}_3 - 6,2$	$\text{H}_3\text{BO}_3 - 3,0$	$\text{H}_3\text{BO}_3 - 1,5$
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 24,1$	$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 10,0$	$\text{MnSO}_4 - 4,5$
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} - 8,6$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} - 2,0$	$\text{ZnSO}_4 - 1,5$
	KJ - 0,83	KJ - 0,75	KJ - 0,75
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0,25$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0,25$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0,0025$
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,025$	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,025$	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,02$
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,025$	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,025$	$\text{Fe}(\text{SO}_4)_3 - 2,5$
Хелат железа	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 27,8; \text{Na}_2 - \text{ЭДТА} - 37,3$		
Витамины	$\text{B}_1 - 0,1; \text{B}_6, \text{PP} - 0,5;$ глицин – 2,0; мезоинозит – 100	$\text{B}_1 - 10,0; \text{B}_6,$ $\text{PP} - 1,0;$ мезоинозит – 100	$\text{B}_1 - 0,1; \text{B}_6 - 0,1; \text{PP} - 0,5;$ глицин – 3,0
Сахара	сахароза – 30 г/л	сахароза – 20 г/л	
Ростовые вещества	$\text{БАП} - 0,2 \text{ мг/л}$ (этап введения в культуру), $\text{БАП} - 1 \text{ мг/л}, \text{ГК} - 0,5 \text{ мг/л},$ (этап мультипликации), $\text{ИМК} - 0,5 \text{ мг/л}$ (ризогенез)		
Агар-агар	8 г/л		

Эффективность введения эксплантов сливы домашней в культуру *in vitro*
(2013-2015 гг.)

Год	Элементы учета	Сортообразцы						
		Стен-лей	Кабар-динская ранняя	Блю фри	Анна Шпет	Чачак-ская поздняя	В сред-нем по сортам	Среднее по сортам, %
Март (3-я дек.) контроль								
2013 г.	Посажено, шт	45	45	45	48	45	45,6	-
	Прижилось, шт	17	22	20	22	18	19,8	43,4
	Контамина-ция, шт	16	20	18	24	21	19,8	43,4
	Некроз, шт	12	3	7	2	6	6	13,2
	Выход, %	37,8	48,9	44,4	45,8	40	-	43,4
2014 г.	Посажено, шт	45	45	45	45	45	45	-
	Прижилось, шт	22	26	21	27	24	24	53,3
	Контамина-ция, шт	23	13	20	15	15	17,2	38,2
	Некроз, шт	0	6	4	3	6	3,8	8,5
	Выход, %	48,9	57,7	46,7	60	53,3	-	53,3
2015 г.	Посажено, шт	48	45	45	45	45	45,6	-
	Прижилось, шт	23	29	25	25	27	25,8	56,6
	Контамина-ция, шт	23	13	16	15	16	16,6	36,4
	Некроз, шт	2	3	4	5	2	3,2	7,0
	Выход, %	48	64,4	55,6	55,6	60	-	56,7
Средняя приживаемость за 3 года, %		44,9	57,1	48,9	53,8	51,1	-	51,2
Апрель (1 декада)								
2013 г.	Посажено, шт	42	45	45	45	45	44,4	-
	Прижилось, шт	28	30	28	36	33	31	69,8
	Контамина-ция, шт	10	12	12	7	9	10	22,5
	Некроз, шт	4	3	5	2	3	3,4	7,7
	Выход, %	66,7	66,7	62,2	80	73,3	-	69,8
2014 г.	Посажено, шт	48	45	42	45	45	45	-
	Прижилось, шт	31	34	23	33	29	30	66,7
	Контамина-ция, шт	15	6	13	9	13	11,2	24,9
	Некроз, шт	2	5	6	3	3	3,8	8,4
	Выход, %	64,6	75,6	54,8	73,3	64,4	-	66,5
2015 г.	Посажено, шт	45	45	45	45	45	45	-
	Прижилось, шт	32	34	30	36	31	32,6	72,4
	Контамина-ция, шт	11	9	12	8	12	10,4	23,1

Продолжение								
	Некроз, шт	2	2	3	1	2	2,0	4,5
	Выход, %	71,1	75,6	66,7	80	68,9	-	72,5
Средняя приживаемость за 3 года, %		67,5	72,6	61,2	77,8	68,9	-	69,6
Май (1 декада)								
2013 г.	Посажено, шт	45	42	42	45	45	43,8	-
	Прижилось, шт	38	33	33	33	27	32,8	74,9
	Контаминация, шт	7	8	7	9	13	8,8	20,1
	Некроз, шт	0	1	2	3	5	2,2	5,0
	Выход, %	84,4	78,5	78,6	73,3	60	-	75,0
2014 г.	Посажено, шт	45	42	45	45	48	45	-
	Прижилось, шт	36	35	34	36	29	34	75,5
	Контаминация, шт	8	6	10	8	15	9,4	20,9
	Некроз, шт	1	1	1	1	4	1,6	3,6
	Выход, %	80	83,3	75,6	80	60,4	-	75,9
2015 г.	Посажено, шт	45	45	45	45	45	45	-
	Прижилось, шт	39	38	32	37	29	35	77,8
	Контаминация, шт	6	6	11	8	14	9,0	20,0
	Некроз, шт	0	1	2	0	2	1	2,2
	Выход, %	86,7	84,4	71,1	82,2	64,4	-	77,8
Средняя приживаемость за 3 года, %		83,7	82,1	75,1	78,5	61,6	-	76,2
Июнь (1 декада)								
2013 г.	Посажено, шт	39	45	42	45	45	43,2	-
	Прижилось, шт	30	28	35	29	27	29,8	69,0
	Контаминация, шт	7	14	5	11	13	10	23,1
	Некроз, шт	2	3	2	5	5	3,4	7,9
	Выход, %	76,9	62,2	83,3	64,4	60	-	69,4
2014 г.	Посажено, шт	39	45	45	45	45	43,8	-
	Прижилось, шт	32	31	38	31	31	32,6	74,4
	Контаминация, шт	7	11	6	12	11	9,4	21,5
	Некроз, шт	0	3	1	2	3	1,8	4,1
	Выход, %	82	68,9	84,4	68,9	68,9	-	74,6
2015 г.	Посажено, шт	45	45	45	45	45	45	-
	Прижилось, шт	35	29	37	31	29	32,2	71,6
	Контаминация, шт	10	14	7	14	14	11,8	26,2
	Некроз, шт	0	2	1	0	2	1,0	2,2
	Выход, %	77,8	64,4	82,2	68,9	64,4	-	71,5
Средняя приживаемость за 3 года, %		78,9	65,2	83,3	67,4	64,4	-	71,8



Егоров Е.А.
2016 г.



Директор ООО «ОПХ им.
К.А. Тимирязева

Егоров В.Н.
2016 г.

Акт внедрения

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

Заказчик_ООО «ОПХ им. К.А. Тимирязева» в лице директора Егорова Виктора Николаевича
(наименование организации, ф., и., о., руководителя организации)

Настоящим актом подтверждается, что результаты работы СТО 00668034-072-2015 «СЛИВА. Технология производства оздоровленного посадочного материала. Общие требования», адаптированные мериклоны сливы по теме «Выявить закономерности повышения эффективности клонального микроразмножения и оздоровления сливы» № регистрации 0689-2014-0007
(наименование темы, номер регистрации)

выполненной лабораторией вирусологии

(отдел, лаборатория)

выполняемый в срок с 2015г. 2016г.

внедрены в питомнике ООО «ОПХ им. К.А. Тимирязева»

(наименование подразделений предприятия, где проходило внедрение)

1. Вид внедренных результатов: технология оздоровления, нормативная документация (СТО), оздоровленные мериклоны
(технологии, машины, эксплуатация изделий, функционирование систем)
2. Форма внедрения: СТО 00668034-072-2015 «СЛИВА. Технология производства оздоровленного посадочного материала. Общие требования», маточные растения высших категорий качества
3. Новизна результатов НИР качественно новые
(принципиально новые, качественно новые, модификация,
4. Внедрены: в производство оздоровленного посадочного материала
(процесс)
5. Объем внедрения 10 га, 1 разработка, 20 мериклонов
6. Социальный и научно-технический эффект снижение пестицидной нагрузки на экосистему

(охрана окружающей среды, улучшение и оздоровление условий труда и т.д.)

От НИИ

Руководитель НИР

Бунцова И.И.

Зав. подразделением

Юренко С.?

Исполнители

Бунцова И.И.
Костюк М.А.

От предприятия

Гл. специалист отрасли

Федосинко А.И.



СОГЛАСОВАНО

Директор СКФНЦСВВ

М.П.

Егоров Е.А.

20__ г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО «ОПХ

им. К.А. Тимирязева»

Егоров В.Н.

20__ г.

**Акт внедрения**

Результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия

Заказчик ООО «ОПХ им. К.А. Тимирязева», директор Егоров Виктор Николаевич

(наименование организации, ф., и., о., руководителя организации)

Настоящим актом подтверждается, что результаты работы СТО 00668034-072-2015 «СЛИВА. Технология производства оздоровленного посадочного материала. Общие требования», адаптированные мериклоны сливы по теме «Выявить закономерности повышения эффективности клонального микроразмножения и оздоровления сливы» № регистрации 0689-2014-0007

(наименование темы, номер регистрации)

выполненной НЦ «Защиты и биотехнологий растений», лаборатория вирусологии

(отдел, лаборатория)

выполняемый в срок с 2016 г. по 2017 г.

внедрены в плодоводческой бригаде №3 ООО «ОПХ им. К.А. Тимирязева»

(наименование подразделений предприятия, где проходило внедрение)

1. Вид внедренных результатов технология оздоровления, нормативная документация (СТО), оздоровленные мериклоны
(технологии, машины, эксплуатация изделий, функционирование систем)
2. Форма внедрения: СТО 00668034-072-2015 «СЛИВА. Технология производства оздоровленного посадочного материала. Общие требования», маточные растения высших категорий качества
3. Новизна результатов НИР качественно новые
(принципиально новые, качественно новые, модификация)
4. Внедрены:
- в производство оздоровленного посадочного материала сливы (процесс)
- в проектные работы _____
(указать объект)
5. Объем внедрения 12 мериклонов сливы домашней
6. Социальный и научно-технический эффект снижение пестицидной нагрузки на экосистему
(охрана окружающей среды, улучшение и оздоровление условий труда и т.д.)

От ФНЦ

Руководитель НИР

Бунцевич Л.Л.

Зав. НЦ «Защиты и биотехнологий растений

Юрченко Е.Г.

Исполнители:

Бунцевич Л.Л.

Винтер М.А.

От предприятия

Гл. специалист отрасли

Федоренко А.М.

СОГЛАСОВАНО
Директор
ФГБНУ СКФНЦСВВ



Егоров Е.А.
20__ г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор
ООО «ОПХ им. К.А. Тимирязева»



Егоров В.Н.
20__ г.

Акт внедрения

Результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия

Заказчик_ООО «ОПХ им. К.А. Тимирязева» в лице директора Егорова Виктора Николаевича
(наименование организации, ф., и., о., руководителя организации)

Настоящим актом подтверждается, что результаты работы СТО 00668034-072-2015 «СЛИВА. Технология производства оздоровленного посадочного материала. Общие требования, адаптированные мериклоны сливы по теме «Выявить закономерности повышения эффективности клонального микроразмножения и оздоровления сливы» № регистрации 0689-2014-0007
(наименование темы, номер регистрации)

выполненной лабораторией вирусологии
(отдел, лаборатория)

выполняемый в срок с 2017 г. 2018 г.

внедрены в питомнике ООО «ОПХ им. К.А. Тимирязева»

(наименование подразделений предприятия, где проходило внедрение)

1. Вид внедренных результатов: технология оздоровления, нормативная документация (СТО), оздоровленные мериклоны
(технологии, машины, эксплуатация изделий, функционирование систем)
2. Форма внедрения: СТО 00668034-072-2015 «СЛИВА. Технология производства оздоровленного посадочного материала. Общие требования», маточные растения высших категорий качества
3. Новизна результатов НИР качественно новые
(принципиально новые, качественно новые, модификация,
4. Внедрены: в производство оздоровленного посадочного материала
(процесс)
5. Объем внедрения 1 разработка, 20 мериклонов
6. Социальный и научно-технический эффект снижение пестицидной нагрузки на экосистему

(охрана окружающей среды, улучшение и оздоровление условий труда и т.д.)

От НИИ

Руководитель НИР

(Подпись)

Зав. подразделением

(Подпись) Юрченко Е.Г./

Исполнители

(Подпись) Виттер М.А./

От предприятия

Гл. специалист отрасли

(Подпись) Федоренко А.М./

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2017620325

База данных физиолого-биохимических параметров органов и тканей сливы домашней при культивировании *in vitro* в контролируемых условиях и *in vivo* в неконтролируемых условиях на фоне вирусной инфекции на различных питательных средах

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства" (RU)*

Авторы: *Бунцевич Леонид Леонтьевич (RU), Костюк Марина Александровна (RU), Беседина Екатерина Николаевна (RU)*

Заявка № 2016621688

Дата поступления 20 декабря 2016 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных 17 марта 2017 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2018620111

**База данных качественных показателей оздоровленных
микрорастений сливы домашней *Prunus domestica* при
клональном микроразмножении**

Правообладатель: **Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение "Северо-Кавказский федеральный научный центр
садоводства, виноградарства, виноделия" (RU)**

Авторы: **Бунцевич Леонид Леонтьевич (RU),
Винтер Марина Александровна (RU)**



Заявка № 2017621358

Дата поступления 23 ноября 2017 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных 17 января 2018 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев