

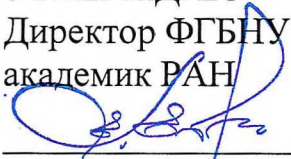
Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
САДОВОДСТВА, ВИНОГРАДАРСТВА, ВИНODEЛИЯ»
(ФГБНУ СКФНЦСВВ)

№ госрегистрации 121070200031-5



УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ СКФНЦСВВ,
академик РАН

 Е.А. Егоров

« 30 » декабря 2022 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ В РАМКАХ ВЫПОЛНЕНИЯ НИОКР, СООТВЕТСТВУЮЩЕЙ ПРОГРАММЕ СОЗДАНИЯ И РАЗВИТИЯ СЕЛЕКЦИОННО- ПИТОМНИКОВОДЧЕСКОГО ЦЕНТРА ФГБНУ СКФНЦСВВ НА ЭТАПЕ 1 РЕАЛИЗАЦИИ ПРОЕКТА

«Реализация направлений, соответствующих программе создания и
развития селекционно-семеноводческого центра в сфере плодово-ягодных
культур и винограда»

(промежуточный)

Соглашение о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме
субсидии от 31.05.2021 г. № 075-15-2021-536
(внутренний номер № 09.ССЦ.21.0002)

Федеральный проект «Развитие масштабных научных и научно-
технологических проектов по приоритетным исследовательским
направлениям» национального проекта «Наука и университеты»

Научный руководитель,
заведующий ФНЦ
«Селекции и питомниководства»,
канд. биол. наук

 30.12.2021 И.И. Супрун
подпись, дата

Краснодар 2022

Научный руководитель НИР,
зав. ФНЦ «Селекции и
питомниководства», канд. биол. наук

 30.12.2021
подпись, дата

И.И. Супрун
(разделы 1, 2, 3)

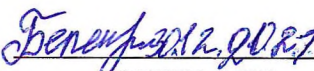
Исполнители:

Мл. науч. сотр. лаб. сортоизучения и
селекции садовых культур

 30.12.2021
подпись, дата

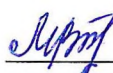
И.М. Балапанов
(раздел 1)

Мл. науч. сотр. лаб. сортоизучения
и селекции садовых культур,
аспирант

 30.12.2021
подпись, дата

Е.А. Беленко
(раздел 1)

Зав. лаб. вирусологии, канд. с.-х.
наук

 30.12.21
подпись, дата

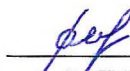
М.А. Винтер
(раздел 3)

Науч. сотр. лаб. виноградарства и
виноделия АЗОСВиВ – филиала
ФГБНУ СКФНЦСВВ, канд. биол.
наук

 30.12.2021
подпись, дата

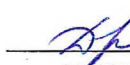
И.В. Горбунов
(разделы 1, 3)

Ст. науч. сотр. лаб. сортоизучения и
селекции косточковых культур, канд.
с.-х. наук

 30.12.21
подпись, дата

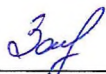
Ю.А. Доля
(раздел 1)

Мл. науч. сотр. лаб.
питомниководства, аспирант

 30.12.21
подпись, дата

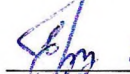
А.И. Дрыгина
(разделы 1, 3)

Зав. лаб. сортоизучения и селекции
косточковых культур, д-р с.-х. наук,
проф.

 30.12.21
подпись, дата

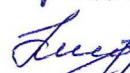
Р.Ш. Заремук
(разделы 1, 2)

Зав. лаб. сортоизучения и селекции
винограда, канд. биол. наук

 30.12.2021
подпись, дата

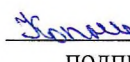
Е.Т. Ильницкая
(разделы 1, 2)

Ст. науч. сотр. лаборатории
питомниководства, канд. с.-х. наук

 30.12.21
подпись, дата

М.В. Карпушина
(раздел 3)

Науч. сотр. лаб. сортоизучения и
селекции косточковых культур, канд.
с.-х. наук

 30.12.2021
подпись, дата

Т.А. Копнина
(раздел 1)

Мл. науч. сотр. лаб. сортоизучения и
селекции винограда

 30.12.2021
подпись, дата

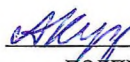
В.К. Котляр
(разделы 2, 3)

Мл. науч. сотр. лаб. сортоизучения и
селекции косточковых культур,
аспирант

 30.12.2021
подпись, дата

А.А. Кочубей
(раздел 1)

Зав. лаб. питомниководства,
канд. биол. наук

 30.12.2021
подпись, дата

А.П. Кузнецова
(разделы 1, 3)

Мл. науч. сотр. селекционно-
биотехнологической лаборатории,
аспирант

 30.12.2021
подпись, дата

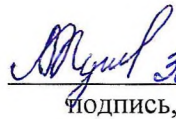
Е.В. Лободина
(разделы 2, 3)

Директор АЗОСВиВ – филиала
ФГБНУ СКФНЦСВВ,
канд. с.-х. наук

 30.12.2021
подпись, дата

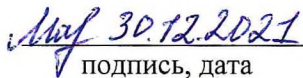
А.А. Лукьянов
(разделы 1, 3)

Науч. сотр. лаб. виноградарства и
виноделия АЗОСВиВ – филиала
ФГБНУ СКФНЦСВВ, канд. биол.
наук

 30.12.2021
подпись, дата

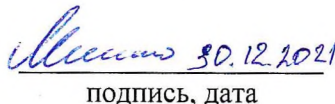
А.А. Лукьянова
(разделы 1, 3)

Мл. науч. сотр. лаборатории
сортоизучения и селекции винограда

 30.12.2021
подпись, дата

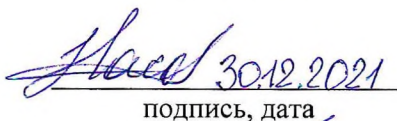
М.В. Макаркина
(разделы 1, 2)

Мл. науч. сотр. лаборатории
физиологии и биохимии растений

 30.12.2021
подпись, дата

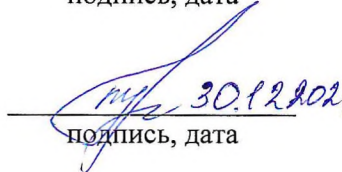
А.Е. Мишко
(раздел 3)

Зав. лаб. биотехнологического
контроля фитопатогенов и
фитофагов, канд. биол. наук

 30.12.2021
подпись, дата

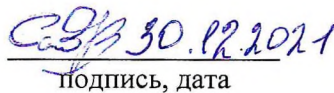
А.И. Насонов
(раздел 1)

Зав. лаб. переработки и хранения
плодов, д-р с.-х. наук, проф.

 30.12.2021
подпись, дата

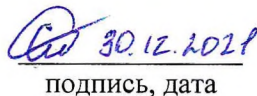
Т.Г. Причко
(раздел 1)

Мл. науч. сотр. лаб.
биотехнологического контроля
фитопатогенов и фитофагов

 30.12.2021
подпись, дата

Н.В. Савчук
(раздел 1)

Мл. науч. сотр. селекционно-
биотехнологической лаборатории

 30.12.2021
подпись, дата

И.В. Степанов
(разделы 2, 3)

Зав. лаб. физиологии и биохимии
растений, канд. с.-х. наук

 30.12.2021
подпись, дата

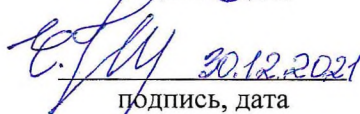
М.А. Сундырева
(раздел 3)

Зав. лаб. селекционно-
биотехнологической, канд. биол.
наук

 30.12.21
подпись, дата

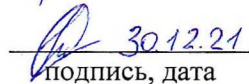
С.В. Токмаков
(разделы 2, 3)

Зав. лабораторией сортоизучения и
селекции садовых культур, д-р с.-х.
наук

 30.12.2021
подпись, дата

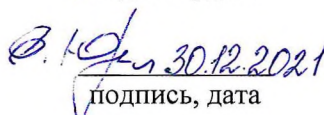
Е.В. Ульяновская
(разделы 1, 2)

Мл. науч. сотр. лаборатории
вирусологии, аспирант

 30.12.21
подпись, дата

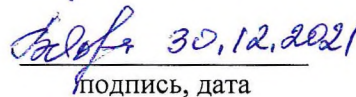
С.В. Федорович
(разделы 2, 3)

Зав. научным центром «Защиты и
биотехнологии растений», канд. с.-х.
наук

 30.12.2021
подпись, дата

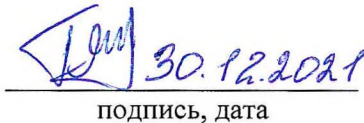
Е.Г. Юрченко
(раздел 1)

Ст. науч. сотр. лаб. сортоизучения и
селекции садовых культур, канд. с.-х.
наук

 30.12.2021
подпись, дата

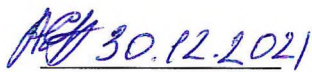
В.В. Яковенко
(раздел 3)

Ст. науч. сотр. лаб.
биотехнологического контроля
фитопатогенов и фитофагов,
канд. биол. наук

 30.12.2021
подпись, дата

Г.В. Якуба
(раздел 1)

Мл. науч. сотр. лаб. селекционно-биотехнологической


подпись, дата

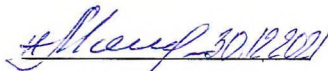
Е.А. Аль-Накиб
(разделы 2, 3)

Мл. науч. сотр. лаб. селекционно-биотехнологической


подпись, дата

А.О. Авакимян
(раздел 3)

Ст. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур, канд. с.-х. наук


подпись, дата

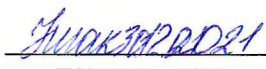
Н.В. Можар
(раздел 1)

Ст. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур, канд. биол. наук


подпись, дата

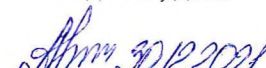
В.И. Лапшин
(раздел 1)

Мл. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур


подпись, дата

Л.С. Ушак
(раздел 1)

Мл. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур


подпись, дата

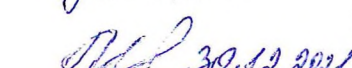
Л.В. Артюхова
(раздел 1)

Мл. науч. сотр. лаб. селекции и сортоизучения винограда


подпись, дата

Е.Г. Пята
(раздел 1)

Науч. сотр. лаб. питомниководства


подпись, дата

И.Л. Ефимова
(разделы 1, 3)

Науч. сотр. лаборатории управления воспроизводством в ампелоценозах и экосистемах, канд. с.-х. наук


подпись, дата

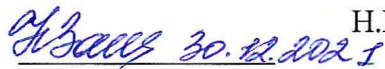
О.Л. Сегет
(раздел 3)

Зав. лаб. защиты и токсикологического мониторинга многолетних агроценозов, канд. биол. наук


подпись, дата

М.Е. Подгорная
(раздел 1)

Нормоконтроль


подпись, дата

Н.М. Запорожец

РЕФЕРАТ

Отчет 177 с., 57 рис., 19 табл., 97 источн., 4 прил.

СОРТ, ГИБРИД, СЕЛЕКЦИЯ, ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫЙ ПРИЗНАК
ПИТОМНИКОВОДСТВО, КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ,
ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, САДОВЫЕ КУЛЬТУРЫ, ВИНОГРАД, IN VITRO,
ГЕН, ДНК-МАРКЕР, ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ.

Объекты исследования: сорта, виды, гибриды и клоны плодовых культур и винограда, ростстимулирующие препараты.

Цель исследований: провести мобилизацию, сохранение, изучение генофонда плодовых культур, винограда и создать сорта нового поколения с высоким потенциалом адаптивности, продуктивности, качества плодов и технологичности и получить научные данные для разработки и усовершенствования методов размножения растений в условиях *in vitro* и *in vivo*, а также ДНК-паспортизации генотипов и идентификации генов хозяйственно-ценных признаков.

Новизна исследований связана с отсутствием новых знаний о закономерностях наследования селекционно-значимых признаков для выделения новых доноров и источников плодовых культур и винограда, создания сортов отечественной селекции нового поколения, сочетающих высокую адаптивность, продуктивность, технологичность с высоким качеством плодов, пригодных для развития отрасли садоводства и виноградарства региона а также в отсутствии эффективных протоколов размножения сортов и подвоев садовых культур и винограда в условиях *in vitro* и *in vivo*, разработанных с учетом сортовой специфичности, информативных ДНК-маркеров, перспективных для анализа генетического разнообразия генофонда, ДНК-паспортизации сортов.

Задачи исследований:

- выполнить комплексное научное исследование, направленное на поиск, мобилизацию, сохранение и изучение генресурсов, выделение доноров и источников основных селекционно-ценных признаков семечковых,

косточковых, культур и винограда, создание новых сортов и подвоев с комплексом хозяйственно ценных признаков: продуктивности, устойчивости к био- и абиострессорам, соответствующих интенсивным ресурсосберегающим технологиям;

- выполнить молекулярно – генетическую идентификацию генов хозяйственно – ценных признаков, ДНК-паспортизацию генотипов, диагностику вирусных и фитоплазменных патогенов и исследования по разработке и усовершенствованию молекулярно-генетических методов для решения задач по селекции, изучению генофонда и получению оздоровленных растений;

- осуществить разработку и совершенствование методов ускоренного размножения растений, свободных от вирусных и фитоплазменных патогенов садовых культур и винограда на основе использования методов культуры клеток и тканей *in vitro* и современных методов размножения *in vivo*.

Результаты исследований. В ходе выполнения исследований получены новые знания о фенотипическом и генотипическом разнообразии сортов, подвоев и гибридных форм садовых культур и винограда генофонда, сохраняемого в ФГБНУ СКФНЦСВВ, включая основные адаптивно значимые и хозяйственно-ценные признаки; выделены 2 донора, 7 источников хозяйственно ценных признаков, 5 элитных форм плодовых культур и винограда; создано и передано в государственное сортоиспытание 2 новых сорта. Разработан метод выделения засухоустойчивых форм подвоев и привойно-подвойных комбинаций (раздел 1).

Разработаны и усовершенствованы современные методы молекулярно-генетической идентификации генов хозяйственно-ценных признаков и паспортизации с использованием различных типов ДНК-маркерных систем (раздел 2). Разработан метод мультиплексной идентификации одновременно трех генов хозяйственно-ценных признаков яблони (ген устойчивости к парше *Rvi6*, гены, контролирующие признаки качества плодов *Md-EXPI*, *Md-PG-1*). Выполнена экспериментальная апробация и оценка полиморфизма 38

локуспецифичных (8 SSR-маркеров) и мультилокусных (20 маркеров на основе SCoT праймеров) и 8 ISSR ДНК-маркеров применительно к семечковым культурам (айва, яблоня). Выявлены информативные SCoT ДНК-маркеры, перспективные для генотипирования сортов яблони и SSR-маркеры, перспективные для генотипирования айвы. Получены ДНК-паспорта по указанным мультилокусным ДНК-маркерам для 16 востребованных в садоводстве отечественных и зарубежных сортов яблони. Выполнена экспериментальная апробация 16 мультилокусных CDDP ДНК-маркеров на абрикосе и винограде, выявлены ДНК-маркеры наиболее перспективные к использованию для генотипирования данных культур. С использованием наиболее полиморфных ДНК-маркеров выполнено генотипирование сортообразцов и форм абрикоса из природных популяций, отобранных на территории Дагестана, а также автохтонных и современных сортов винограда, и получены научные данные о степени генетического родства изученных образцов. На основе проведенной ПЦР-идентификации выполнена молекулярно-генетическая паспортизация по трем аллелям локуса самонесовместимости яблони данные для 21 генотипа рода *Malus*.

Получены новые экспериментальные данные об уровне отзывчивости сортов садовых культур и винограда на компонентный состав искусственных питательных сред в условиях *in vitro*, а также о влиянии биологически активных препаратов на эффективность размножения земляники садовой в условиях *in vivo*. Усовершенствованы экспериментальные протоколы микроклонального размножения по этапам: введение в культуру (для земляники садовой и подвоев косточковых культур) и мультипликация (для подвоя косточковых культур). Разработаны **технологии** создания и ведения маточников подвойных и привойных сортов садовой культуры – подвоев крупнокосточковых и винограда, формализованные в виде нормативной документации – СОП (стандартные операционные процедуры) (3).

Полученные в ходе исследований результаты содержат принципиально новые знания для развития генетики, селекции, питомниководства и биотехнологии плодовых культур и винограда.

Полученные результаты исследований значимы для Российской Федерации и соответствуют приоритетным направлениям развития науки, технологий и техники в РФ: «Науки о жизни», «Рациональное природопользование». Качество полученных результатов сопоставимо с национальным уровнем с точки зрения новизны, оригинальности, значимости и точности.

Область применения: Генетика садовых культур и винограда, практическая селекция и питомниководство садовых культур и винограда, биотехнология многолетних садовых культур, садоводство, виноградарство.

СОДЕРЖАНИЕ

<i>1 Реализация исследовательских проектов по поиску, мобилизации, сохранению и изучению генресурсов, выделению доноров и источников основных селекционно-ценных признаков семечковых, косточковых, культур и винограда, созданию новых сортов и подвоев с комплексом хозяйственно ценных признаков: продуктивности, устойчивости к био - и абиострессорам, соответствующих интенсивным ресурсосберегающим технологиям</i>	14
1.1 Обоснование необходимости проведения НИР	14
1.2 Объекты, методы, методики и условия проведения исследований..	22
1.3 Результаты исследований	25
1.3.1 Селекция и сортоизучение семечковых культур	25
1.3.2 Селекция и сортоизучение косточковых культур... ..	39
1.3.3 Селекция и сортоизучение винограда	53
1.3.4 Разработка метода выделения засухоустойчивых подвоев и привойно-подвойных комбинаций	58
1.4 Выводы.....	61
<i>2 Реализация исследовательских проектов по ДНК-паспортизации генотипов; молекулярно - генетической идентификации генов хозяйственно-ценных признаков и диагностике вирусных и фитоплазменных патогенов; разработке и усовершенствованию молекулярно-генетических методов для решения задач по селекции, изучению генофонда и получению оздоровленных растений...</i>	63
2.1 Обоснование необходимости проведения НИР	63
2.2 Объекты, методы, методики и условия проведения исследований..	70
2.3 Результаты исследований... ..	74
2.3.1 Разработка метода мультиплексной молекулярно-генетической паспортизации и ПЦР идентификации гена	

устойчивости яблони к парше <i>Rvi6</i> и генов, контролирующих признаки качества плодов <i>Md-Exp7</i> и <i>MdPG1</i>	74
2.3.2 Апробация локуспецифичных (SSR) и мультилокусных ДНК-маркеров на семечковых культурах и выполнение SCoT – генотипирования сортов яблони	78
2.3.3 Молекулярно-генетическая паспортизация генотипов яблони по аллелям гена самонесовместимости... ..	91
2.3.4 Генотипирование сортов и форм абрикоса из разных эколого-географических групп и природных популяций Дагестана и анализ их генетических взаимосвязей... ..	94
2.3.5 Молекулярно-генетический анализ современных и автохтонных сортов винограда и изучение их генетических взаимосвязей... ..	100
2.4 Выводы.....	105
3 Реализация исследовательских проектов по разработке и совершенствованию методов ускоренного размножения растений, свободных от вирусных и фитоплазменных патогенов садовых культур и винограда на основе использования методов культуры клеток и тканей <i>in vitro</i> и современных методов размножения <i>in vivo</i>	107
3.1 Обоснование необходимости проведения НИР	107
3.2 Объекты, методы, методики и условия проведения исследований..	111
3.3 Результаты исследований... ..	114
3.3.1 Совершенствование протоколов микроклонального размножения по этапам: введение в культуру <i>in vitro</i> и мультипликация...	114
3.3.2 Изучение уровня отзывчивости клонового подвоя косточковых культур ПК СК 1 на компонентный состав искусственной питательной среды и оптимизация этапа мультипликации микропобегов	120
3.3.3 Изучение регенерационной отзывчивости генотипов винограда на компонентный состав модифицированной питательной среды MS в условиях <i>in vitro</i>	122

3.3.4 Изучение влияния биологически активных препаратов Агринос 1 и Агринос 2 на эффективность размножения земляники садовой в условиях <i>in vivo</i> ...	124
3.3.5 Разработка стандартных операционных процедур создания и ведения маточников подвойных и привойных сортов садовых культур и винограда...	130
3.3.5.1 Создание и ведение маточников подвойных и привойных сортов яблони...	130
3.3.5.2 Создание и ведение репродукционных маточников привойных сортов винограда...	140
3.4 Выводы.....	145
Заключение.....	148
Список использованных источников.....	153
Приложение 1 – Паспорт технологии «Создание и ведение маточников подвойных и привойных сортов садовых культур (на примере яблони)» (СОП 00668034-01-2021)	164
Приложение 2 – Паспорт технологии «Создание и ведение маточников подвойных и привойных сортов винограда (СОП 00668034-02-2021)».....	168
Приложение 3 – Паспорт технологии «Метод выделения засухоустойчивых форм подвоев и привойно-подвойных комбинаций плодовых культур» (СТО 00668034-122-2021).....	172
Приложение 4 – Паспорт технологии «Метод мультиплексной молекулярно-генетической идентификации генов хозяйственно-ценных признаков и паспортизации с использованием различных типов ДНК-маркерных систем» (СТО 00668034-132-2021).....	174

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

Термин, обозначение или сокращение	Определение (значение)
Соглашение, соглашение о предоставлении гранта	Соглашение о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидии от 31.05.2021 г. № 075-15-2021-536 (внутренний номер № 09.СЦ.21.0002)
Отчет о выполнении мероприятий (работ) отчетного этапа	Отчет о выполнении на отчетном этапе мероприятий (работ), предусмотренных планом-графиком реализации мероприятий, соответствующих программе создания и развития центра
ПГ, План-график, План-график реализации мероприятий	План график реализации мероприятий, соответствующих программе создания и развития центра (Приложение № к Соглашению)
Отчет о НИРТ	Отчет о научных исследованиях и разработке новых технологий в области селекции на отчетном этапе
Научная инфраструктура	Материально-техническая база, предназначенная для обеспечения научной деятельности, в состав которой входят оборудование, необходимое для проведения научных исследований, система информационного обеспечения (библиотеки, информационные центры, информационные сети)
ПЦР	полимеразная цепная реакция; позволяет проводить синтез целевых участков генома <i>in vitro</i> ;
SSR	(simple sequence repeats) микросателлитные последовательности генома;
МАРКЕРНАЯ СЕЛЕКЦИЯ	селекция, выполняемая с использованием ДНК-маркеров для идентификации генов целевых признаков;
CDDP	(conserved DNA derived polymorphism) – тип мультилокусных ДНК-маркеров, основанных на использовании праймеров, комплементарных к консервативным участкам генов;
SCoT	(Start Codon Targeted Polymorphism) тип мультилокусных ДНК-маркеров на основе короткого консервативного региона фланкирующего стартовый кодон в генах растений (ATG);
ISSR	(inter simple sequence repeat) мультилокусные ДНК-маркеры, основанные на анализе межмикросателлитных последовательностей генома;
IRAP	(inter retrotransposon amplified polymorphism) мультилокусные ДНК-маркеры, основанные на анализе последовательностей вставок ретротранспозонов в геноме;
IN VITRO	выполнение эксперимента с биологическим объектом, предполагающего протекание биологических процессов, вне живого организма – в пробирке (<i>in vitro</i> = в стекле (лат.))

шт.	штук;
г	грамм;
кг	килограмм;
ц/га	центнеров с гектара;
т/га	тонн с гектара;
ГСИ	государственное сортоиспытание;
ГСУ	государственный сортоучасток;
ППК	привойно – подвойная комбинация;
MS	питательная среда по прописи Мурасиге-Скуга;
QL	питательная среда Кворина-Лепуавра;
DKW	питательная среда Driver and Kunjuki;
WPM	питательная среда Woody Plant Medium
6-БАП	6-бензиламинопурин
ИМК	индолилмасляная кислота
B1	тиамин
B6	пиридоксин
PP	никотиновая кислота
мг/л	миллиграмм/литр

1 Реализация исследовательских проектов по поиску, мобилизации, сохранению и изучению генресурсов, выделению доноров и источников основных селекционно-ценных признаков семечковых, косточковых, культур и винограда, созданию новых сортов и подвоев с комплексом хозяйственно ценных признаков: продуктивности, устойчивости к био - и абиострессорам, соответствующих интенсивным ресурсосберегающим технологиям

1.1 Обоснование необходимости проведения НИР

Селекционное совершенствование и обновление существующего сортимента плодовых культур и винограда, в том числе за счет высококачественных и адаптивных сортов нового поколения отечественной селекции, требует активной мобилизации и ускоренного изучения имеющихся генетических ресурсов, выделения и создания новых доноров и генетических источников целевых хозяйственных и адаптивно-значимых признаков.

Наиболее эффективное решение основных направлений и приоритетных задач отечественной и зарубежной селекции плодовых растений базируется на значительном биологическом разнообразии исходного материала [1, 2, 3].

Семечковые культуры. Яблоня – основная плодовая культура в мире и в России, широкое распространение которой обусловлено ее достаточно высокой рентабельностью, хорошей транспортабельностью плодов и длительным периодом хранения, особенно сортов зимнего и позднезимнего срока созревания, значительным разнообразием плодов по форме, размеру, окраске, вкусовым достоинствам, круглогодичным использованием и традиционной популярностью плодов у населения.

Селекционное использование наиболее ценных видовых и межвидовых форм плодовых растений, в том числе яблони, остается важнейшим биологическим ресурсом в настоящее время для создания сортов с повышенными показателями адаптивности и устойчивости к абиотическим стрессорам (весенним заморозкам, морозам, засухе, недостаточной или

излишней влагообеспеченности, неустойчивому режиму увлажнения, особенно в течении периода вегетации), устойчивости и иммунитета к основным и новым грибным патогенам, проявляющимся в последнее время все более активнее и агрессивнее по отношению к растению, продуктивности, улучшенных показателей качества и характеристик биохимического состава плодов; повышения экологической устойчивости новых сортов и перспективных гибридов на основе широкого использования генофонда местных сортов, а также ценных дикорастущих форм и видов [4-8].

Проблемы экологизации, биологизация и ресурсосбережения в отрасли садоводства определили одно из приоритетных направлений в селекции яблони – создание и выделение иммунных и высокоустойчивых к парше сортов. Парша – одно из наиболее вредоносных заболеваний яблони на всей территории возделывания, в том числе и на юге России. Возбудитель данного заболевания – гриб *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter). Применение фунгицидных препаратов в садах против этой болезни приводит к загрязнению окружающей среды, уничтожению полезной энтомофауны, в ряде случаев к ослаблению защитных свойств самого растения, и зачастую небезопасно для здоровья человека [9-13].

Мировое сельское хозяйство получает до 30 % прибыли от общей стоимости произведенной продукции за счет использования сортов, резистентных к фитопатогенам [2].

В мире у плодовых культур наиболее значительные успехи достигнуты в селекции яблони на устойчивость к парше. В настоящее время ген Rvi6 (используемое ранее название Vf) от клона *Malus floribunda* 821 наиболее широко используется в селекционных программах мира, в том числе: России, США, Канады, Западной и Восточной Европы [14-22]. В России селекционную работу по этому направлению ведут: ВНИИСПК, СКФНЦСВВ, ФНЦ им. И.В. Мичурина, СКНИИГиПГС, ФИЦ СНЦ РАН (ранее ВНИИЦиСК) и др. научные учреждения.

Создание отечественных биоресурсов основной плодовой культуры яблони (в частности, южных высококачественных сортов, иммунных и устойчивых к парше) на основе направленных интервалентных скрещиваний с использованием усовершенствование метода полиплоидии – одно из перспективных направлений в настоящее время. Для ускорения и оптимизации селекционного процесса планируется использование доноров, комплексных доноров и источников значимых признаков яблони, включающих сорта и формы разной плоидности, в том числе автополиплоиды и отдаленные гибриды, высокоустойчивые и иммунные к парше (ген *Rvi6*).

Наряду с яблоней, в промышленном садоводстве среди семечковых культур груша и айва занимают второе и третье место соответственно. Эти культуры пользуются большой популярностью у населения. Однако площади, занятые ими в России сравнительно небольшие. В Северо-Кавказском регионе имеются благоприятные зоны для возделывания высококачественных сортов груши и айвы. Основным препятствием к широкому распространению этих ценных культур является сравнительно невысокая зимостойкость некоторых районированных сортов, а также несоответствие сортимента современным требованиям. В существующих насаждениях наблюдается многосортность, имеются малоценные сорта, не соблюдено процентное соотношение сортов по срокам созревания плодов и как результат они не обеспечивают круглогодичное снабжение населения плодами. Сортимент нуждается в улучшении путем введения зимостойких, урожайных, устойчивых к болезням сортов с плодами хорошего качества раннелетнего и позднезимнего сроков созревания.

Айва, имеющая популярность в южных регионах РФ, помимо положительных показателей (раннее вступление в плодоношение, пищевая ценность плодов) она имеет и существенные недостатки, ограничивающие ареал этой ценной культуры. Наиболее значительные из них – недостаточная пластичность и адаптивность большинства промышленных сортов, определившие основные районы ее промышленного возделывания на

Северном Кавказе – Краснодарский край, Дагестан, Кабардино-Балкария. Но даже в этих районах периодически наблюдаются неблагоприятные отрицательные температурные факторы, влияющие на отдельные компоненты устойчивости в зимне-весенний период. В отдельные годы потери урожая у сортов айвы достигают значительных размеров. В связи с этим, очевидно, что селекционное улучшение сортимента айвы имеет высокую актуальность.

Косточковые культуры. Краснодарский край – основной регион южного садоводства России, здесь возделываются практически все плодовые культуры, наиболее востребованными среди них являются косточковые культуры. В промышленных насаждениях южного региона черешня, слива домашняя, слива русская, персик, вишня, абрикос занимают среди плодовых культур особое место, многие из них открывают сезон потребления свежих, местных, высококачественных плодов.

Косточковые культуры отличаются требовательностью к условиям выращивания. Они менее адаптивны к ряду стрессовых факторов, которые имеют место быть в южном регионе – резкие перепады температур в зимний период, возвратные весенние заморозки в период цветения, экстремально высокие температуры и длительный засушливый период летом. Ряд косточковых культур – абрикос, персик, черешня в силу своих биологических особенностей не всегда могут в полном объеме реализовать свой потенциал в условиях южного климата, что определяет необходимость постоянного совершенствования сортимента этих ценных южных плодовых культур.

Актуальность создания новых сортов плодовых, в т.ч. косточковых определяется переходом отрасли садоводства на интенсивные и ресурсосберегающие технологии возделывания, позволяющие получать высокий урожай качественных плодов.

На сегодняшний день сортимент большинства косточковых культур отечественной селекции устарел; многие сорта не отвечают тем требованиям, интенсивных технологий, что определяет основные направления в селекции косточковых – селекция на устойчивость к коккомикозу, кластероспориозу,

зимостойкость и засухоустойчивость, высокую урожайность, крупноплодность, скороплодность, высокое качество плодов, технологичность. Селекция в СКФНЦСВВ ведется по трем основным культурам – слива, черешня, вишня.

Черешня – ценная южная косточковая культура. Благоприятные экологические условия Северного Кавказа способствуют полному проявлению биологического потенциала черешни и позволяют ежегодно получать высококачественные плоды лучших сортов различных сроков созревания. За последние годы произошли качественные и количественные изменения в районированном сортименте черешни. Из районирования исключены старые, утратившие свое практическое использование сорта, на их смену пришли сорта нового поколения, пригодные для современных технологий выращивания. К настоящему времени создано более 20 сортов черешни, большая часть из которых находится в реестре Северо-Кавказского региона – Алая, Волшебница, Бархатная, Кавказская, Кавказская улучшенная, Контрастная, Мак, Рубиновая Кубани, Сашенька, Красса Кубани, Краснодарская ранняя, Утро Кубани, Южная. Госортоиспытание проходят сорта Мадонна, Подарок лета, Центральная, Лучезарная и др. Несмотря на регулярное обновление, сортимент черешни не лишен существенных недостатков: отсутствие сортов с частичной самоплодностью, сдержанного роста и компактной кроной дерева; мало сортов раннего и сверхраннего сроков созревания с высокими качествами плодов и высокой адаптивной способностью. При этом, в части адаптивности, одним из приоритетных селекционных направлений является поиск сортов устойчивых к абиотическим стрессорам зимнего и ранневесеннего периода. В связи с этим перспективность черешни неразрывно связана с актуальностью дальнейшего совершенствования сортимента.

Вишня – одна из плодовых косточковых культур, рано вступающих в плодоношение, регулярно плодоносящая, обладающая высокой адаптивностью и потенциальной продуктивностью. В настоящее время доля

вишни в плодовых насаждениях Краснодарского края составляет не более 1,0%. Основная причина ограничения площадей - возрастающая негативная роль абиотических и биотических факторов среды. Селекционерами созданы сорта вишни с использованием различных методов селекции: от направленных скрещиваний: Кирина, Краснодарская сладкая, Казачка; методом мутагенеза Алекса, Кубаночка, методом клоновой селекции – сорт Ностра. В Реестре находятся два сорта – Краснодарская сладкая, Кирина, Казачка.

Под воздействием участвовавших стрессов многие ранее распространенные сорта вишни снизили свою устойчивость к грибным болезням и урожайность, что отражается на стабильности плодоношения и качестве плодов. В связи с этим, решение проблемы оптимизации сортимента вишни селекционным путем является своевременным и актуальным. Для вишни особо актуальным является создание сортов с высокой устойчивостью к коккомикозу и монилиозу, засухоустойчивых со сдержанным ростом дерева, самоплодных, крупноплодных и с высоким качеством плодов.

Вишня в сравнении с другими косточковыми культурами имеет ряд преимуществ – характеризуется достаточно высокой адаптивностью, зимостойкостью, поздним цветением, непревзойденными лечебными и тонизирующими качествами плодов. Кроме этого, плоды вишни - ценный источник биологически активных веществ, органических кислот, микроэлементов, витаминов и т.д. Кроме этого, плоды вишни вдвое богаче железом, чем яблоки, а также содержат фолиевую кислоту и рибофлавин, которые предупреждают малокровие и способны тормозить старение клеток человеческого организма.

В связи с этим одним из этапов работы в проведенных исследованиях была оценка комплекса составляющих качества плодов. Сравнительная оценка плодов вишни изученных сортов различного эколого-географического происхождения показала, что размер, масса, химический состав плодов определяются генетическими особенностями сорта, а их абсолютные значения варьируют по годам, в зависимости от складывающихся погодных условий,

количества урожая, уровня агротехнических мероприятий и других сопутствующих факторов.

Слива – ведущая косточковая культура. Она обладает достаточно высокой степенью засухоустойчивости, зимостойкости, жаростойкости, что обуславливает практически ежегодное плодоношение и ставит ее в отдельные годы в ряд страховых плодовых культур, когда менее адаптивные культуры – персик, черешни, абрикос не формируют урожай в неблагоприятных условиях. Селекционная работа, проводимая в центре селекции, позволила создать новые сорта путем направленных скрещиваний – Краснодарская, Прикубанская, Герцог, Чародейка, Милена, отвечающие современным требованиям. Вместе с тем, актуальным остается проблема улучшения сортимента сливы домашней селекционным путем, предполагающим использование доноров и источников ценных признаков в гибридизации, проведение экологического сортоиспытания, то есть комплексную оценку отечественных и интродуцированных сортов в различных плодовых зонах для выделения наиболее перспективных с комплексом селекционно-ценных и хозяйственно – значимых признаков, которые позволят расширить районированный и перспективный сортимента сливы в Северо-Кавказском регионе.

Современный сортимент винограда юга России не в полной мере отвечает требованиям производства: недостаточно высококачественных адаптивных красных технических и белых сортов, столовых сортов с крупными ягодами, пригодных для возделывания в производстве, бессемянных, устойчивых к абиотическим и биотическим факторам. Насаждения традиционно возделываемых высококачественных сортов винограда являются малопродуктивными, а имеющиеся клоновые насаждения представлены в основном интродуцированными клонами из Франции и Италии. Значительная часть сортов не в достаточной степени адаптирована к почвенно-климатическим условиям мест возделывания. В связи с этим актуальной остается селекция винограда на повышение экологической

пластичности, устойчивости к абиотическим и биотическим стресс-факторам, получение адаптированных к местным условиям, высокоурожайных сортов для разного направления использования.

Очевидно, что на современном этапе развития садоводства и виноградарства, в условиях возрастающей конкуренции, а также тенденций по экологизации производства, возрастает важность сорта как главного элемента сельскохозяйственного производства. В связи с этим существенно усиливается потребность в сортах плодовых культур и винограда, обладающих наиболее полным комплексом хозяйственно-ценных и адаптивно-значимых признаков, включая продуктивность, технологичность, отзывчивость на агротехнические мероприятия включая элементы питания растений, устойчивость к абиотическим и биотическим стрессовым факторам среды и повышенные потребительские характеристики плодов и получаемой из них продукции. Все это обуславливает актуальность поставленных задач, которые состояли в следующем:

- сохранить генофонд плодовых культур, винограда с целью выделения доноров и источников хозяйственно-ценных признаков и создания новых сортов, сочетающих высокую потенциальную адаптивность, продуктивность и качество плодов;

- выделить доноры и источники значимых признаков с рекомендациями по их использованию в селекционных программах, а также выполнить исследования по разработке и усовершенствованию методов фенотипической оценки для выявления селекционных форм с повышенным уровнем адаптивности;

- выделить элитные плодовых культур, винограда, совмещающие комплекс хозяйственно-ценных признаков, на основе применения методов фенотипической генотипической оценки гибридного материала;

- создать сорта плодовых культур, винограда, перспективные для совершенствования регионального сортимента по итогам госсортоиспытания.

1.2 Объекты, методы, методики и условия проведения исследований

Объекты исследований – сорта, подвои, виды, гибриды и клоны плодовых, ягодных культур и винограда, полученные в результате применения различных методов селекции.

НИР проводится в полевых и лабораторных условиях в ФГБНУ СКФНЦСВВ: в центре коллективного пользования «Исследовательско-селекционная коллекция генетических ресурсов садовых культур» (ЦКП ИСК ГРСК), в АЗОСВиВ – филиале ФГБНУ СКФНЦСВВ, лаборатории сортоизучения и селекции садовых культур, лаборатории сортоизучения и селекции косточковых культур, сортоизучения и селекции винограда, лаборатории вирусологии, селекционно-биотехнологической лаборатории, лаборатории питомниководства, лаборатории управления воспроизводством в ампелоценозах и экосистемах, лаборатории биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов, лаборатории физиологии и биохимии растений, лаборатории переработки и хранения плодов.

Сады сортоизучения яблони 1998-2021 гг. посадки; подвой М9, а также корнесобственные сеянцы и привитые в крону. Схемы посадки 5×2; 5×1,5; 4×1 м. Кварталы 8, 11, 12, 17, 18, 20, 22, 23 (без орошения); квартал 25 (на орошении).

Сады сортоизучения груши 2007–2019 гг. посадки, находятся на 2 отделении ОПХ «Центральное»; подвой – груша кавказская, айва ВА-29, а также корнесобственные сеянцы и привитые в крону сорта и формы; схема посадки: 5×2; 4×1; кв. 26, 6, 17 (без орошения).

Сады сортоизучения айвы 2007-2019 гг. посадки находятся на 2 отделении ОПХ «Центральное»; подвой дикая айва, а также корнесобственные сеянцы и привитые в крону сорта; схема посадки: 5×2, 4×1; кв. 6а, 17 (без орошения).

Сортоизучение сливы проводилось в коллекционном саду, квартал 11 на площади 0,5 га и производственных садах на площади более 20 га; схемы посадки – 7х4 м, 7х5 м, 6х4 м, 6х5 м.

Сад сортоизучения черешни и вишни – кв. 12; схемы посадки – 8х6 м, 8х5 м; подвой – сеянцы дикой черешни, антипки; система формирования деревьев – разреженно-ярусная.

Сортоизучение винограда: Кусты элитных и отборных форм винограда произрастают и изучаются в условиях Анапской ампелографической коллекции (г. Анапа) в корнесобственной культуре. Год посадки — 2008, схема посадки 3х1 м, формировка — двуплечий высокоштамбовый кордон.

Отборные и элитные формы винограда 2020-2021 года посадки изучаются в условиях вегетационной площадки СКФНЦСВВ (г. Краснодар), схема посадки элитных форм — 2х1 м, отборных форм — 2х0,5 м; элитные формы представлены корнесобственными и привитыми кустами, отборные формы – корнесобственные сеянцы.

Территория, на которой проводились полевые исследования, находится в центральной подзоне прикубанской зоны садоводства, расположенной в южной части западно – предкавказской равнины (30–35 метров над уровнем моря), поверхность которой пологоволнистая с впадинами и ложинами, пересекающими подзону с запада на восток.

Почвообразующими породами являются лессовидные легкие глины, почвенный покров представлен в разной степени выщелоченными предкавказскими черноземами. Небольшое распространение имеют луговочерноземные уплотненные слабовыщелоченные почвы. Содержание гумуса – до 3,5 %. Агрофизические и агрохимические свойства почвы на опытных участках являются благоприятными для изучаемых культур.

Природные условия зоны благоприятны для развития плодоводства. Отрицательными факторами для произрастания плодовых культур в этой зоне являются возможные морозы до минус 37 °С, резкие колебания температуры в зимние и ранневесенние месяцы, весенние заморозки, ранние осенние морозы, засуха, неустойчивый режим естественного увлажнения, неравномерно распределение осадков в течение вегетации. Характерны сильные годовые колебания температуры. Амплитуда колебания

температуры в течение года возможна в пределах от минус 37 °С до + 40 °С. Среднегодовое количество осадков от 630 до 760 мм. Средняя годовая температура составляет 10,4 – 10,8 °С. Зима с частыми, порой продолжительными оттепелями. Снеговой покров неустойчив. Лето жаркое, сухое. Среднегодовая сумма активных температур воздуха выше + 10 °С составляет 3300–3600 °С, длительность безморозного периода 185–195 дней.

В селекционной работе использованы усовершенствованный метод полиплоидии, а также классические методы: отдаленная межвидовая и географически отдаленная гибридизация, повторная гибридизация, инбридинг, мутагенез. Применяются методы ускорения и интенсификации селекционного процесса: отбор гибридных сеянцев в школке по морфологическим признакам, отбор на искусственном инфекционном фоне на иммунитет (ген *Rvi6*) к парше (совместно с ВНИИСПК), совмещение во времени и пространстве первичного и конкурсного, конкурсного и государственного сортоиспытания.

В работе использовали лабораторные и полевые методы исследования. НИР проводили согласно программам и методикам как общепринятым, так и разработанным с участием ответственных исполнителей:

- Программа Северо-Кавказского центра по селекции плодовых, ягодных, цветочно-декоративных культур и винограда на период до 2030 года – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ [23];
- Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве, Краснодар [24];
- Методическое и аналитическое обеспечение исследований по садоводству. – Краснодар [25];
- «Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур» – Орел [26];
- «Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур» – Орел [27];

- Методика опытного дела и методические рекомендации Северо-Кавказского зонального НИИ садоводства и виноградарства – Краснодар [28];
- Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Яблоня. RTG/0014/2 // http://www.gossort.com/mtd_dus.html [Электронный ресурс]. – 2010 [29];
- Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Айва. RTG/0100/2 // http://www.gossort.com/mtd_dus.html [Электронный ресурс]. – [30];
- Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Груша. RTG/0015/2 // http://www.gossort.com/mtd_dus.html [Электронный ресурс]. – [31].

Расходные материалы, реактивы и материалы, не являющиеся амортизируемым имуществом, использованные в ходе выполнения НИР, включая приобретенные за счет средств гранта.

Расходные и другие материалы для работ, связанных с выполнением фенотипической оценки селекционного материала плодовых культур и винограда, учетом, их сохранением и размножением (подвязочный материал, прививочная лента, марля, полотно нетканое, канцтовары; ящики для хранения плодов разного объема, садовый инвентарь и инструменты и др.).

1.3 Результаты исследований

1.3.1 Селекция и сортоизучение семечковых культур

Яблоня

Ускорить и увеличить эффективность селекционной работы по плодовым культурам возможно за счет мобилизации, сбора, сохранения и изучения генетической коллекции, выделения доноров и источников ценных признаков и активном использовании их в дальнейших селекционных исследованиях.

Значительное усиление в последнее время частоты и силы негативного воздействия на плодовое растение абиотических стресс-факторов среды

(засуха, высокие температуры воздуха и почвы, неустойчивый режим увлажнения, повреждающие факторы зимнего периода, весенние заморозки) позволяет вести отбор по устойчивости и адаптивности изучаемых сортов и форм. В то же время агроклиматические условия Северо-Кавказского региона России в целом достаточно благоприятны для роста, развития и плодоношения растений яблони и способствуют возникновению и дальнейшему селекционному отбору по данным полевых и лабораторных исследований наиболее перспективных по целевым хозяйственным признакам генотипов.

По данным многолетних исследований выделены 2 источника ценных хозяйственных признаков яблони: 1 источник крупноплодности и высоких вкусовых достоинств плодов – элитная форма 12/3-21-27 и 1 источник ярко-красной окраски и высоких вкусовых достоинств плодов – элитная форма 12/1-20-34 (рис. 1).

Элитная форма 12/3-21-27 (из семьи Айдаред х Балсгард 0247Е) получена в СКФНЦСВВ совместно с ВНИИСПК на основе усовершенствованного метода полиплоидии. Срок созревания позднеосенний.

Дерево сдержанного роста, крона округлая, компактная, удобная для уборки. Тип плодоношения смешанный. Вступает в плодоношение на 2-й год после посадки (на М9, СК2), быстро наращивает урожайность в молодом возрасте. Плодоношение регулярное. Триплоид ($2n=3x$). В связи с низкой жизнеспособностью пыльцы является плохим опылителем.

Плоды крупные (средняя масса 279,9 г) (рис. 2), одномерные, округлые, с ярким красным румянцем по большей части плода, очень сочные, десертного вкуса (4,7-4,8 балла), с нежным ароматом. Съемная зрелость плодов наступает в начале сентября. В холодильнике плоды сохраняются в течении 2-3 месяцев. Транспортабельность плодов хорошая.



12/3-21-27



12/1-20-34

Рисунок 1 – Источники ценных хозяйственных признаков яблони

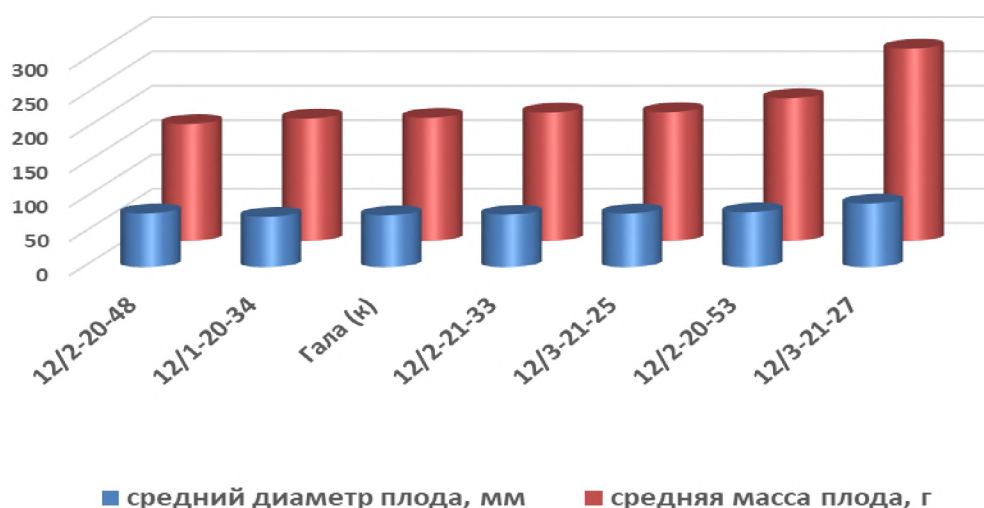


Рисунок 2 – Средняя масса и диаметр плода элитных форм яблони селекции СКФНЦСВВ совместно с ВНИИСПК, среднее за 2019-2021 гг.

Элитная форма имеет ген иммунитета к парше *Rvi6*, высокую полевую устойчивость к мучнистой росе. Засухо- и морозоустойчива. Пригодна к интенсивным технологиям возделывания.

Основные достоинства: иммунитет к парше, морозо- и засухоустойчивость, скороплодность, крупноплодность и высокие вкусовые качества плодов. Недостатки сорта: в связи с низкой жизнеспособностью пыльцы является плохим опылителем для других сортов яблони.

Элитная форма 12/1-20-34 (из семьи Делишес х Балсгард 0247Е) получена в СКФНЦСВВ совместно с ВНИИСПК на основе усовершенствованного метода полиплоидии. Срок созревания осенний. Диплоид ($2n=2x$). Дерево среднерослое, крона округлая, раскидистая, средней густоты. Тип плодоношения смешанный. Цветение обильное, в средние сроки. Жизнеспособность пыльцы варьирует по годам в пределах 62-78 %.

Имеет иммунитет к парше (ген *Rvi6*), прошла отбор на искусственном инфекционном фоне во ВНИИСПК (г. Орел), в дальнейшем наличие искомого гена подтверждено данными ДНК-анализа (селекционно-биотехнологическая лаборатория СКФНЦСВВ, рук. Токмаков С.В.).

Элитная форма имеет высокую полевую устойчивость к мучнистой росе, устойчивость к засухе, скороплодна (вступает в плодоношение на 2-й год после посадки), обладает высокой и стабильной продуктивностью (до 28-36 т/га на подвое М9 при схеме 5х1,5). Плоды выше среднего размера (средняя масса 178,6 г), эффектной ярко-красной сплошной окраски, одномерные, с высокой оценкой внешнего вида и вкусовых достоинств (оценка внешнего вида свежих плодов – 4,7-4,8 балла; дегустационная оценка вкуса плодов – 4,7 балла).

Основные достоинства: иммунитет к парше, засухоустойчивость, скороплодность, интенсивная красная покровная окраска и высокие вкусовые качества плодов. Недостатки сорта: средний рост дерева, раскидистая крона.

В настоящее время активное привлечение в селекционный процесс всего имеющегося видового, межвидового и сортового разнообразия, новых доноров и генетических источников биологически и хозяйственно значимых признаков позволяет значительно ускорить селекцию плодовых растений, в том числе яблони. При подборе исходных форм для дальнейшей гибридизации большое значение имеет выбор родителей, не только имеющих высокий уровень ценных признаков, но и успешно передающих значимые признаки

большей части гибридного потомства. Для ускоренного отбора доноров иммунитета к парше перспективно использование метода ДНК-маркирования.

Комплексная совместная работа селекционеров, генетиков и фитопатологов позволила выделить донор иммунитета к парше (прошел отбор на искусственном инфекционном фоне (во ВНИИСПК, г. Орел) – имеет ген *Rvi6*, что подтверждено в дальнейшем данными ДНК-анализа (селекционно-биотехнологическая лаборатория СКФНЦСВВ, рук. Токмаков С.В.) – элитная форма 12/3-21-25 из семьи Голден Делишес тетраплоидный х 2034 (F2 *M. floribunda* х Голден Делишес) – скороплодная, засухоустойчивая, с округло-коническими плодами чисто желтой окраски, хороших вкусовых достоинств, зимнего срока созревания (рис. 3).



Рисунок 3 – Донор иммунитета к парше – элитная форма яблони 12/3-21-25

Донор иммунитета к парше 12/3-21-25 получен в СКФНЦСВВ совместно с ВНИИСПК от скрещивания. Диплоид ($2n=2x$). Дерево сдержанного роста, крона округлая, компактная, достаточно густая, хорошо облиственная. Тип плодоношения смешанный.

Плоды вышесреднего размера и крупные (средняя масса 187,8 г, максимальная 208,4 г), одномерные, округло-конической формы, с гладкой кожицей. Основная окраска плода зеленовато-желтая, покровная – отсутствует. Подкожных точек мало, они мелкие, серые, слабозаметные.

Мякоть кремовая, сочная, ароматная, десертного кисло-сладкого вкуса (4,6 балла). Съемная зрелость плодов наступает в третьей декаде сентября. Плоды хорошо хранятся, используются в свежем виде. Транспортабельность высокая.

Донор имеет ген иммунитета к парше *Rvi6*, обладает устойчивостью к мучнистой росе, засухоустойчив. В плодоношение на подвое М9 вступает на 2-3-й год после посадки. Урожайность высокая, до 35-42 т/га.

Пригоден к интенсивным технологиям возделывания. Рекомендуются для детского и диетического питания, так как имеет светлоокрашенные плоды и обладает устойчивостью к основным грибным заболеваниям.

Основные достоинства: совмещение иммунитета к парше, устойчивости к мучнистой росе, чисто желтой окраски плодов. Недостатки сорта: молодые деревья требуют прореживания завязи и летней обрезки.

В отчетном году в процессе изучения генетического потенциала селекционных форм яблони выделена элитная форма селекции СКФНЦСВВ совместно с ВНИИСПК, превышающая стандартные сорта по комплексу хозяйственно ценных и адаптивно значимых признаков и свойств: 12/2-21-33, полученная усовершенствованным методом полиплоидии (рис. 4).

Элитная форма 12/2-21-33 (Айдаред х Балсгард 0247Е) осеннего срока созревания. Дерево сдержанного роста, крона плоскоокруглая. Тип плодоношения смешанный.



Рисунок 4 – Элитная форма яблони 12/2-21-33 (Айдаред х Балсгард 0247Е)

Вступает в плодоношение на 2-3-й год после посадки (на М9, СК2), быстро наращивает урожайность в молодом возрасте. Цветение в средние сроки, обильное. Средняя урожайность 25,9 т/га, максимальная до 39,3 т/га (на подвое М9 при схеме посадки 5х1,5). Диплоид ($2n=2x$).

Плоды выше среднего размера и крупные (массой 187,2-230,6 г), плоскоокруглой формы, с интенсивной темно-бордовой покровной окраской по всей или по большей части плода, сочные, десертного вкуса (4,5-4,7 балла), с нежным ароматом. Химический состав плодов: сухих веществ – 12,4 %, сахаров – 8,7 %, титруемых кислот – 0,28 %, сахарокислотный индекс – 31,0, витамина С – 4,4 мг/100 г, витамина Р – 76,0 мг/100 г. Съемная зрелость плодов наступает в начале сентября. В холодильнике плоды сохраняются в течении 2-3 месяцев. Транспортабельность плодов хорошая.

Элитная форма имеет ген иммунитета к парше *Rvi6*, высокую полевую устойчивость к мучнистой росе. Засухо- и морозоустойчива в условиях Краснодарского и Ставропольского края, республики Северная Осетия-Алания. Пригодна к интенсивным технологиям возделывания.

Основные достоинства: иммунитет к парше, морозо- и засухоустойчивость, скороплодность, интенсивная, сплошная темно-бордовая окраска плодов. Недостатки сорта: срок хранения свежих плодов до 2-3 месяцев.

В отчетном году подготовлены и переданы в ГСИ материалы на зимний иммунный к парше сорт яблони Стасовское совместной селекции СКФНЦСВВ и Ставропольской ОСС.

Сорт яблони Стасовское (Либерти х Голден Делишес) – зимнего срока созревания (рис. 5). Авторы: Ермоленко В.Г., Красько М.А., Заерко Т.А., Пучкина Л.А., Ульяновская Е.В., Причко Т.Г.



Рисунок 5 – Новый зимний сорт яблони Стасовское

Дерево среднерослое, крона округлая, средней густоты. Тип плодоношения смешанный. Цветение обильное, в средние сроки.

Сорт Стасовское имеет иммунитет к парше (ген *Rvi6* по данным ДНК-анализа, выполненном в селекционно-биотехнологической лаборатории, рук. Токмаков С.В.). По данным многолетних исследований сорт имеет высокую полевую устойчивость к мучнистой росе, повышенную засухо- и морозоустойчивость. Скороплоден, на подвое СК2 вступает в плодоношение на 3-й год после посадки, быстро наращивает урожайность в молодом возрасте. Урожай высокий – до 40 т/га (табл. 1).

Таблица 1 – Средняя и суммарная урожайность иммунных к парше сортов яблони, т/га (подвой СК2, схема посадки 5х2 м; год посадки 2012)

Сорт	Урожайность, т/га								
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	суммарная	средняя
Геоργия	4,8	13,6	19,5	27,8	44,7	15,2	55,2	180,8	25,8
Заря Ставрополя	9,1	18,0	24,5	18,3	30,9	22,2	56,7	179,7	25,7
Стасовское	4,1	12,1	14,7	32,9	31,8	18,1	40,0	153,7	22,0
Либерти (к)	8,0	18,0	15,0	25,0	25,0	15,0	36,4	142,4	20,3
НСР ₀₅	0,94	1,06	1,31	1,51	1,65	1,11	1,94	2,62	0,99

Плоды крупные (средняя масса плода 202 г, максимальная – 265 г (табл. 2), продолговатой формы, одномерные, с интенсивным малиновым румянцем по всему или по большей части плода (оценка внешнего вида плодов 4,8-4,9 балла), отличного кисло-сладкого вкуса (дегустационная оценка вкуса 4,7-4,8 балла); в хранении до конца февраля. Транспортабельность высокая.

Химический состав плодов: сухих веществ – 16,5 %, сахаров – 11,6 %, титруемых кислот – 0,71 %, сахаро-кислотный индекс – 16,34, витамина С – 7,6 мг/100 г, витамина Р – 106,0 мг/100 г.

Таблица 2 – Группировка сортов и элитных форм яблони по средней массе плода, среднее за 2019-2021 гг.

Сорт	Градация по размеру плодов	Средняя масса плода, г
Джесима, Красный янтарь, Пинк Леди, Пинова, Рассвет, Редфри, Фея, Эрли Мак	средние	111-150
Гала, Либерти, Любимое Дутовой, Новелла, Орион, Прима, Чемпион	выше среднего размера	151-200
Азимут, Василиса, Геоργия, Золотая корона, Кармен, Стасовское, Флорина	крупные	201-250
Джин, Любава, Прикубанское, Родничок, Союз	очень крупные	251-350
Персиковое, Талисман	исключительно крупные	более 350

Основные достоинства нового сорта: совмещение иммунитета к парше, повышенной морозо- и засухоустойчивости в условиях Краснодарского и Ставропольского края, скороплодность, высокое качество плодов (в том числе: востребованная потребителями продолговатая форма, интенсивная темно-малиновая сплошная покровная окраска, высокие вкусовые достоинства, длительный срок хранения).

Груша.

Груша – ценная плодовая культура. Плоды ее отличаются высокими вкусовыми качествами. Они пригодны для употребления в свежем виде и для переработки, обладают диетическими и лечебными свойствами, пользуются широким спросом у населения. Груша возделывается во многих странах с мягким климатом.

В настоящее время в России промышленное садоводство наиболее развито в трех природно-экономических районах: Северо-Кавказском, Центрально-Черноземном и Поволжском, где производится 83 % общего объема плодовой продукции страны.

По природным условиям Краснодарский край – это один из наиболее благоприятных районов для возделывания груши. Здесь произрастает более половины всех насаждений культур груши и айвы. Сравнительно мягкая зима, большие запасы тепла, достаточное количество осадков и благоприятные почвенные условия региона позволяют возделывать в промышленных масштабах особо ценные сорта груши различных сроков созревания. Большая роль здесь отводится фермерским и подсобным хозяйствам, на долю которых приходится 50 % от общего объема производства плодов груши.

Основной причиной слабого распространения груши является отсутствие сортов, сочетающих в генотипе достаточную зимостойкость и засухоустойчивость с высокими вкусовыми качествами и устойчивостью к основным болезням раннелетнего и позднезимнего сроков созревания плодов. Проблемы улучшения сортимента груши решаются с помощью пополнения местными и зарубежными сортами, а также частично клоновой селекцией.

Важным условием является создание сортов с высокой адаптацией к конкретным условиям произрастания. В последнее время большое внимание уделяется повышению качества плодов. Новые сорта должны обладать плодами высоких вкусовых и технических качеств, способных к длительному хранению в свежем виде. Подбор лучших сортов, соответствующих специфическим экологическим условиям, является одним из основных требований интенсификации садоводства.

Сортимент груши в целом подчинен задаче производства плодов для потребления в свежем виде, хранения и переработки. Главной задачей современного садоводства является обеспечение населения высококачественной продукцией. Вкус, величина и внешний вид определяют товарные и потребительские качества плодов.

Современные интенсивные технологии производства плодов должны быть адаптированы к природно-климатическим условиям зон возделывания, обеспечивать стабильность плодоношения, оптимальную урожайность, высокое качество плодов. В существующем сортименте недостаточно сортов раннелетнего и позднезимнего сроков созревания плодов.

Продуктивность – один из показателей адаптивности сорта к условиям произрастания. Она определяется биологическими особенностями сорта и состоянием деревьев, которое в свою очередь, зависит от погодных условий, условий произрастания и уровня агротехники. Внешние климатические факторы (температура, осадки), воздействующие на плодовые растения груши в основные фазы вегетации, оказывают существенное влияние и на урожай.

Груша является ежегодно плодоносящей культурой, ей не присуща резкая периодичность и варьирование урожайности по годам связано, в основном, с неблагоприятными погодными условиями в период закладки цветковых почек, перезимовки деревьев или же зачастую в период цветения.

По результатам селекционных исследований выделен сорт Июльская ранняя как источник высокой продуктивности, который обладает

устойчивостью цветков к заморозкам и в экстремальных условиях не снижает урожайности (табл. 3).

Таблица 3 – Оценка продуктивности сортов груши (ОПХ «Центральное»)

Сорт	Цветение, балл	Урожайность, кг/дер.		
		2020 г.	2021 г.	средняя 2020-2021 гг.
Аббат Фетель	4,0	4,0	5,5	4,8
Вербена	3,5	4,0	7,0	5,5
Джанкойская поздняя	2,0	6,3	7,7	7,0
Дево	5,0	15,0	8,5	11,8
Зимняя млиевская	4,3	11,0	8,5	9,8
Июльская ранняя	4,0	13,0	20,0	16,5
Красуля	5,0	8,5	10,0	9,2
Кубанская сочная	5,0	15,0	8,5	11,8
Люберская (к)	4,0	16,0	15,0	15,5
Миф	1,0	3,0	0,5	1,8
Ника	4,6	4,7	10,6	7,6
Самаркандская зимняя	0	0	0	0
Славянка	3,0	4,8	7,0	5,9

Июльская ранняя – раннелетний сорт, выведен в Северо-Кавказском зональном НИИ садоводства и виноградарства (происхождение неизвестно). Деревья среднерослые, с широкоовальной кроной средней густоты. Ветви прямые, отходят от ствола под углом, близким к прямому, прямые, направлены вверх. Побеги средние, прямые, ровные, коричневато-бурые.

Плоды средние, масса 120 г, бутылочной формы, одномерные. Кожица гладкая, нежная, окраска в момент съемной зрелости желтовато-зеленая, при созревании лимонно-желтая, с ярким румянцем на освещенной стороне. Мякоть белая, нежная, сочная, кисловато-сладкая, хорошего вкуса. Дегустационная оценка 4,0-4,3 балла. Съемная зрелость плодов наступает 10-15 июля, лежкость 10 дней. Транспортабельность хорошая.

В пору плодоношения деревья вступают на 6 год после посадки в сад. Плодоношение ежегодное, средняя урожайность в центральной части Кубани в возрасте 12-17 лет 180-200 ц/га. Засухоустойчивость и зимостойкость высокие (рис. 6).



Рисунок 6 – Сорт груши Июльская ранняя – источник высокой продуктивности

Айва.

В интенсификации садоводства большая роль принадлежит скороплодным и урожайным плодовым культурам, к которым относится айва. Айву выращивают в Средиземноморье, в Европе, Северной и Южной Америке, Австралии и некоторых районах африканского континента. Она встречается в Крыму, на Украине, Северном Кавказе, в Средней Азии. Ее культивируют более чем в 40 странах земного шара в зонах умеренного, теплого и субтропического климата, в которых морозы – большая редкость.

В Краснодарском крае айва растет очень давно, но площади, занятые под этой культурой, незначительные и не имеют товарного значения. Однако, в экономическом отношении это одна из выгодных плодовых пород и нельзя признать положительным уменьшение ее насаждений, в то время как в Краснодарском крае многие районы благоприятны для выращивания этой культуры.

Районированный сортимент айвы Краснодарского края бедный, сложился достаточно давно и частично уже не отвечает требованиям промышленного производства. Современное развитие садоводства требует наличия новых сортов с удобной для ухода и сбора урожая кроной, ранним

вступлением в пору плодоношения, зимостойких, с высокой урожайностью, устойчивостью к вредителям и болезням, с хорошими товарными и технологическими качествами плодов, с длительным сроком их хранения.

Основной целью исследований по айве являлось изучение по основным биологическим и хозяйственным признакам коллекционного и гибридного фонда айвы и выделение для пополнения районированного сортимента края высокоурожайных, зимостойких сортов айвы с плодами крупных размеров (300 г), консервного назначения, обладающих экологической пластичностью и устойчивостью к болезням и вредителям, с повышенной лежкостью плодов и другими потребительскими качествами.

В результате исследовательской работы выделена элитная форма айвы 3-21-2 (рис. 7) для дальнейшего углубленного изучения по основным хозяйственно-ценным признакам: продуктивности, технологическим и товарным качествам плодов и устойчивости к монилиозу.

Элитная форма айвы 3-21-2 (Кубанская св. оп.) – дерево среднерослое, плоскоокруглое; облиственность средняя. Угол отхождения основных ветвей около 45°. Штамб темно-коричневого цвета. Однолетние побеги средней толщины, прямые зеленовато-бурые; почки прижатые. Плоды среднего и крупного размера (300 г), округлой формы, опушенные, (при созревании опушение исчезает), съемная зрелость наступает в первой декаде октября, плоды хранятся 2-2,5 месяца. В плодоношение вступает на 4-5 год.



Рисунок 7 – Элитная форма айвы 3-21-2

Айва, как скороплодная, регулярно плодоносящая и ценная для переработки культура, должна занять соответствующее ей место в промышленных садах Краснодарского края.

Новые продуктивные сорта груши и айвы с более качественными плодами, устойчивые к основным болезням и вредителям обеспечат значительное увеличение урожайности данных культур и повысят уровень их рентабельности.

1.3.2 Селекция и сортоизучение косточковых культур

Черешня. В результате проведения исследований в отчетном году выделен 1 источник зимостойкости и 1 элитная форма 2-13 черешни.

В качестве источника зимостойкости выделен сорт черешни Алая (рис. 8) селекции СКФНЦСВВ (автор Алехина Е.М., Причко Т.Г.). Сорт получен от посева семян сорта Мелитопольская чёрная свободного опыления. Сорт включен в Государственный реестр селекционных достижений по Северо-Кавказскому региону.

Сорт проявляет устойчивость к низким температурам в период покоя, а также к возвратным весенним заморозкам. В 2021 году при понижении температуры в период покоя до $-16,5$ – $-17,5$ °C (20.01) гибель плодовых почек составила – 3,0 % (максимальная гибель отмечена у ранних сортов до 37,0 %), подмерзание плодовых почек при $-14,0$ – $-15,0$ °C (23-25.02) – у сорта Алая

составило – 5,7 % (у отдельных сортов повреждение генеративных органов составляло 30 %), таким образом, сорт устойчив к низким температурам в зимний период и слабо реагирует на понижение в период вынужденного покоя в конце зимы.

В прошлом 2020 г. проявление стрессоров пришлось на весенний период: II декада марта и II декада апреля, что вызвало подмерзание плодовых почек у всех сортов черешни. У сорта Алая после заморозка в марте (16.03.20 г.; –3,0–5,0 °C) в фазу «выдвижение соцветий» подмерзание было 45 %, у отдельных сортов доходило до 90-100 %. В апреле (14.04.20 г.; –1,7–2,7 °C), у сорта Алая в фазу «раздвижение чешуй» составило 90 %, у большей части составляло 100,0 %, что позволяет характеризовать его как устойчивый к возвратным заморозкам сорт.

Дерево средней силы роста с шаровидной приподнятой кроной средней густоты. Лист крупный, тёмно-зеленый, обратнояйцевидный. Плоды крупные (средняя масса плода 8,0 г, максимальная – 10,0 г), широко-округлые, основная окраска красная, покровная – ярко-красная. Мякоть розовая, плотная, сочная. Вкусовые качества высокие (4,8 балла). Плоды высокой товарности, пригодны для производства компотов, цукатов и замораживания.



Рисунок 8 – Источник зимостойкости сорт черешни Алая

Биохимический состав плодов: 21,5 % сухого вещества, 14,0 % сахаров, 0,7 % кислот, 6,0 мг/100 г витамина С, 88,6 мг/100 г витамина Р, 79,7 мг/100 г антоциана.

Срок созревания поздний. В условиях Кубани съемная зрелость наступает в III декаде июня - I декаде июля. Транспортабельность хорошая.

Опылители: Мак, Крупноплодная, Южная, Контрастная.

Сорт проявляет достаточную устойчивость к основным грибным болезням. Урожайность высокая в годы с благоприятными погодно-климатическими факторами может составлять 55,0-60,0 кг с дерева или 23,0-25,0 т/га.

Достоинства: крупноплодность, высокая урожайность, адаптивность и качество плодов. Недостатки: светлая мякоть плодов.

Выделение элитных сеянцев черешни – является одной из задач селекционной программы для создания новых генотипов и совершенствования существующего сортимента. В 2021 году выделен элитный сеянец 2-13 (рис. 9).

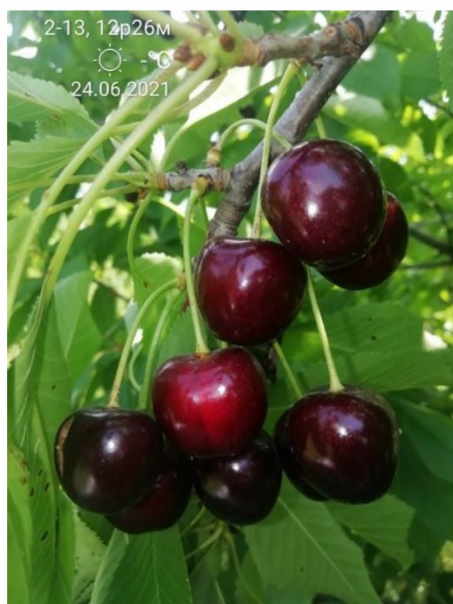


Рисунок 9 – Элитный сеянец черешни 2-13

Элитный сеянец черешни 2-13. Сеянец получен традиционным методом селекции – межсортная гибридизация, исходные формы неизвестны.

Дерево среднерослое, с шаровидной кроной, средней густоты. Лист выше среднего размера, зеленый, яйцевидной формы, черешок длинный.

Созревание в условиях Краснодарского края – позднее, третья декада июня.

Плоды крупные – средний размер составляет 7,0-7,5 г, максимальный размер может достигать 8,5 г, плотные, эффектные, одномерные. Форма плода – широкосердцевидная, форма верхушки плода – слабовдавленная, окраска плода – тёмно-рубиновая, мякоть – тёмно-красная, сочная, высоких вкусовых достоинств – 4,7 балла. Плоды отличаются высокой товарностью, достаточно транспортабельные, пригодны для потребления в свежем виде и производства компотов и цукатов.

Биохимический состав плодов: 16,5 % сухих веществ, 10,5 % сахаров, 0,9 % кислот, 8,5 мг/100 г витамина С, 75,0 мг/100 г витамина Р, 190,0 мг/100 г антоцианов. Зимостойкость высокая. Устойчив к грибным заболеваниям. Урожайность достаточно высокая до 25,0-30,0 кг с дерева или 10,4-12,4 т/га.

Достоинства: крупноплодность, высокие вкусовые качества. Недостатки: сильнорослость.

Вишня. В результате исследования выделены 1 источник крупноплодности и 1 устойчивости к класстероспориозу вишни.

Выделен источник крупноплодности сорт Чудо-вишня (рис. 10). Сорт создан на Артемовской опытной станции садоводства (Украина), от скрещивания сортов вишни Гриот Остгеймский и черешни Валерий Чкалов. Автор: Л.И. Тараненко.



Рисунок 10 – Источник крупноплодности сорт – Чудо-вишня

Дерево среднерослое, с округлой, средне загущенной кроной.

Плоды очень крупные (8-9 г), темно-красные, слегка сплюснены. Кожица темно-красная, сравнительно плотная, блестящая. Мякоть темно-красная, сочная, с приятной кислотой вишневого вкуса (4,8 балла), сок красный. Плоды предназначены как для употребления в свежем виде, так и для приготовления консервов. Раннего срока созревания. Съемная зрелость наступает в первой декаде июня. Сорт самобесплодный. В результате исследований установлено, что средняя масса плодов данного сорта в 2021 году составила 6,81 г, минимальная масса плода была в пределах 5,69 г.

Опылители: сорта вишни – Игрушка, Шалунья, черешни – Василиса, Донецкая красавица.

Зимостойкость – средняя, засухоустойчивость высокая. Сорт устойчив к основным грибным болезням. Урожайность выше средней.

Достоинства: крупноплодность, ранний срок созревания, высокие вкусовые качества плодов. Недостатки: недостаточная зимостойкость.

Устойчивость к доминирующим грибным болезням – важный признак, которым должен обладать сорт. Данных об устойчивости к основным болезням сортов вишни на сегодня недостаточно, в частности по клястероспориозу, в связи с чем была проведена полевая оценка сортов вишни по этому показателю. В результате оценки выявлено увеличение вредоносности коккомикоза и клястероспориоза, сопряженное с учащением воздействия комплекса стрессов на растения вишни разных сортов, а также значительную зависимость степени поражения от стрессовых условий конкретного года, позволившее выделить источник устойчивости к такому распространенному заболеванию косточковых культур, как клястероспориоз.

В результате оценки сортов вишни определено, что в 2020-2021 гг. поражение клястероспориозом в пределах 1-2 баллов имели сорта: Краснодарская сладкая, Фанал, Тимати, Призвание, и др. (таблица 4). Поражение в пределах одного балла имели сорта Азлания, Джуси Фрут и Фея. Таким образом в качестве источника устойчивости к клястероспориозу выделен сорт вишни обыкновенной – Джуси Фрут.

Таблица 4 – Степень поражения сортов вишни клястероспориозом, ОПХ «Центральное», 2020 – 2021 гг.

Сорт	Балл поражения		Максимальный балл
	2020 г	2021 г	
Краснодарская сладкая (к)	1,0	2,0	2,0
Фанал	2,0	2,0	2,0
Нефрис	1,0	2,0	1,0
Тимати	1,0	2,0	2,0
Фея	0,0	1,0	1,0
Заклания	0,0	1,0	1,0
Призвание	1,0	2,0	2,0
Джуси Фрут	0,0	1,0	1,0
Среднее	0,8	1,6	–

Выделен источник устойчивости к клястероспориозу – сорт Джуси Фрут (рисунок 11), поражение которого клястероспориозом в течение 5 последних лет не превышало 1 балла. Родительские формы данного сорта неизвестны.



Рисунок 11 – Источник устойчивости к клястероспориозу сорт Джуси Фрут

Дерево среднерослое, с округлой кроной. Среднего срока созревания. Засухоустойчивость высокая, устойчивость к основным болезням высокая.

Плоды красные, кисло-сладкие, округлые, мелкие массой 1,94 – 3,56 г. отрыв от плодоножки сухой. Биохимический состав плодов: растворимых сухих веществ – 18,8 %, сахаров – 8,9 %, кислот – 1,33 %, витамина С – 7,9 мг/100 г, витамина Р – 126,0 мг/100 г, антоцианов – 143,4 мг/100 г. Урожайность – низкая.

Слива домашняя. В результате проведения исследований в отчетном году выделен 1 источник слаборослости и 1 элитная форма 17-1-17.

Источник слаборослости сливы домашней – сорт Осенняя (рис. 12).



Рисунок 12 – Сорт сливы домашней Осенняя

Деревья слабой силы роста, с густой раскидистой кроной. Штамб темно-серого цвета, прямой. Побеги неоключенные, слегка опушенные, коричневого цвета; междоузлия средней длины (2,6-3,0 см). Вегетативные почки мелкие, слегка отклоненные, конусовидной формы, с заостренной верхушкой.

Листья средней величины (средняя длина 7,3 см, средняя ширина 5,2 см), зеленого цвета, яйцевидной формы, с заостренной верхушкой и тупым основанием; край листа окаймляет городчатая зазубренность, зубчики среднего размера. Листовая пластинка с глянцевой поверхностью, средневогнутая, с верхней стороны опушение отсутствует, нижняя сторона слабоопушенная. Черешки средней длины (до 1,7 см), зеленые со слабой антоциановой окраской. Железки среднего размера, сидячие, желто-зеленого цвета. Прилистники бледно-зеленого окраса, средней длины, ланцетовидной формы.

Цветки крупные, блюдцевидной формы. Лепестки крупные, яйцевидной формы, с округлой верхушкой и волнистыми краями, белой окраски, слегка сомкнутые, гофрированность отсутствует. Бутоны белые. Формирование плодовых образований происходит на букетных веточках и на прошлогоднем приросте.

Цветение проходит в средние сроки (2 декада апреля). Созревание плодов среднее – 2 декада августа. В плодоношение сорт вступает, на 4-5 год после посадки в сад. Сорт зимостойкий. Устойчивость к засухе средняя. Устойчивость к монилиозу и класстероспориозу средняя.

Плоды крупные (40-45 г); высота - 5,1 см, ширина – 4,1 см, толщина – 3,7 см, равнобокие, широкоовальной формы, с округлой верхушкой и слегка вытянутым основанием, темно-синего цвета с низким количеством подкожных точек белого окраса и слабым восковым налетом. Опушение и штрихи отсутствуют. Воронка средней глубины. Брюшной шов средний, выражен хорошо, не растрескивается. Плодоножки толщиной 0,25 см, длиной 1,7 см.

Косточки крупные (масса 1,7 г; 3,8 % от общего веса плода), удлинено-овальной формы (длина 3,2 см, ширина 1,5 см), с заостренной верхушкой и вытянутым основанием, светло-коричневой окраски, поверхность среднеямчато-бугорчатая. Отделяемость от мякоти средняя. Спинной шов среднеоткрытый. Центральное ребро выражено средне, боковые ребра хорошо заметны. Киль острый, размер – средний. Мякоть желтого цвета, плотная, ароматная, на вкус сладкая с небольшой кислинкой, сочность средняя. Дегустационная оценка вкусовых качеств сливы в свежем виде 4,7-4,8 балла. Биохимический состав плодов: сухие вещества – 15,0 %, сахара – 12,0 %, кислоты – 0,8 %, аскорбиновая кислота – 3,6 мг/100 г.

Урожайность средняя (12 т/га).

Элитная форма сливы домашней 17-1-17 (рис. 13). Деревья средней силы роста, с редкой кроной округлой формы. Штамб серого цвета, прямой. Побеги слабо околюченные, неопушенные, фиолетового цвета; междоузлия короткие (2,0-2,3 см). Вегетативные почки мелкие, прижатые, конусовидной формы, с округлой верхушкой.



Рисунок 13 – Элитная форма сливы 17-1-17

Листья средней величины (средняя длина 8,2 см, средняя ширина 5,1 см), ярко-зеленого цвета, эллиптической формы, угол вершины прямой, основание – выемчатое; надрезанность края листа городчатая, глубина надрезанности среднего размера. Листовая пластинка с глянцевой поверхностью, с верхней и нижней стороны опушение отсутствует. Черешки средней длины (до 1,5 см), зеленый со слабой антоциановой окраской. Железки мелкие, желто-зеленого цвета. Прилистники отсутствуют.

Цветки средние, блюдцевидной формы. Лепестки средние, округлой формы, с округлой верхушкой и ровными краями, белой окраски, слегка сомкнутые и гофрированные. Бутоны белые. Формирование плодовых образований происходит на букетных веточках и на прошлогоднем приросте.

Цветение проходит в средние сроки (2 декада апреля). Созревание плодов среднее – 3 декада августа. В плодоношение сорт вступает, на 5 год после посадки в сад. Зимостойкость и засухоустойчивость средняя. Устойчивость к монилиозу и клостероспориозу высокая.

Плоды средние (30-35 г); высота – 5,4 см, ширина – 3,2 см, толщина – 3,5 см, неравнобокие, яйцевидной формы, с вытянутой верхушкой и округлым основанием, красно-фиолетового цвета со средним количеством подкожных точек бурого окраса и густым восковым налетом. Опушение отсутствует. Воронка неглубокая, брюшной шов короткий, выражен слабо, не растрескивается. Плодоножки толщиной 0,3 см, длиной 2 см.

Косточка крупная (масса 1,2 г; 3,4 % от общего веса плода), овальной формы (длина 2,9 см, ширина 1,3 см), с тупой верхушкой и заостренным основанием, коричневой окраски, поверхность бугорчатая. Отделяемость от мякоти хорошая. Спинной шов среднеоткрытый. Центральное ребро выражено и боковые ребра хорошо заметны. Киль острый, по размеру – средний. Мякоть желто-зеленого цвета, волокнистой консистенции, ароматная, на вкус сладкая с легкой кислинкой, плотность средняя, сочность средняя. Дегустационная оценка вкусовых качеств сливы в свежем виде 4,7 балла. Биохимический состав плодов: сухие вещества – 20,4 %, сахара – 13,6 %, кислоты – 0,98 %, Р-элементы – 62,8 мг/100 г, аскорбиновая кислота – 3,9 мг/100 г.

Урожайность высокая (15-16 т/га при схеме посадки 4 х 2 м).

Подвой для мелкокосточковых культур ПМК СК 3

В СКФНЦСВВ создана большая коллекция отдаленных гибридов косточковых культур, полученных в результате селекции, направленной на иммунитет к коккомикозу. Среди полученных форм отобраны растения, которые в своем генотипе несут хозяйственно-ценные для подвоев качества, низкорослость, легкость в размножении как вегетативным путем, так и семенами.

По данным многолетних исследований выделена форма 3-106/ 3-107 (ПМК СК 1), которая начиная с 2006 года выделялась по устойчивости к коккомикозу и в полевых условиях (рис. 14) и при искусственном заражении. Данные последних лет так же подтвердили его высокую эффективность (табл. 5).



Рисунок 14 – Подвой ПМК СК 3 в условиях питомника «ОПХ им. К.А. Тимирязева»

Таблица 5 – Эффективность устойчивости к коккомикозу генотипов селекции СКФНЦСВВ косточковых культур, собранных в 2016-2021 гг.

Образец	Количество клонов	Распределение по баллам поражения					% авирулентных клонов
		00	11	22	33	44	
АИ-1 (контроль)	51	51	0	0	0	0	100
ПМК СК 3 (3-106)	51	51	0	0	0	0	100
Французская Черная (контроль)	55	0	0	3	12	40	3,6
Любская (контроль)	55	0	0	8	24	23	0

Все исследования по выделению устойчивых образцов проводятся с учетом внутривидовой изменчивости *Coccomyes hiemalis*.

В условиях Краснодарского края используется, разработанный совместно с ВИР набор сортов-дифференциаторов, защищенных разными аллелями генов (Ленивцева, Кузнецова 2011, Ленивцева, Кузнецова, Радченко,

2016) (табл. 6). Такие исследования позволяют выделять формы подвоев с долговременной устойчивостью. При проведении искусственного заражения ПМКСК 2 проявлял высокую эффективность устойчивости к болезни (100,0 %).

Для более точной оценки устойчивости генотипов к коккомикозу и для охвата более широкого разнообразия популяций коккомикоза постоянно проводятся многократные как по времени, так и по эколого-географическим местам – отборы зараженных *C. hiemalis* листьев на полях СКФНЦСВВ (Усть-Лабинский район; Краснодар; Горячий Ключ). Выделено не менее 50 монопустульных изолятов (клонов) гриба. При заражении использовались наиболее вирулентные клоны.

Таблица 6 – Устойчивость образцов-дифференциаторов черешни и вишни к клонам *C. hiemalis* с различными фенотипами вирулентности

Образец	Номер фенотипа вирулентности <i>C. hiemalis</i>					
	06	70	30	02	01	14
Сеянец № 1	R	S	S	R	R	S
Мутант 561	R	S	S	R	R	R
Алмаз	R	S	R	R	R	R
Кусумкент 8	R	R	R	R	S	R
Курильская Ветровое 11	S	R	R	S	R	R
Сахалинская БГ-35	S	R	R	R	R	S

Примечание: R – устойчивость образца, S – восприимчивость.

В результате такого подхода к оценке устойчивости доказано, что форма подвоя для мелкокосточковых ПМКСК 3 (3-106) проявляет долговременную устойчивость к коккомикозу и является источником этого признака.

Подвой низкорослый, не образует корневой поросли, якорность деревьев, привитых на нем, хорошая, устойчив к плотным тяжелым, переувлажненным почвам. Жаростойкий. Отличается высоким процентом укореняемость

зеленых черенков и коротким периодом корнеобразования – 12-15 дней. Формируется мощная, густая корневая система, способствующая хорошей якорности привитых деревьев в саду.

Выделяется по урожайности и выходу семенного подвоя. По многолетним наблюдениям является очень технологичным при выращивании семян в первом поле питомника, минуя школу сеянцев (ресурсосберегающие технологии). Подвой ПМК СК3 (3-106) при использовании этих технологий показал высокую всхожесть— до 89 %, и большой выход стандартных подвоев до 80 %. Этот эффект наблюдался даже в года с недостаточным для растений увлажнением почвы и высокими весенне-летними температурами близкими к критическими при взаимодействии с микробиологическим препаратом Псевдобактерин-2.

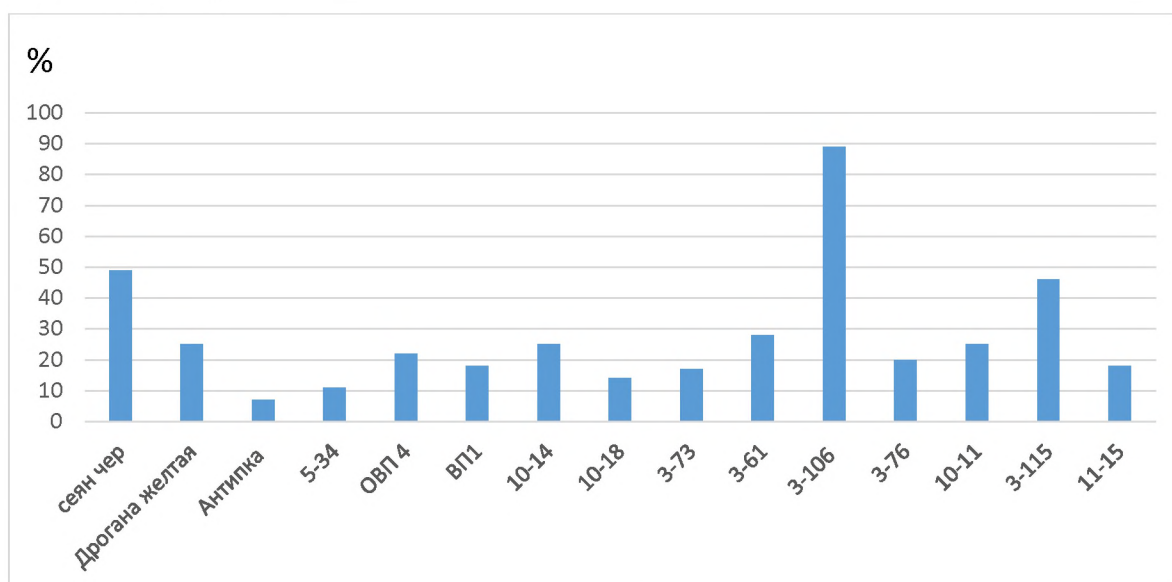


Рисунок 15 – Выход семян в ООО «ОПХ им. К.А. Тимирязева» в условиях первого поля питомника при использовании микробиологического препарата Псевдобактерин-2

В потомстве, полученном в результате размножения семенами у этого подвоя наблюдается однородность, не поражаемость коккомикозом. Отмечено значительное снижение кроны деревьев черешни и вишни, привитых на ПМК СК 3 (на 30 %, относительно заокулированных на ВСЛ-2). Также он отличается лучшей совместимостью с рядом сортов вишни, чем на подвое ВСЛ-2. Проявляет хорошую совместимость с сортами черешни, вишни и ряда

сакур. Увеличение выхода качественного посадочного материала на 30 % идет за счет высокой адаптивности к условиям юга России. Отличается повышенной засухоустойчивостью.

При выращивании этого подвоя отмечается снижение издержек на защитные мероприятия на 10 %, снижение себестоимости производства саженца на 13,5 %, снижение издержек относительно доходной части на 9,3 пункта. Дополнительная прибыль от продаж в питомнике составляет 774,8 тыс. руб./га. Увеличение рентабельности производства – на 30,5 п.п.

В результате проделанных исследований, включая заключительный этап наблюдений в 2021 году, подвой ПМК СК 3 передан в ГСИ и подана заявка на патент.

1.3.3 Селекция и сортоизучение винограда

Виноград. С целью совершенствования сортимента винограда юга России ведётся работа по селекции и сортоизучению. Основное внимание селекционеров в настоящее время направлено на объединение в одном генотипе признаков комплексной устойчивости к биотическим и абиотическим факторам среды в сочетании с высокой урожайностью и качеством виноградной продукции. Выделение доноров и источников ценных признаков и внедрение их в селекционный процесс обеспечивает реализацию поставленных задач.

С применением метода ДНК-маркерной оценки **выделен донор** гена устойчивости к милдью *Rpv10* - сорт винограда Станичный (рис. 16). Милдью – одно из наиболее распространённых и вредоносных заболеваний винограда в мире. Генетическая устойчивость к поражению милдью в основном обнаруживается у северо-американских и восточно-азиатских видов. Ген *Rpv10* изначально происходит от *V. amurensis* и может быть обнаружен в генотипах в родословной которых присутствует амурский виноград с помощью сцепленных ДНК-маркеров, позволяющих идентифицировать аллельное состояние локуса *Rpv10*.

Станичный (Цветочный х Жемчуг зала) – сорт селекции ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко. Белый технический сорт винограда, с повышенной устойчивостью к болезням и морозу, относится к сортам средне-позднего срока созревания. Сила роста кустов средняя. Гроздь средняя, массой 200-250 г., цилиндро-коническая, плотная. Ягода мелкая, белого цвета, округлая, весом 1,5-2 г, с сочной мякотью. Простого вкуса. Сахаристость сока ягод 18-20 %, кислотность 7-8 г/л. Урожайность до 20 т/га при нагрузке не менее 20 побегов на один куст и площади питания 4,5 м². Станичный имеет высокую устойчивость к милдью, повышенная устойчивость к оидиуму. Поражается серой гнилью при высокой влажности воздуха в период созревания ягод. Сорт выдерживает мороз до -27 °С, обладает высокой регенерационной способностью. Толерантен к филлоксере.



Рисунок 16 – сорт винограда Станичный

Таким образом, сорт Станичный может быть использован в селекции технических сортов винограда как донор гена устойчивости к милдью *Rpv10*, а также источник морозостойкости и высокой урожайности.

В летние месяцы насаждения винограда в условиях юга России могут подвергаться высокотемпературному стрессу при дефиците осадков. Разные генотипы винограда характеризуются разной засухоустойчивостью. При изучении гибридного фонда, создаваемого для совершенствования

сортимента винограда перспективные форму по ряду хозяйственно-ценных характеристик изучают на устойчивость к абиотическим стресс-факторам. В отчётном году гибридные формы винограда селекции СКФНЦСВВ перспективные для приготовления белых вин изучали на устойчивость к высоким температурам в условиях недостатка влаги. Для этого проводили определение в образцах RWC (относительное содержание воды).

В условиях вегетационной площадки (г. Краснодар) в летний период 2021 года нами были включены в изучение две отборные селекционные формы винограда для белого виноделия (Тана 72(СВ 12-309 х Мускат кубанский) и Тана 82 ((Мадлен Анжевин х Виллар Блан)) и в качестве контроля использовали растения сорта Первенец Магарача. Сбор листьев для исследования проводили в три этапа (утро, день, вечер). Из отобранных листьев вырезали диски одинакового размера и производили их взвешивание. После взвешивания диски помещали в пробирки с дистиллированной водой и оставляли в холодильнике при температуре 4 °С на ночь, после чего взвешивали повторно. Далее листовые диски помещали в сушильный шкаф, где оставили при температуре 70 °С в течении 12 часов. По завершению этого этапа было проведено контрольное взвешивание сухой массы листовых дисков. Следует отметить, что оценка засухоустойчивости гибридных форм винограда: Тана 72 и Тана 82 проведена на корнесобственных кустах. В качестве контроля использовали Первенец Магарача, произрастающий на подвое, все кусты 2020 года посадки.

При максимальной дневной температуре воздуха 34 °С изучаемые образцы показали разную засухоустойчивость, согласно проведённым исследованиям. Наибольшую способность сохранять влагу проявил сорт Первенец Магарача. Меньшую способность удерживать воду в тканях листа проявила форма Тана 72, процентное содержание воды составило 79 %, что согласно методике, является положительным значением. Ещё более низкие значения были у Тана 82 (табл. 7). При максимальной дневной температуре

37 °С все образцы имели схожие значения водоудерживающей способности, показатели формы ТАНА 72 незначительно превысили контроль.

Таблица 7 – Анализ водоудерживающей способности растений винограда при различных максимальных дневных температурах

Образец	Масса свежей высечки листа, г	Регидрированная масса, г	Масса сухого остатка, г	RWC, %
	Среднее	Среднее	Среднее	
Максимальная дневная температура воздуха 34 °С				
Первенец Магарача	0,363	0,404	0,095	87
Тана 72	0,356	0,425	0,096	79
Тана 82	0,352	0,453	0,114	70
Максимальная дневная температура воздуха 37 °С				
Первенец Магарача	0,327	0,396	0,095	76
Тана 72	0,35	0,432	0,094	77
Тана 82	0,334	0,411	0,118	74

По предварительным данным можно сделать вывод о том, что ТАНА 72 является более засухоустойчивой, чем Тана 82.

В 2021 году по результатам дегустационной оценки **выделена в элиту** гибридная форма винограда Тана 88-1 (СВ 12-309 x Мускат кубанский) по качеству виноматериалов.

Образец столового вина, приготовленный из урожая 2020 года, выращенного в условиях Анапской зоны, получил высокий дегустационный балл – 8,2. Физико-химические показатели виноматериала представлены в таблице 8. Характеристики сока ягод при сборе урожая были следующими: сахаристость 21,5 г/100 см³, кислотность – 6,9 г/100 см³. Средний показатель

дегустационной оценки образцов столовых вин из винограда Тана 88-1 по многолетним результатам: 8,0 баллов. Таким образом, урожай формы пригоден для приготовления столовых вин высокого качества. Вина имеют светло-соломенный цвет. Аромат яркий, чистый, цветочный с оттенками яблока. Вкус полный, умеренно свежий, гармоничный.

Таблица 8– Физико-химические показатели виноматериала из урожая 2020 года гибридной формы Тана 88-1

Образец	Объемная доля этилового спирта, %	Массовая концентрация				
		сахаров, г/дм ³	титруемых кислот, г/дм ³	диоксида серы, мг/дм ³	летучих кислот, г/дм ³	приведенного экстракта, г/дм ³
Тана 88-1	12,6	5,0	6,3	169	0,85	16,9

Массовая концентрация приведенного экстракта в белых столовых винах и виноматериалах должна быть не менее 16,0 г/дм³, в образце Тана 88-1 из урожая 2020 года данный показатель был 16,9 г/дм³. Также виноматериал Тана 88-1 имел достаточно высокую спиртуозность – 12,6 % - такой показатель крепости свидетельствует о высокой микробиологической стабильности, свойственной столовым винам высокого качества (табл. 8).

Срок созревания урожая Тана 88-1 - раннесредний. Сила роста куста - средняя. Характеризуется умеренной нагрузкой урожаем. Листья средние или крупные, пятилопастные. Нижняя поверхность листа без опушения. Грозди среднего размера, рыхлые или средней плотности. Средняя масса грозди – 166 г. Ягоды средние, округлые, желто-зеленые (рис. 17).



Рисунок 17 – Гибридная формы винограда Тана 88-1

1.3.4 Разработка метода выделения засухоустойчивых подвоев и привойно-подвойных комбинаций

В решении проблемы повышения эффективности отечественного садоводства одно из главных мест занимает вопрос устойчивости возделываемых сортов к температурным стрессорам. В условиях Краснодарского края вероятность засухи составляет 25-50 %. Этот период наступает в наших условиях в конце июля – начале августа. Длительное обезвоживание многолетних растений в период летней засухи может отрицательно отразиться на их зимостойкости, так как преждевременное опадение листьев, затруднение синтеза запасных веществ приводят к слабому закаливанию растений. Таким образом, в зоне недостаточного увлажнения с периодически повторяющимися засухами особенно важно выращивать засухоустойчивые, высокопродуктивные растения.

На протяжении многих лет считалось доказанным, что в пересыхающей почве вода доступна растениям до тех пор, пока содержание влаги в ней не

достигнет коэффициента устойчивого завядания, когда в почве остается недоступная растению вода. Согласно этой точке зрения физиологические процессы, рост и развитие растений на почве, подвергающейся иссушению, протекают нормально до достижения коэффициента завядания. Однако накоплено много данных, показывающих, что на обмен веществ, а, следовательно, на рост и развитие растений влияет даже слабый водный дефицит. Такой внутренний водный дефицит возникает в тканях задолго до того, как содержание влаги в почве приблизится к уровню коэффициента завядания.

В литературе нет сведений о методах расчёта скорости потери воды листьями яблони. Для этого требовалось предложить простой для расчёта метод, основанный на стандартных характеристиках засухоустойчивости, легко получаемых в лабораторных условиях. Так как обычно по общепринятой методике, изучается потеря воды за три временных интервала (2, 4 и 24 часа), для оценки скорости потери воды за короткий период в 2 часа (4 часа – 2 часа) и за более продолжительный период в 20 часов (24 часа – 4 часа) мы предлагаем использовать **индекс скорости потери воды (ИСПВ)**. Для его расчёта следует получить разности между процентом потери воды за 4 часа и 2 часа, а также за 24 часа и 4 часа. Далее первую разность делим на вторую. Если индекс оказывается больше 1, то листья интенсивно отдают воду за короткий первоначальный период, если индекс меньше 1, то листья теряют воду за более продолжительный период, что говорит об их большей засухоустойчивости.

Таким образом, индекс скорости потери воды (ИСПВ) вычисляется по формуле (1):

$$\text{ИСПВ} = (\text{ПВ4} - \text{ПВ2}) / (\text{ПВ24} - \text{ПВ4}), \quad (1)$$

где ПВ4 – потеря воды за 4 часа (%);

ПВ2 – потеря воды за 2 часа (%);

ПВ24 – потеря воды за 24 часа (%).

Точность выделения лучших форм подтвердили данные и по оводненности и по урожайности ППК плодовых культур, полученные в результате многолетних наблюдений (рис. 18, 19).

Так нами выделены засухоустойчивые комбинации сливы на подвоях сеянцы алычи, ПКГ 25 (ПКСК 1) и ПКГ 13 (ПКСК 2).

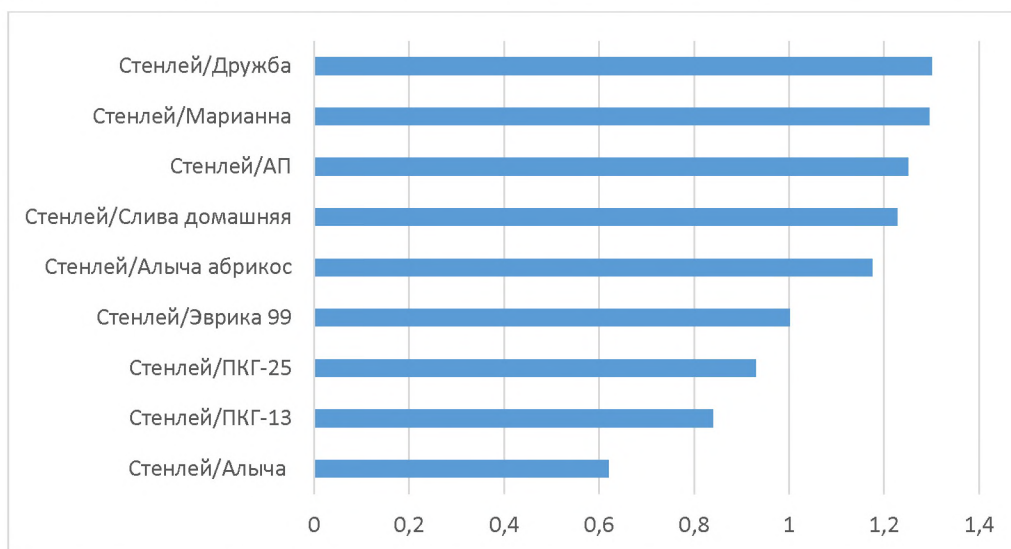


Рисунок 18 – Оценка засухоустойчивости ППК сливы Стенлей по **индексу скорости потери воды (ИСПВ)** (2021 г.)

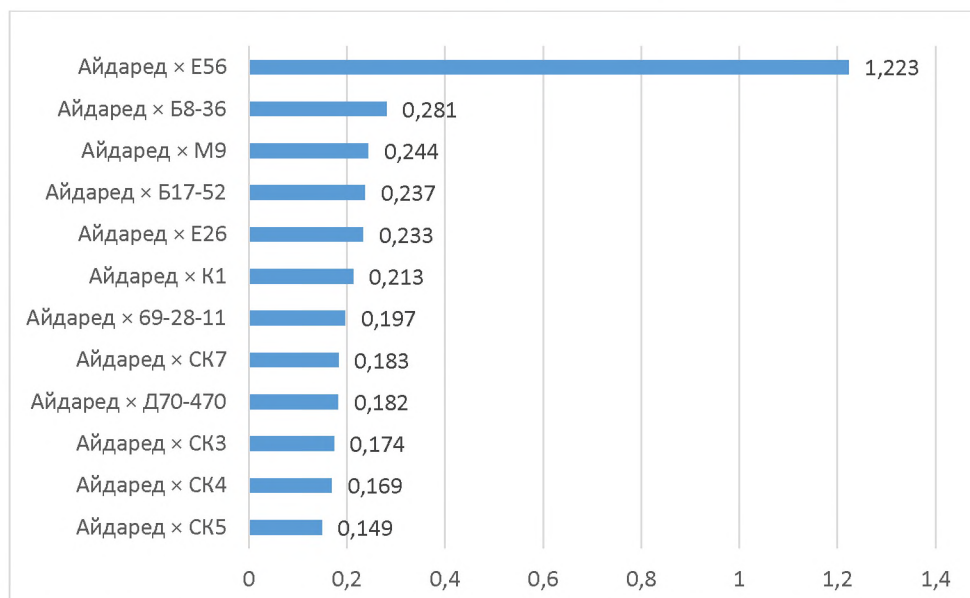


Рисунок 19 – Оценка засухоустойчивости ППК яблони Айдаред по **индексу скорости потери воды (ИСПВ)** (2019 г.)

По результатам проделанных исследований разработан СТО 00668034-122-2021 «Метод выделения засухоустойчивых подвоев и привойно-

подвойных комбинаций плодовых культур», который способствует более точному определению засухоустойчивости растений.

1.4 Выводы

Таким образом, в ходе выполненных исследований:

- получены новые знания о фенотипическом и генотипическом разнообразии сортов, подвоев и гибридных форм садовых культур и винограда генофонда ФГБНУ СКФНЦСВВ, включая основные адаптивно значимые и хозяйственно ценные признаки;

- выделены 2 донора значимых признаков: яблоня: 12/3-21-25 (Голден Делишес тетраплоидный x 2034 (F2 M. floribunda x Голден Делишес)) – донор иммунитета яблони к парше (с геном Rvi6); виноград: с применением метода ДНК-маркерной оценки выделен донор гена устойчивости к милдью Rpv10 - сорт винограда Станичный. Сорт технического направления использования, характеризуется высокой морозоустойчивостью и урожайностью, филлоксероустойчивостью;

- выделено 7 источников хозяйственно ценных признаков, в том числе: 2 яблони – 12/3-21-27 (источник крупноплодности и высоких вкусовых достоинств плодов), 12/1-20-34 (источник ярко-красной окраски и высоких вкусовых достоинств плодов), 1 груши – Июльская ранняя (источник высокой продуктивности), 1 черешни – Алая (источник зимостойкости), 2 вишни: Чудо-вишня (источник крупноплодности) и Джуси Фрут (устойчивости к клястероспориозу) 1 сливы домашней – Осенняя (источник слаборослости);

- 5 элитных формы плодовых культур и винограда: 1 яблони – 12/2-21-33 (Айдаред x Балсгард 0247Е), полученная усовершенствованным методом полиплоидии; 1 айвы – 3-21-2 (Кубанская св. оп.); 1 черешни – 2-13 (Мелитопольская чёрная св. оп.); 1 сливы домашней – 17-1-17; элитная форма винограда Тана 88-1 (СВ 12-309 x Мускат кубанский) по качеству виноматериалов. Форма Тана 88-1 характеризуется раннесредним сроком

созревания, средней силой роста, виноград Тана 88-1 пригоден для приготовления качественных белых столовых вин;

- создано и передано в государственное сортоиспытание 2 новых сорта: 1 яблони – иммунный к парше (с геном Rvi6) сорт Стасовское зимнего срока созревания; 1 подвой мелкокосточковых культур ПМК СКЗ.

- проведена сравнительная оценка засухоустойчивости двух перспективных гибридных форм винограда для белого виноделия по показателю водоудерживающей способности, по предварительным данным Тана 72 более устойчива к воздействию высоких температур в условиях дефицита влаги, чем Тана 82.

- разработан метод выделения засухоустойчивых форм подвоев и привойно-подвойных комбинаций. Разработан СТО 00668034-122-2021 «Метод выделения засухоустойчивых подвоев и привойно-подвойных комбинаций плодовых культур». Полученные в ходе исследований результаты содержат принципиально новые знания для развития селекции плодовых культур и винограда.

2 Реализация исследовательских проектов по ДНК-паспортизации генотипов; молекулярно - генетической идентификации генов хозяйственно-ценных признаков и диагностике вирусных и фитоплазменных патогенов; разработке и усовершенствованию молекулярно-генетических методов для решения задач по селекции, изучению генофонда и получению оздоровленных растений

2.1 Обоснование необходимости проведения НИР

На современном этапе развития селекционных технологий, все более важную роль приобретают высокоточные экспресс методы, позволяющие идентифицировать образцы, обладающие комплексом хозяйственно-ценных признаков. К одной из наиболее перспективных технологий можно отнести ДНК-маркерный анализ, появление которого стало возможным на фоне развития методов молекулярной биологии. Развитие ДНК-маркерных технологий обусловило появление маркер-опосредованной селекции (marker assisted selection – MAS). Ее использование позволяет проводить идентификацию и отбор селекционных форм, несущих целевые гены, без фенотипической оценки, - по результатам ДНК-маркерного анализа на предмет наличия целевых генов.

ДНК-маркерные методы могут быть наиболее ценны для использования в селекции по признакам, фенотипическая оценка которых является сложной процедурой, и при создании сортов, несущих одновременно несколько целевых селекционно-ценных генов. И при селекции одновременно на несколько хозяйственно полезных признаков, детерминируемых различными генами, данный метод MAS обеспечивает повышение эффективности оценки – как по затратам времени, так и экономически в связи с тем, что появляется возможность исключения нескольких полевых испытаний (например оценка по резистентности к фитопатогенам, абиотическим стресс-факторам) появляется возможность детекции одновременно нескольких генов,

контролирующих разные хозяйственно-ценные признаки, являющиеся целевыми для селекционера [32].

Помимо маркер-опосредованной селекции методы молекулярного ДНК-маркирования могут быть использованы при решении широкого перечня задач в оценке разнообразия генетических ресурсов, ДНК-паспортизации сортов, картирования генов и анализа их функциональной роли и генетического мониторинга в селекции и генетике культурных растений.

Основные направления использования молекулярных маркеров при работе с генетическими ресурсами растений можно представить следующим образом:

- интродукция генофонда: выявление нового генетического разнообразия для последующего пополнения коллекций; контроль процесса включения нового образца в коллекцию (для предотвращения дублирования);
- выяснение генетической структур коллекции: анализ степени генетического родства образцов коллекции, выявление групп наибольшего генетического сходства и определение их генетических взаимосвязей;
- формирование коллекций с учетом данных ДНК-маркерного анализа: идентификация и регистрация образцов коллекции; формирование стержневых коллекций (кор-коллекций); контроль генетической стабильности для длительно культивируемых коллекций *in vitro*;
- охрана авторских прав на селекционные достижения: идентификация и ДНК-паспортизация сортов, ДНК-паспортизация и последующая регистрация источников и доноров ценных признаков, включая патентование, решение спорных вопросов о происхождении сортов.

Среди методов ДНК-маркерного анализа широкое распространение нашли ДНК-маркеры, основанные на анализе полиморфизма микросателлитных последовательностей генома (SSR), а также на полиморфизме участков генома, расположенных между микросателлитными последовательностями (ISSR).

Источник полиморфизма микросателлитных последовательностей (SSR) – сайт-специфическое варьирование длины повтора. Это обусловлено разницей в количестве единиц повтора. SSR-маркеры кодоминантны, распределены по всему геному, обладают значительной аллельной изменчивостью. Микросателлитное генотипирование может быть автоматизировано, при использовании соответствующего лабораторного оборудования (генетические анализаторы типа ABIprism3130, Нанофор 05). Данный тип ДНК-маркеров широко используется для генетической дифференцировки растений внутри вида, идентификации сортов, составлении генетических карт и в маркерной селекции, а также в исследованиях генетического разнообразия генофонда и паспортизации сортов плодовых культур и винограда [33,34]. ISSR-маркеры основаны на использовании праймеров, комплементарных непосредственно к микросателлитной последовательности, и, таким образом позволяют анализировать участки, локализованные между ними. Маркеры ISSR просты в использовании, недороги и методологически менее требовательны к затратам времени и ресурсов, что делает его эффективным генетическим маркером начальных исследований организмов, с недостаточно изученным геномом. Еще одним эффективным типом мультилокусных ДНК-маркеров, имеющих высокий уровень информативности и воспроизводимости результатов являются IRAP маркеры. Анализируемыми участками генома являются области между LTR-последовательностями ретротранспозонов. В IRAP ПЦР используется праймер комплементарный LTR-последовательности ретротранспозона. Они являются эффективным молекулярно-генетическим методом анализа полиморфизма генома и зарекомендовали себя в паспортизации, изучении структуры генофонда и популяционно-генетических исследованиях у растений [35,36].

К относительно недавно разработанному типу мультилокусных ДНК-маркеров можно отнести SCoT (Start Codon Targeted). Новый метод ДНК маркирования был разработан на основе короткого консервативного региона

фланкирующего стартовый кодон в генах растений (ATG) [37]. В качестве развития метода SCoT генотипирования выступили Conserved DNA-Derived Polymorphism (CDDP) маркеры, в которых консервативные участки генов были использованы в качестве «мишеней» для отжига праймеров [38]. Данные методы предполагает постановку ПЦР с использованием праймера размером 15-19 пар нуклеотидов и температуры отжига около 50 °С. Как и в случае SCoT-генотипирования, результаты CDDP анализа разделяются с использованием стандартного электрофореза в агарозном геле, что методически значительно проще в сравнении с полиакриламидным гелем.

SCoT и CDDP ДНК-маркеры обладают высоким уровнем воспроизводимости и позволяют получать достоверные данные о степени генетического родства изученных образцов. Низкая себестоимость выполнения анализа в сочетании высоким уровнем информативности и воспроизводимости результатов.

Наряду с ДНК-паспортизацией и изучением генетического разнообразия, а также выяснения вопросов, связанных с происхождением сортов, ДНК-маркеры эффективно могут быть использованы для идентификации генов, детерминирующих хозяйственно-ценные признаки.

Для яблони, как для наиболее важной культуры и вида с перекрестным типом опыления высокой актуальностью обладает вопрос, связанный с подбором опылителей и определением совместимости сортов при опылении. От этого напрямую зависит продуктивность садового агроценоза. В системе самонесовместимости яблони основная функция в регуляции принадлежит гену самонесовместимости (S-ген). Наличие у двух разных сортов одинаковых наборов аллелей S-гена ведет к их несовместимости при опылении, что ведет к отсутствию завязи и формирования плодов. Очевидно, что знание S-генотипов необходимо для улучшения эффективности перекрестного опыления. Сорта, которые несут по одной одинаковой S-аллели, являются полу совместимыми – максимум до 50 % пыльцевых зерен имеют потенциал к

прорастанию при попадании на рыльце цветка другого сорта. Произрастание таких сортов совместно в одном саду также не является оптимальным [39].

Генетическая основа данного процесса у яблони глубоко изучена. Выявлено около 25 аллелей S-гена. Для них разработаны ДНК-маркеры. На настоящее время известно, что в мировом генофонде яблони наиболее распространены 7-8 основных аллелей, из которых аллели S2, S3, S5, S7, S10 являются наиболее распространенными [39-42].

Использование ДНК-маркеров определило возможность идентификации аллелей гена самонесовместимости среди образцов коллекций генетических ресурсов яблони в различных странах, где возделывается данная культура. Важность этих исследований очевидна – появляется возможность прогнозировать степень совместимости сортов при опылении, что позволяет эффективно комбинировать сорта в садовом насаждении, размещая максимально совместимые сорта в саду в непосредственной близости. Это позволит получать наибольший уровень завязи плодов и, соответственно, урожайности. Наряду с этим, данные об аллельном составе гена самонесовместимости могут являться частью ДНК-паспортов сортов яблони в комплексе с микросателлитным ДНК-фингерпринтом.

Экономическая значимость таких признаков яблони как устойчивость к парше и качество плодов обусловило успехи в изучении генетических основ данных признаков и разработке ДНК-маркеров для генов, которые их контролируют. Разработаны эффективные ДНК-маркеры для такого селекционно-важного гена устойчивости к парше как *Rvi6*, который детерминирует устойчивость к шести расам возбудителя парши – *Venturia inaequalis* [43,44].

Для ряда генов, детерминирующих признаки качества плодов яблони, также имеются ДНК-маркеры, которые дают возможность проводить анализ гибридов на их наличие и проводить выбраковку образцов с нежелательными аллелями генов, не дожидаясь вступления в плодоношение.

Среди таковых - ген Md-Exp7 в настоящее время идентифицирован функциональный ДНК маркер – SSR-локус косегрегирующий с ним. Длина микросателлитного повтора достоверно взаимосвязана с уровнем экспрессии гена Md-Exp7 и плотностью мякоти, соответственно. Было показано, что при наличии аллели с меньшим размером амплифицированной последовательности - 198 пар нуклеотидов (п.н.), показатель плотности будет максимальным, размер аллелей 202 п.н. характеризует средний уровень показателя. При размере аллелей 214 п.н. показатель плотности будет наиболее низким [45,46].

Необходимо отметить также ген Md-PG1, который детерминирует активность этилен-зависимой эндополигалактуроназы и достоверно влияет на процесс размягчения мякоти плодов при хранении [47-49]. Для него идентифицирован косегрегирующий SSR-маркер [50]. Аллельные комбинации 288:298 и 291:298 достоверно соответствуют среднему уровню активности, этилен-зависимой полигалактуроназы, что препятствует значительному снижению плотности мякоти [50, 51]. В селекции на высокое качество плодов применение ДНК-маркеров для идентификации аллелей целевых генов Md-Exp7 и Md-PG1 имеет важное значение для селекции. Использование ДНК-маркерного отбора на ранних этапах вегетации – до вступления в плодоношение (начиная с однолетних сеянцев) позволяет выбраковать гибриды с наименее ценными аллелями уже на первом году жизни сеянцев, что позволяет существенно сократить объем селекционного материала и повысить экономическую эффективность селекции. Наличие ДНК маркеров к ряду генов, контролирующим хозяйственно-ценные признаки, позволяет разрабатывать экспресс методы мультиплексной идентификации нескольких генов одновременно – при постановке одной реакции.

Как видно, ДНК-маркерный анализ может быть эффективно использован как для предселекционной оценки генофонда (анализ уровня генетического разнообразия, выявление генетических взаимосвязей между

изучаемыми образцами, скрининг коллекций генресурсов на наличие доноров генов селекционно-ценных признаков), так и непосредственно в селекционном процессе – для ускорения отбора гибридных форм, несущих гены целевых признаков (так называемая маркер-опосредованная селекция).

Использование ДНК-маркерных технологий позволяет ускорить селекционный процесс за счет возможности раннего отбора (уже на этапе одно- двухлетнего сеянца) в гибридном потомстве наиболее ценных форм и выбраковки гибридов, не имеющих селекционно-ценных генов. За счет этого в ряду лет накапливается только селекционный гибридный фонд, включающий образцы, имеющие один, два, три или более генов, контролирующих хозяйственно-ценные признаки. Очевидно, что вероятность отбора форм с заданными характеристиками значительно возрастает, что соответственно, существенно повышает эффективность селекционного процесса.

Эффективность использования ДНК-маркерных технологий в решении селекционно-генетических задач актуализирует выполнение исследований, направленных на разработку и усовершенствование методов ДНК-маркерного анализа, апробацию и поиск новых, информативных ДНК-маркеров, а также анализ генетического сходства генотипов (сортов, элитных форм, гибридов) и молекулярно-генетическую идентификацию генов хозяйственно-ценных признаков. В связи с этим, в отчетном 2021 году нами были поставлены следующие задачи:

- разработать и усовершенствовать методы молекулярно-генетической идентификации генов хозяйственно-ценных признаков и паспортизации генотипов плодовых культур;
- выполнить апробацию локуспецифичных и мультилокусных ДНК-маркеров и определить наиболее перспективные для выполнения генотипирования плодовых культур;
- с использованием ДНК-маркерного анализа выполнить генотипирование сортов и сортообразцов плодовых культур и винограда и

установить генетические взаимосвязи между изученными генотипами;

– идентифицировать аллели гена самонесовместимости яблони *S3*, *S2*, *S5* у сортов и сортообразцов яблони.

2.2 Объекты, методы, методики и условия проведения исследований

Объекты исследований – сорта, гибриды и клоны плодовых культур и винограда.

Основное используемое лабораторное оборудование: гомогенизатор Tissue Lyser LT, генетические анализаторы ABI Prism 3130, ДНК - амплификаторы Eppendorf Mastercycler gradient, BioRad T100, электрофоретические камеры SE1, SE2, трансиллюминатор Vilber Lourmat, центрифуги для микропробирок Eppendorf Mini spin, Elmi, 5427R, термостаты для микропробирок, микродозаторы автоматические Thermo Labsystems и Biohit с переменным объемом. стерилизатор ВК-30, шкаф сушильный ШС-80 (0+200), дистиллятор ДЭ-10, термостаты с воздушным охлаждением ТСО-1/80, рециркуляторы воздуха бактерицидные ОБР-30, облучатель ОБН-1х30, весы аналитические Shinko HTR-220-E, мешалка магнитная С-MAG HS 7, ламинарные боксы С-1,2 (код 110.120), pH-метры pH-150И, весы лабораторные Ohaus, люксметр ТКА-люкс.

В том числе оборудование, приобретенное за счет средств гранта: Генетический анализатор Нанофор 05; ДНК-амплификатор MiniAmp Plus; рефрактометр PAL-3.

В ходе выполнения молекулярно-генетических исследований использовано оборудование Центра коллективного пользования технологичным оборудованием по направлению геномные и постгеномные технологии.

Расходные материалы, реактивы и материалы, не являющиеся амортизируемым имуществом, использованные в ходе выполнения НИР, включая приобретенные за счет средств гранта:

- реактивы для проведения полимеразной цепной реакции: олигонуклеотиды синтетические, включая модифицированные ROX, TAMRA, R6G, FAM, дезоксинуклеотидтрифосфаты, буфер для ПЦР; реактивы для электрофореза: агароза, полимер для секвенирования ДНК «ПДМА-6», маркер молекулярного веса ДНК «СД-450», «100 bp», «100 bp + 1.5 Kb+3 Kb», «100 bp+1.5 Kb», Трис основной, борная кислота);

- расходные материалы для выполнения молекулярно-генетических исследований (микропробирки 1,5 мл, микропробирки для проведения ПЦР, в том числе в стрипах, наконечники для дозаторов автоматических разного объема, штативы для хранения микропробирок, штативы «рабочее место», крио штативы, пробирки типа Falcon объемом 15 и 50 мл, пробирки для гомогенизации растительных образцов)

Расходные материалы, реактивы и материалы, не являющиеся амортизируемым имуществом, использовались как приобретенные за счет средств гранта, так и ранее приобретенные, в том числе из внебюджетных источников. Часть реактивов и расходных материалов не являющиеся, амортизируемым имуществом, приобретенные за счет средств гранта, будут использоваться для выполнения части исследований, запланированных на 2022 год.

Для поиска литературных источников и последовательностей праймерных пар ДНК маркеров используется генетическая база данных NCBI (www.ncbi.nih.gov), базы данных научных периодических изданий www.sciencedirect.com, <https://link.springer.com/>, а также ряд других, специфичных для отдельных культур.

Для экстракции ДНК методом ЦТАБ использовали следующий протокол:

Образец вносили в микропробирки и растирали с прогретым до 60 °С 2×ЦТАВ буфером, содержащим 2 % ЦТАВ (цетилтриметиламмоний бромид), 1,4 М хлористого натрия, 0,1 М Трис-гидрохлорид, 20 мМ ЭДТА (этилендиаминотетраацетат). При этом соблюдали соотношение 500 мкл

буфера на 0,1 г ткани. На следующем этапе образцы центрифугировали 10 минут при 5 тыс. об./мин., отбирали супернатант и добавляли к нему 0,2 V 5×ЦТАБ буфера, содержащего 5 % ЦТАБ и 350 мМ ЭДТА и инкубировали 10 минут при 60 °С, добавляли равный объем буфера для преципитации (1 % ЦТАБ, 50 мМ Трис-НСl, 10 мМ ЭДТА) и оставляли на ночь при комнатной температуре. После преципитации ДНК, осадок растворяли в 500 мкл солевого буфера (1 М NaCl, 10 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА), добавляли 1 мл этилового спирта (96 %) и ставили в -20 °С на 2-3 часа. По истечении этого времени, центрифугировали образцы 10 минут при 13 тыс. об./мин. после чего осадок промывали 70 % этиловым спиртом, высушивали и растворяли в 50-100 мкл стерильной дистиллированной воды или 0,1*TE-буфера.

Кроме того, использовали упрощенный метод экстракции ЦТАБ. Использовали экстракционный буфер следующего состава: 2 % ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид), 1,4 М хлористого натрия, 0,1 М Трис-гидрохлорид, 20 мМ ЭДТА. В данном методе использовали наименьшее количество растительной ткани для проведения экстракции (около 1 см²). Ткань растирали в 500 мкл экстрагирующего буфера в пластиковой пробирке объемом 1,5 мл. Инкубировали образцы при 60 °С в течение 3 часов. Отделяли супернатант центрифугированием при 12000 об/мин. К перенесенной в чистую пробирку верхней фазе добавляли 500 мкл изопропанола, оставляли для преципитации на 10-20 минут при комнатной температуре, предварительно перемешав. После этого образец центрифугировали 5 минут при 12000 об/мин, полученный осадок промывали 300 мкл 70 % этанола, высушивали и растворяли в 200 мкл 0,1*TE-буфера.

ПЦР-анализ проводили по стандартным методикам с оптимизацией экспериментальных параметров.

Базовый состав ПЦР-смеси включал: 40–50 нг ДНК, 0,05мМ dNTPs, 0,3 мкМ каждого праймера (показатели концентрации dNTPs и праймеров в ходе экспериментальной апробации праймеров, при необходимости, оптимизировали – см. раздел молекулярщина), 2,5 мкл 10xSE ПЦР-буфера

(ООО «СибЭнзим»), 1 единица активности Taq-ДНК полимеразы, в общем объеме реакционной смеси 25 мкл. Постановку ПЦР проводили по следующей программе: 1 мин. при 94 °С для начальной денатурации; следующие 35 циклов (количество циклов при необходимости увеличивали для увеличения выхода специфически амплифицированных продуктов): денатурация 30 сек. при 94 °С; 30 сек. отжиг праймеров - при оптимальной экспериментально отработанной температуре для каждого из апробированных ДНК-маркеров или их мультиплексной комбинации. Финальный цикл синтеза при 72 °С - 5 мин.

Использовали следующие ДНК-маркеры: SCAR – маркеры аллелей S2, S3, S5, SSR-маркеры генов Rvi6, Md-Exp7 и Md-PG1, Rpv-10 а также мультилокусные ДНК маркеры ScOT, CDDP, ISSR [33,35,37,38,40-45,50,52].

Визуализацию продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 2 % агарозном геле на основе трис-боратного буфера с последующим окрашиванием гелевых пластин бромистым этидием и фотографированием в ультрафиолетовом свете.

При ДНК-паспортизации, генотипировании, идентификации аллельного состояния генов устойчивости анализ размеров амплифицированных фрагментов проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI prism 3130. Обработку данных осуществляли в программе Gene Mapper 4.1.

При оценке результатов микросателлитного анализа матрица генетических дистанций была построена с использованием коэффициентов (индексов) подобия по М. Nei и W. Li (1979) [53]. Кластерный анализ выполнен невзвешенным попарно-групповым методом на основе арифметических средних (UPGMA) с использованием программ PAST version 2.17с, а также Free Tree Application 0.9.1.50 (ZDAT v. o. s.). Графическое построение дендрограммы проведено в программе TreeView (Win32) 1.6.6.

2.3 Результаты исследований

2.3.1 Разработка метода мультиплексной молекулярно-генетической паспортизации и ПЦР идентификации гена устойчивости яблони к парше *Rvi6* и генов, контролирующих признаки качества плодов *Md-Exp7* и *Md-PG1*

В связи с тем, что такие признаки как качество плодов и устойчивость к парше являются одними из наиболее важных в селекции, нами была поставлена задача разработки метода мультиплексной идентификации генов, детерминирующих эти признаки. В соответствии с современными литературными данными, для гена устойчивости яблони к парше *Rvi6* и генов, контролирующих признаки качества плодов *MdEXP7* и *MdPG1* были идентифицированы микросателлитные ДНК маркеры, анализ аллелей которых может быть осуществлен с применением электрофореза с высоким уровнем разрешения. К таковым относится электрофорез с использованием автоматических генетических анализаторов типа ABIprism 3130 или Нанофор 05. Диапазоны размеров амплифицируемых фрагментов по данным маркерам не перекрывается, что позволяет проводить их одновременную идентификацию (табл. 9). Для этих целей нами для ДНК-маркера каждого из целевых генов были использованы флуорохромы с разной длиной волны флуоресценции, которые также представлены в таблице 9.

Принимая во внимание тот факт, что ДНК-маркеры искомых генов являются мультиаллельными, такой мультиплексный набор может быть использован не только для идентификации аллелей, но также, эти данные могут быть использованы для ДНК-паспортизации – как часть ДНК-паспорта сорта или, при анализе небольших выборок, являться ДНК-паспортом самостоятельно.

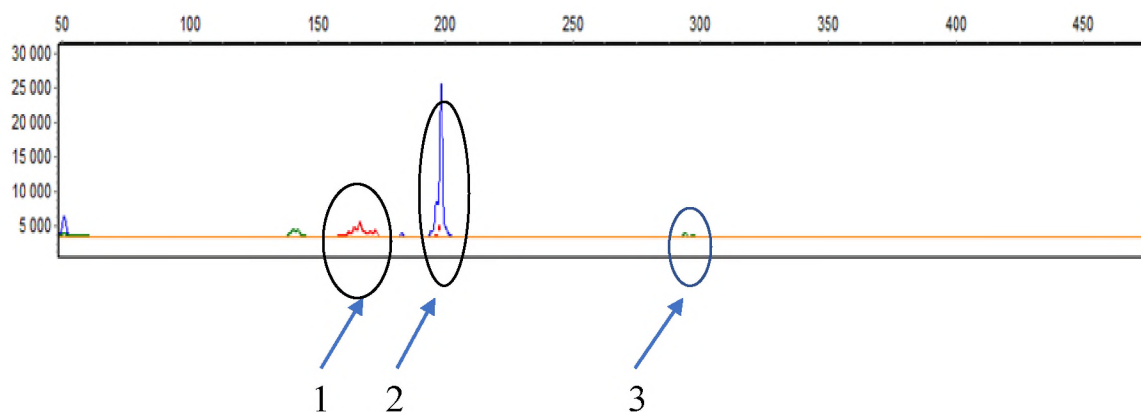
Таблица 9 – Характеристика ДНК-маркеров, разработанного мультиплексного набора

Ген	Маркер	Диапазон размеров продуктов амплификации	Флуорохром	Длина волны флуоресценции (нм)
Rvi6	CH-VF1	130-175	Родамин X (ROX)	591
Md-Exp7	Md-Exp7- SSR	196-214	Карбоксифлуоресцеин (FAM)	520
Md-PG1	Md-PG1- SSR10kd	296-308	6-Карбоксиродамин (R6G)	557

Как видно из таблицы 9, спектры флуоресценции и диапазоны размеров амплифицированных последовательностей использованных ДНК-маркеров не перекрываются. Это позволяет использовать их в мультиплексной смеси при постановке одной реакции.

На первом этапе экспериментальной апробации использовали следующие условия ПЦР: состав ПЦР-смеси включал: 50 нг ДНК, 0,05 мМ dNTPs, 0,3 мкМ каждого праймера, 2,5 мкл 10xSE ПЦР-буфера (ООО «Сибэнзим»), 1 единица активности Taq-ДНК полимеразы, в общем объеме реакционной смеси 25 мкл. Постановку ПЦР проводили по следующей программе: 1 мин. при 94 °С для начальной денатурации; следующие 35 циклов: денатурация 30 сек. при 94 °С; 30 сек. отжиг праймеров 30 секунд при 58 °С; синтез 30 сек. при 72 °С. Финальный цикл синтеза при 72 °С - 5 мин.

Проведение электрофоретического анализа полученных продуктов реакции выявило сниженный уровень синтеза продуктов реакции по ДНК-маркерам генов Rvi6 и MdPG1. Это было выражено в сниженном интенсивности флуоресценции. Пример результатов электрофореза, выполненного на генетическом анализаторе Нанофор 05, приведен на рисунке 20.



Примечания:

1 - CH-VF1,

2 - Md-Exp7-SSR,

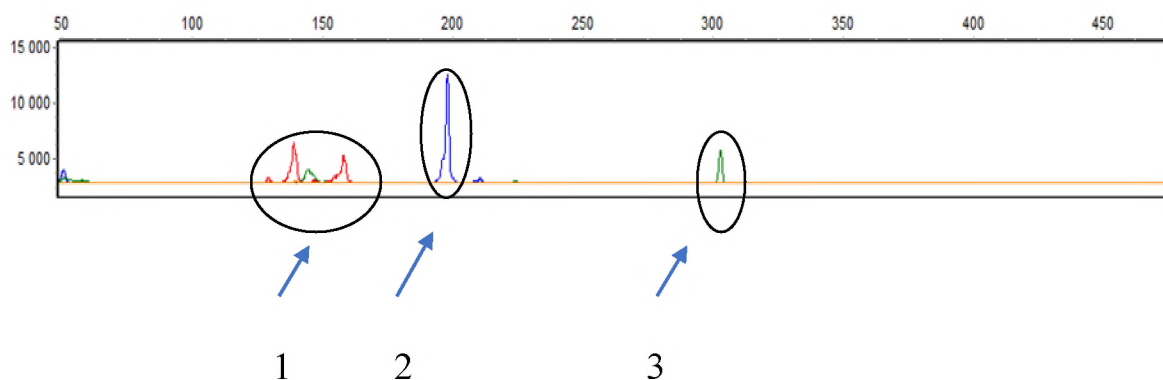
3 - Md-PG1-SSR10kd

Рисунок 20 – Результаты фрагментного анализа по мультиплексному набору

Как видно из приведенных результатов фрагментного анализа, по ДНК-маркерам генов Rvi6 и Md-PG1 интенсивность детектируемого сигнала флуоресценции существенно ниже. Несмотря на то, что при соответствующем масштабировании, целевые пики детектируются, могут возникать затруднения достоверной оценки наличия целевых фрагментов и их размеров.

Для устранения данного недостатка была увеличена концентрация праймеров ДНК-маркеров соответствующих генов. Для них использовали концентрацию праймеров 0,6 мкМ, при этом концентрация праймеров ДНК-маркера гена Md-Exp7, как и все остальные условия ПЦР, были оставлены без изменения.

На рисунке 21 приведены примеры результатов электрофореза продуктов реакции, полученных при повышении концентрации праймеров по ДНК-маркерам генов Rvi6 и Md-PG1.



Примечания:

1 - CH-VF1,

2 - Md-Exp7-SSR,

3 - Md-PG1-SSR10kd

Рисунок 21 – Результаты фрагментного анализа по мультиплексному набору при повышении концентраций праймеров

Из рисунка видно, что повышение концентрации соответствующих праймеров обеспечивает наличие легко интерпретируемых результатов. Это дает возможность проводить достоверную идентификацию целевых фрагментов. С использованием разработанного мультиплексного набора было выполнено генотипирование ряда сортов яблони отечественной и зарубежной селекции. ДНК-фингерпринты по целевым ДНК-маркерам приведены в таблице 10.

Таблица 10 – ДНК-паспорта сортов яблони по ДНК-маркерам, входящих в разработанный мультиплексный набор

Сорт	Md-Exp7-SSR	Md-PG1-SSR10kd	CH-VF1
Моди	198	303	139:160
Ренет Симиренко	198:219	303	139:173
Фуджи Кику	198	294:297	167
Женева Эрли	198:211	303	139:158
Либерти	198:211	303	160:173
Кримсон Крисп	198	297	139:158
Гренни Смит	194:198	297	140
Флорина	198	294	160:173

Как видно из таблицы, все представленные сорта обладают сортоспецифичным ДНК-паспортом (указан размер амплифицированных фрагментов в парах нуклеотидов) по микросателлитным маркерам, входящим в разработанный мультиплексный набор. Два значения свидетельствуют о гетерозиготности локуса.

Исходя из полученных результатов можно сделать заключение об эффективности использования метода мультиплексной молекулярно-генетической идентификации и паспортизации с использованием ДНК-маркеров генов яблони *Rvi6*, *Md-Exp7*, и *Md-PG1*. Данный метод позволяет идентифицировать аллели искомых генов и может быть использован для одновременного поиска сортов и гибридов, несущих селекционно-ценные аллели и микросателлитной ДНК-паспортизации образцов.

Важное преимущество данного мультиплексного метода на основе применения мультиплексной ПЦР заключается в том, что его использование позволяет проводить детекцию по трем ДНК-маркерам одновременно, при постановке одной реакции. Это снижает себестоимость выполнения анализа и время, затраченное на его проведение.

2.3.2 Апробация локуспецифичных (SSR) и мультилокусных ДНК-маркеров на семечковых культурах и выполнение SCoT – генотипирования сортов яблони

Яблоня, груша и айва являются близкородственными видами плодовых растений, входящих в семейство Rosaceae. Микросателлитные ДНК-маркеры, как правило, обладают кросс воспроизводимостью на разных видах в пределах одного семейства. В связи с этим одной из стратегий поиска новых микросателлитных ДНК-маркеров, у которых известно их лимитированное количество, является апробация SSR маркеров, разработанных ранее на других близкородственных видов. По результатам апробации отбираются наиболее информативные и полиморфные ДНК-маркеры.

В связи с этим нами было выполнено исследование по апробации микросателлитных ДНК-маркеров, разработанных ранее на яблоне и груше, применительно к айве. Также была проведена работа по предварительной оценке уровня их полиморфизма на выборке из восьми генотипов айвы.

В целях апробации были отобраны следующие SSR маркеры, разработанные на яблоне: CH01h01, CH01d08, CH05c06, GD142, CH01f07a и груше: Nh011b, EMPc117, EMPc108. По результатам выполненных нами ранее исследований, они обладают высоким уровнем полиморфизма по данным генотипирования сортов целевых культур. Апробация проводилась по следующей программе: В ПЦР смесь общим объемом 25 мкл входили следующие компоненты: 2 мМ смесь dNTP, стабилизирующий Taq-полимеразу 10x буфер – 2,5 мкл, Taq-полимераза – 1 единица активности, праймеры в концентрации 0,25 мкМ. ПЦР проходила по следующей программе: 3 минуты при 95 °C – начальная денатурация, затем 34 цикла при следующих параметрах: 20 сек. при 95 °C денатурация, 20 сек. При 58 °C – отжиг, 40 сек. при 72 °C – элонгация; этап финальной элонгации – 15 мин при 72 °C.

На рисунках 22-26 приведены выборочные примеры визуализации пиков на электрофореграмме при проведении фрагментного анализа на генетическом анализаторе Нанофор 05 (результаты приведены в программе GeneMarker V3.0.1.).

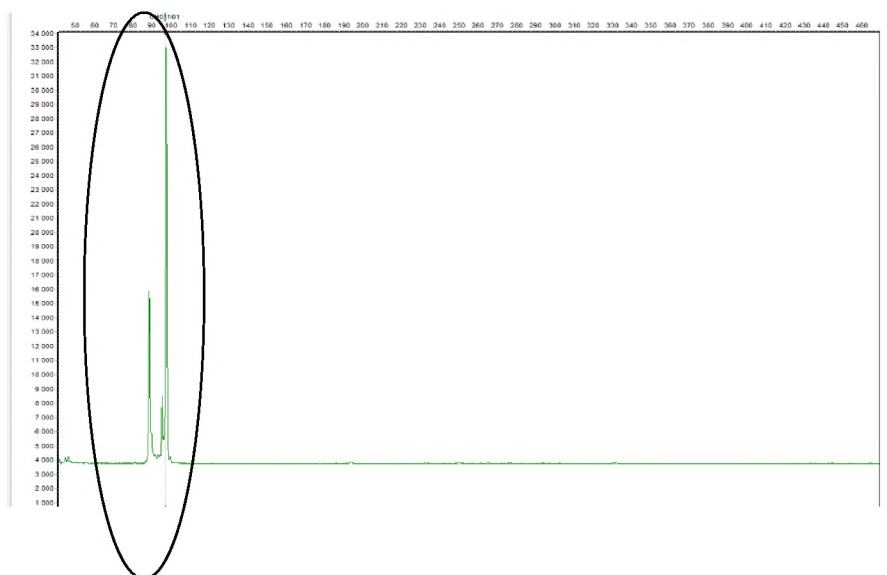


Рисунок 22 – Результаты фрагментного анализа по маркеру CH01h01

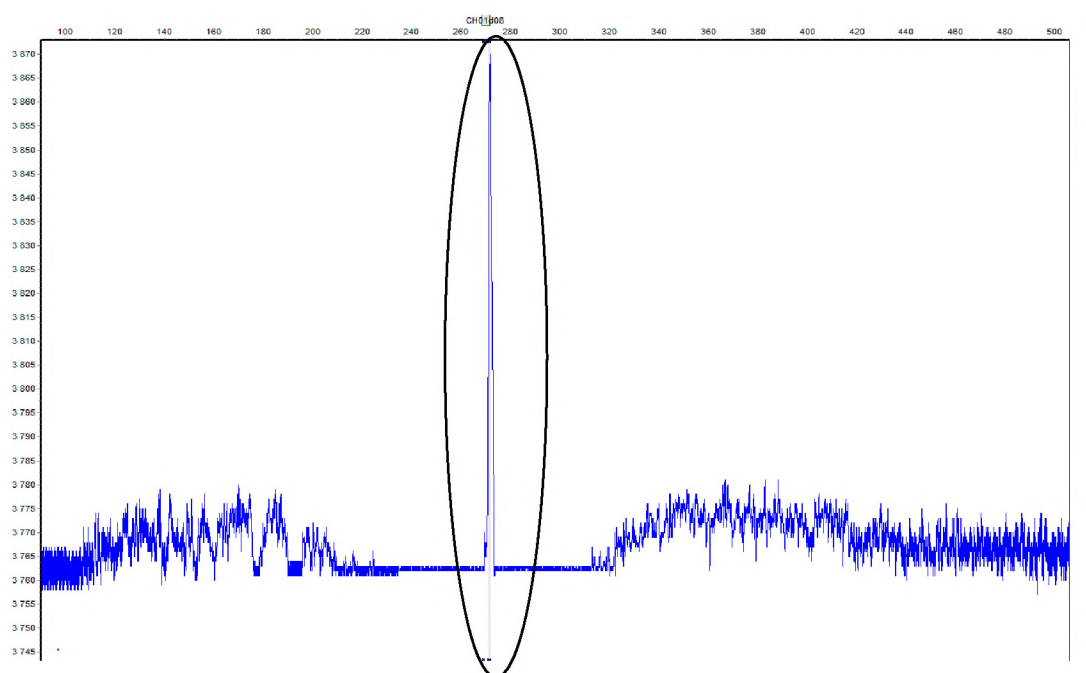


Рисунок 23 – Результаты фрагментного анализа по маркеру CH01d08

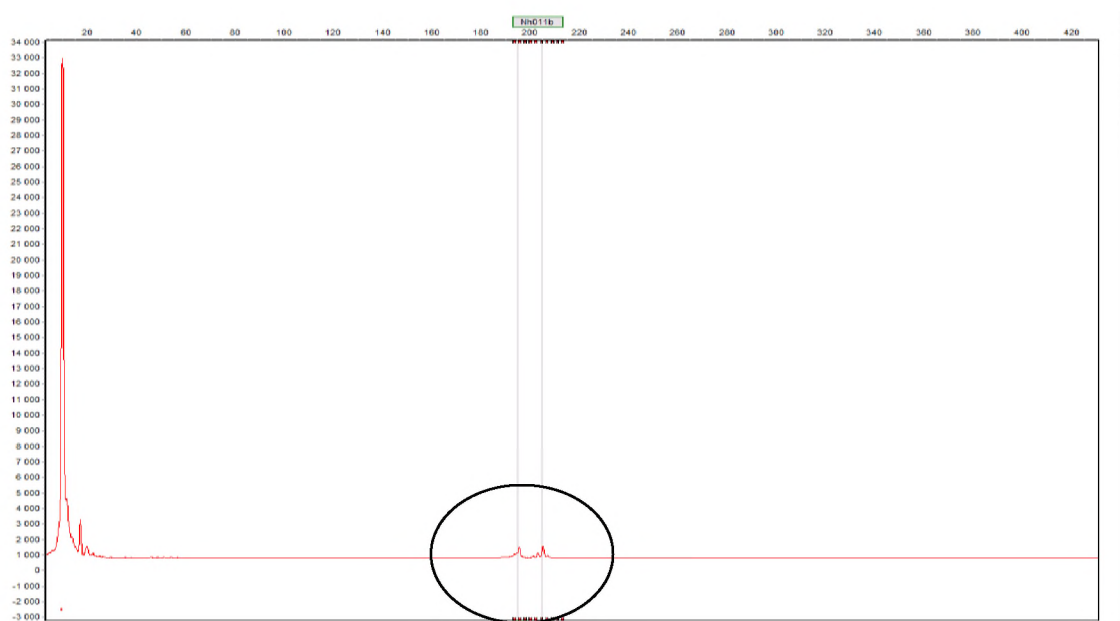


Рисунок 24 – Результаты фрагментного анализа по маркеру Nh011b

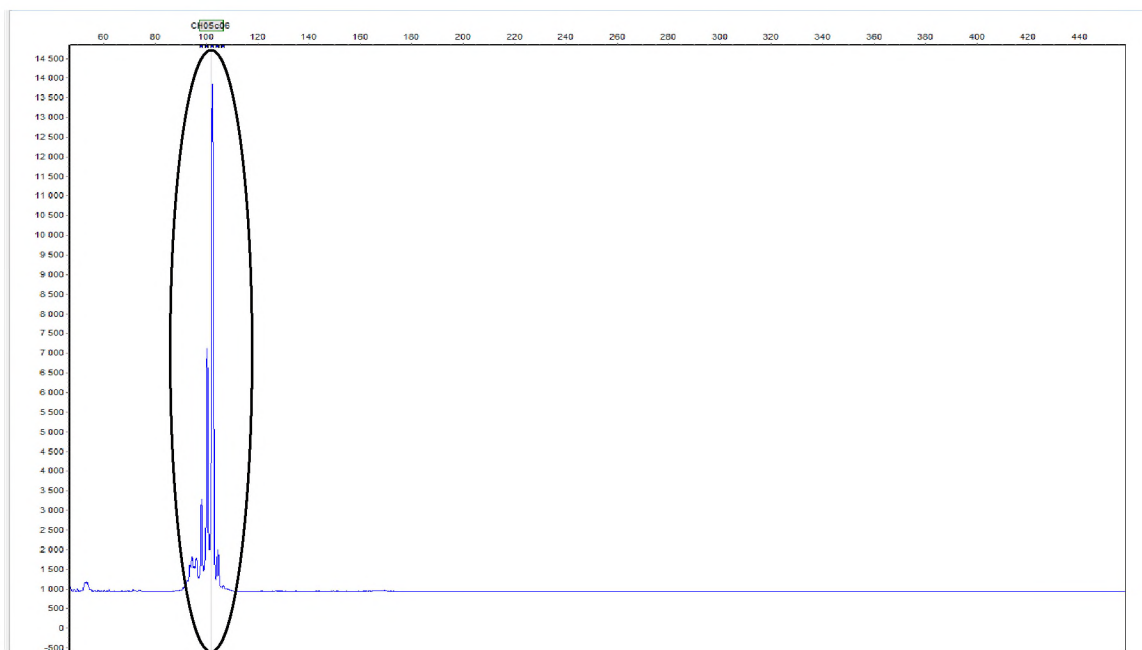


Рисунок 25 – Результаты фрагментного анализа по маркеру CH05c06

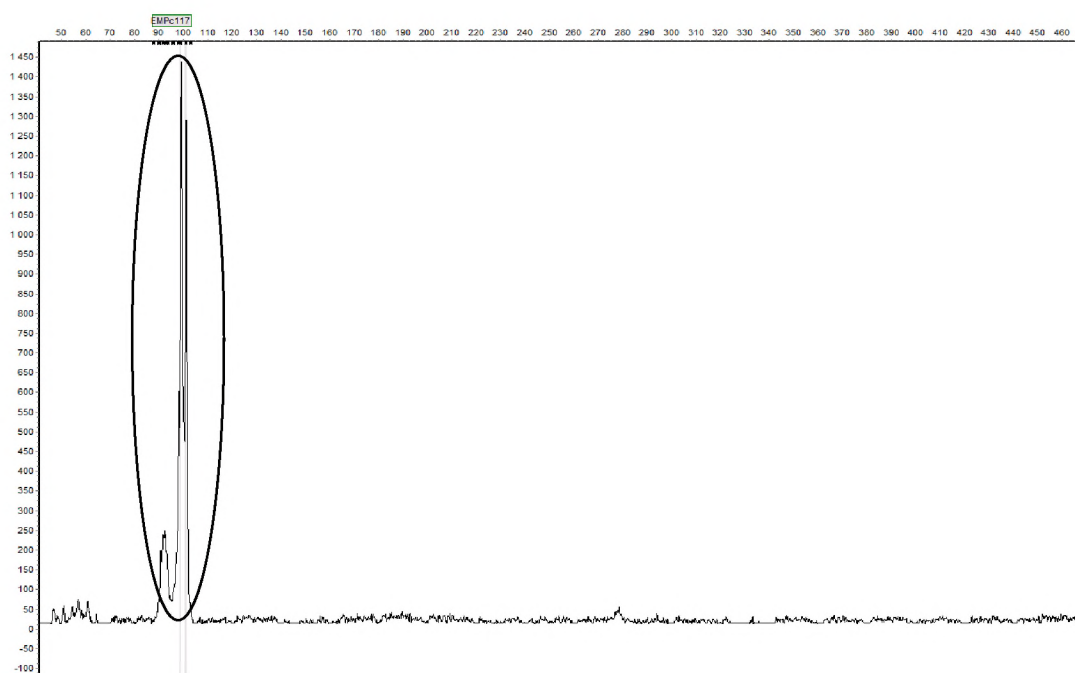


Рисунок 26 – Результаты фрагментного анализа по маркеру EMPc117

Также, в процессе обработки электрофореграмм, была определена количественная характеристика продуктов – интенсивность свечения фрагментов в ОФЕ (относительные флуоресцентные единицы). Данные по интенсивности сигнала флуоресценции приведены в таблице 11.

Таблица 11 – Интенсивность флуоресценции фрагментов апробированных ДНК-маркеров

Маркер	Интенсивность свечения в ОФЕ (относительные единицы флуоресценции)
CH01h01	24000
CH01d08	3850
Nh011b	2800
CH05c06	9000
EMPc117	1450
EMPc108	750
GD142	22000
CH01f07a	5250

Величина ОФЕ соответствует высоте пика на электрофореграмме и отражает эффективность протекания амплификации с искомыми ДНК-маркерами. Учитывая топологию пиков на электрофореграмме и величину ОФЕ к группе наиболее перспективных к использованию для генотипирования айвы ДНК-маркеров могут быть отнесены следующие: CH01h01, CH05c06, CH01f07a, Nh011b, GD142 и CH01d08. Маркеры EMPc117 и EMPc108 имеют наиболее низкие величины ОФЕ, что свидетельствует о наиболее низком уровне амплификации. Однако такой уровень также может быть достаточным для детекции амплифицированного фрагмента. Увеличить его количество можно путем увеличения циклов реакции.

Данные об интенсивности флуоресценции необходимо в дальнейшем учитывать при включении апробированных ДНК-маркеров в мультиплексные наборы для генотипирования айвы.

Следующим этапом являлась предварительная оценка полиморфизма апробированных. Для этого было выполнено генотипирование восьми образцов айвы (сорта и гибрид) по апробированным ДНК-маркерам.

Результаты генотипирования приведены в таблице 12 – приведены размеры амплифицированных фрагментов в парах нуклеотидов. По маркеру EMPc108 данные не учитывали в связи с низким уровнем амплификации по нему и нестабильной амплификацией – отсутствие продуктов по ряду образцов.

Таблица 12 – Аллельный полиморфизм апробированных SSR-маркеров

Сорт	Маркеры						
	CH01h01	CH01d08	Nh011b	CH05c06	EMPc117	GD142	CH01f07a
Руно	97	271	196:205	107	99:101	126:130	193
Софья	97	271	209:211	102:104	101	126:130	193
Дюна	97	269:271	211:213	107	99	130	193
Таманская	97	271	211	102:104	99:101	130	193
3-17-49	97	269:271	196:205	102:104	101	130	193
Солнце Кубани	97	269:271	205:213	102	101	130	193
Новогодняя	97	269:271	194:211	107	99	130	193:206
Благодатная	97	269:271	194:211	102	99	130	193:206

Как видно из таблицы 12, наиболее полиморфными являются маркеры Nh011b и CH05c06 – у них выявлено наибольшее количество аллелей на использованной выборке сортов айвы, наименее полиморфен маркер CH01h01 (1 аллель). У остальных маркеров выявлено по 2 аллеля.

Таким образом, по результатам апробации в качестве наиболее перспективных для микросателлитного генотипирования образцов айвы в качестве наиболее приоритетных можно рекомендовать ДНК-маркеры Nh011b и CH05c06. Они обладают наиболее высоким уровнем аллельного полиморфизма. Маркеры CH01d08, EMPc117, GD142 и CH01f07a, по которым выявили по два аллеля, в перспективе могут быть использованы на расширенной выборке, однако, высока вероятность того, что при их использовании для генотипирования генплазмы с низким уровне гетерогенности, уровень их информативности будет низким. Маркер CH01h01, по которому был выявлен один аллель, неперспективен к использованию при генотипировании айвы.

Наряду с полученными данными об уровне аллельного полиморфизма апробированных ДНК-маркеров, научную ценность имеют также данные о диапазоне размеров амплифицированных фрагментов. Это дает возможность выполнить исследования по разработке метода мультиплексного генотипирования, при котором в одной ПЦР реакции будет проводиться анализ по трем-четырем маркерам одновременно. С учетом полученной информации о размерах амплифицированных фрагментов, предварительно можно предложить следующие мультиплексные комбинации: №1: CH01d08+Nh011b+CH05c06; №2: EMPc117+GD142+CH01f07a. Из таблицы видно, что диапазоны размеров амплифицируемых фрагментов, входящих в мультиплексы, не перекрываются, что является одним из важных требований к маркерам, входящим в один мультиплексный набор.

Наряду с апробацией мультилокусных SSR-маркеров для генотипирования айвы выполнили апробацию и предварительную оценку уровня полиморфизма мультилокусных ISSR ДНК-маркеров в целях отбора наиболее перспективных для генотипирования образцов данного вида.

Была осуществлена апробация 8 ISSR-маркеров. В ходе апробации использовали четыре генотипа айвы (Солнце Кубани, гибрид 3-17-49, Благодатная, Таманская). В апробации генотипов айвы были использованы следующие ISSR-маркеры: UBC 810, UBC 849, UBC 864, UBC 868, UBC 873, 3A37, 3A39, 3A59.

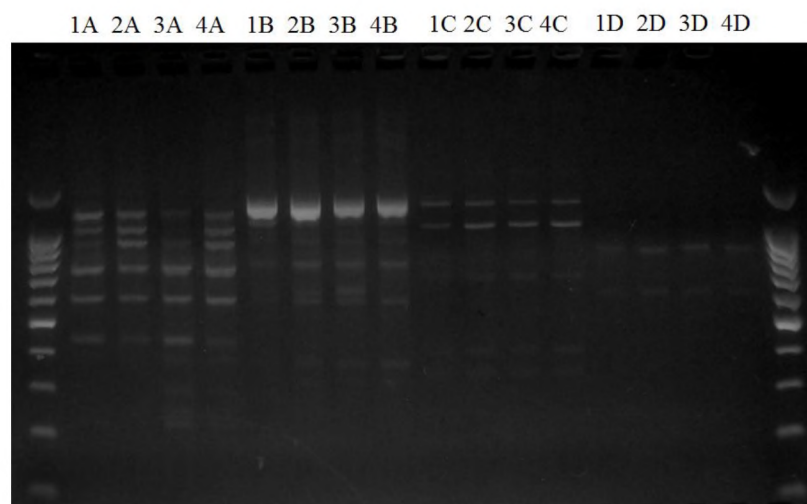
Результаты представлены на рисунках 27 и 28. Для отбора перспективных маркеров были обозначены следующие требования к ДНК-фингерпринтам (специфического ДНК-профиля характерного для генотипа): Количество амплифицированных ДНК-фрагментов, диапазон выявленных ДНК-фрагментов, качество амплификации ДНК-фрагментов и их полиморфность между сортами.

Характеристики использованных в работе маркеров представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Характеристики ISSR-маркеров

ISSR маркеры	Количество ДНК-фрагментов	Диапазон распределения ДНК-фрагментов (п.н.)
UBC 810	10	1200-450
UBC 849	5	1200-600
UBC 864	2	1200-1000
UBC 868	-	-
UBC 873	4	3000-550
3A37	2	1000-700
3A39	4	1500-300
3A59	3	1500-900

Приоритетными были ДНК-фингерпринты с большим количеством хорошо амплифицированных полиморфных ДНК-фрагментов в диапазоне от 3000 п. н. до 100 п. н. Исходя из указанных выше критериев в качестве перспективного для дальнейшей работы ISSR маркера нами был определен маркер UBC 810.



Примечания:

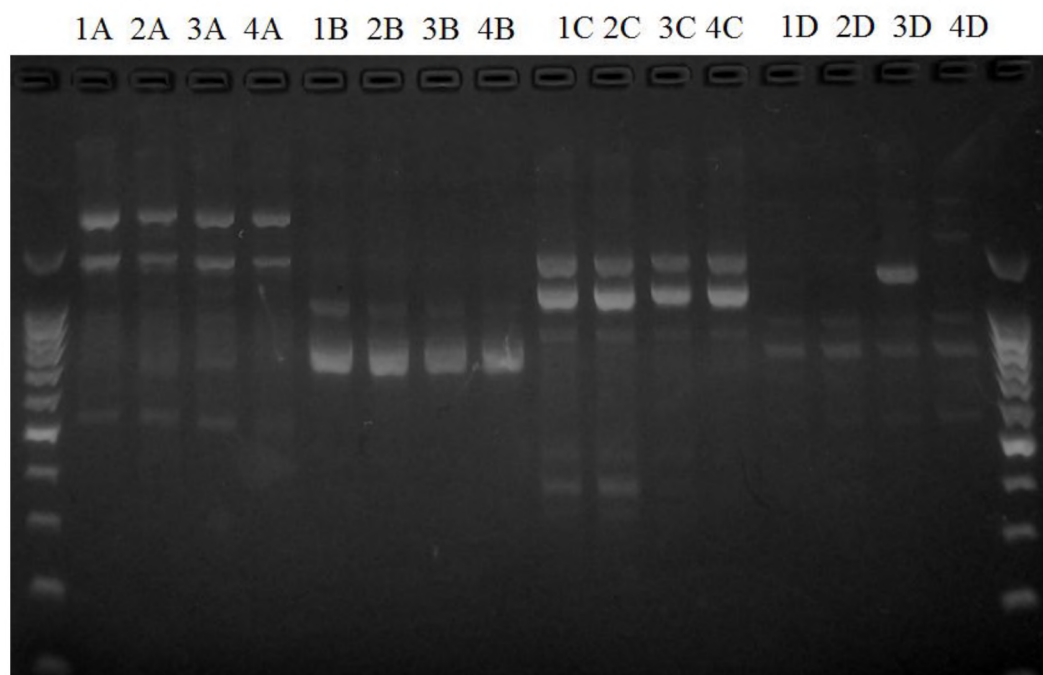
1 – Солнце Кубани,

2 – Гибрид 3-17-49,

3 - Благодатная,

4 - Таманская

Рисунок 27 – Апробация ISSR маркеров UBC 810 (A), UBC 849 (B), UBC 864 (C), UBC 868 (D) на генотипах айвы обыкновенной



Примечания:

1 – Солнце Кубани,

2 – Гибрид 3-17-49,

3 – Благодатная,

4 – Таманская

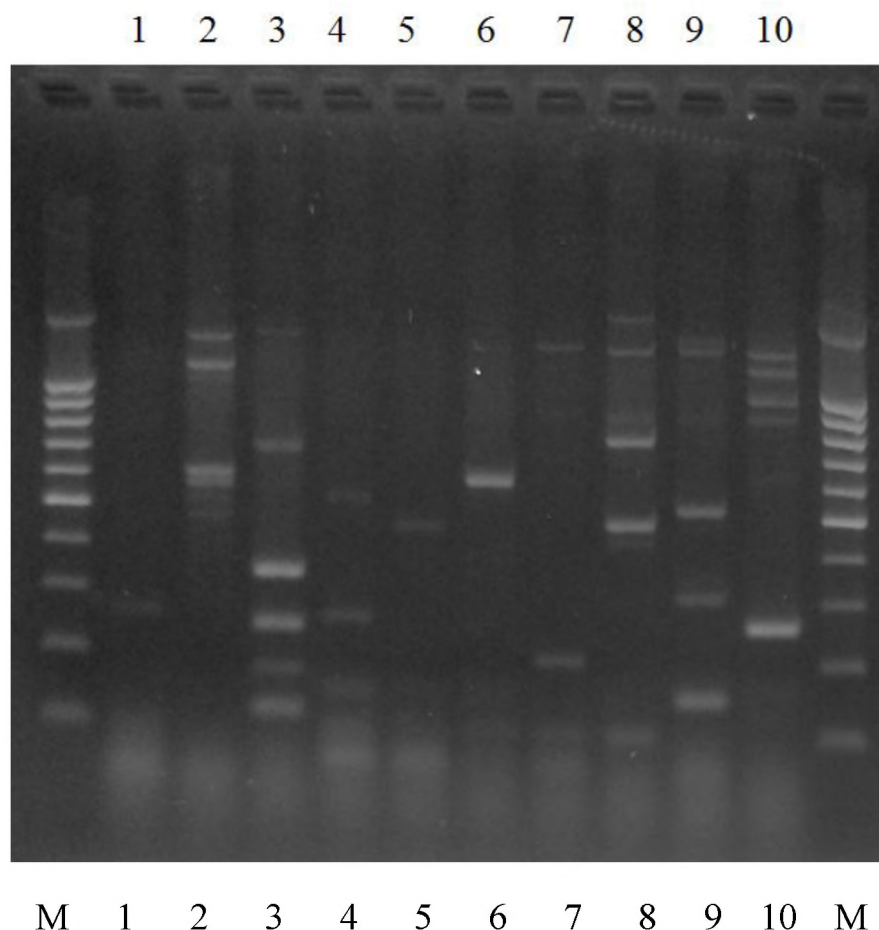
Рисунок 28 - Апробация ISSR маркеров UBC 873 (A), 3A37 (B), 3A39 (C), 3A59 (D) на генотипах айвы обыкновенной.

Полученные в работе результаты будут использованы в дальнейшем для проведения мультилокусного генотипирования сортов и селекционных форм айвы обыкновенной. Данные, полученные с применением мультилокусных маркеров, будут сочетаться с результатами SSR-генотипирования.

Помимо апробации ISSR и SSR-маркеров для генотипирования айвы была выполнена апробация мультилокусных SCoT – маркеров применительно к яблоне. Было апробировано 20 ДНК-маркеров на основе SCoT – праймеров. Применили оригинальный подход, направленный, одновременно с апробацией ДНК-маркеров, на разработку нового типа ДНК-маркеров, основанного на амплификации фрагментов, локализованных между стартовым кодоном ATG в геноме растений и микросателлитной последовательностью. Для этого использовали комбинацию SCoT праймера и ISSR праймера (использовали ISSR праймеры серии UBC) в одной реакции. Суммарно

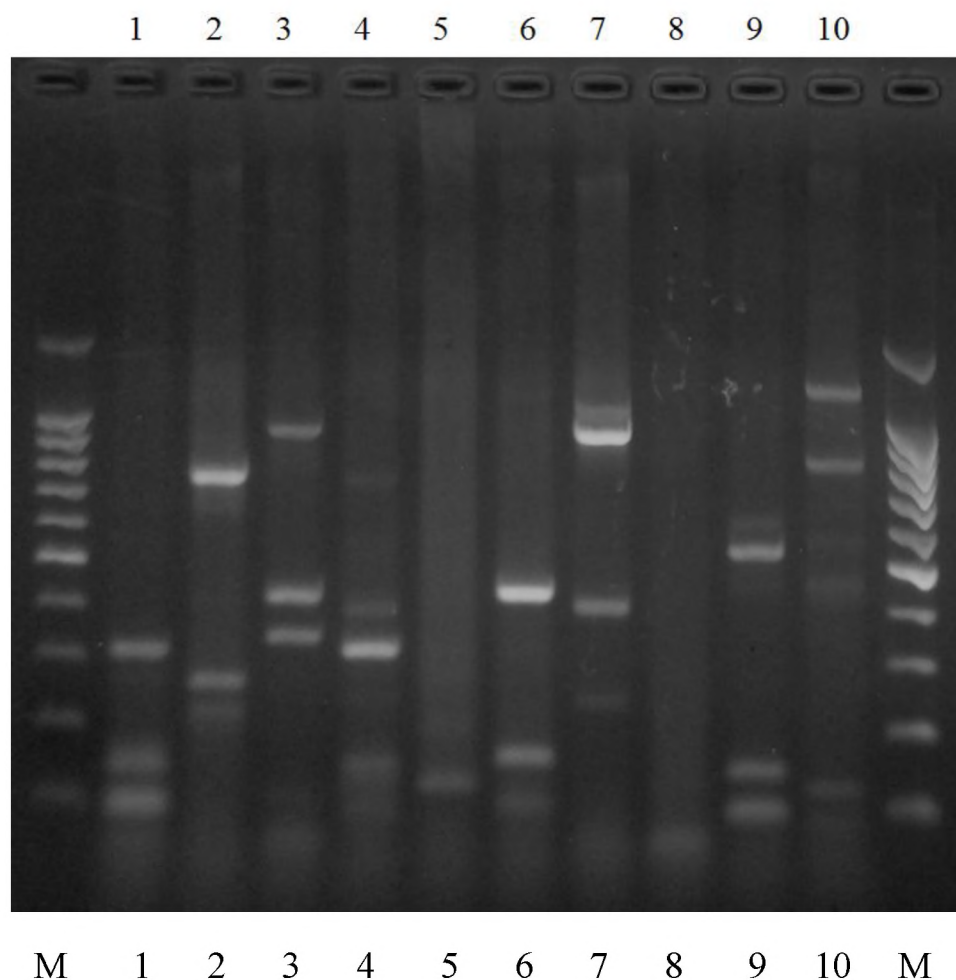
апробировали 20 ДНК-маркеров. Экспериментальным путем определили оптимальные условия ПЦР. Реакционная смесь включала: 1x Буфер, 0,32 mM каждого dNTP, по 0,32 µl каждого праймера (SCoT и ISSR), 1 ед. активности Taq полимеразы, 40 нг ДНК. Амплификацию проводили при следующих условиях, также оптимизированных в ходе выполнения исследований: 3 минуты при 95 °C – начальная денатурация, затем 42 цикла при следующих параметрах: 30 сек. при 95 °C - денатурация, 30 сек. При 48 °C – отжиг, 2 минуты при 72 °C – элонгация; этап финальной элонгации – 15 мин при 72 °C.

На рисунках 29 и 30 приведены результаты электрофоретического анализа (2,5% агарозный гель) продуктов амплификации разработанных ДНК-маркеров, полученные при оптимизированных условиях ПЦР.



Примечания: М – маркер молекулярной массы ДНК; 1 -10 апробируемые ДНК маркеры: 1 - SCoT18-UBC864, 2 - SCoT14-UBC864, 3 - SCoT19-UBC864, 4 - SCoT28-UBC864, 5 - SCoT1-UBC864, 6 - SCoT2-UBC864, 7- SCoT4-UBC864, 8 - SCoT6-UBC864, 9 - SCoT13-UBC864, 10 - SCoT20-UBC864

Рисунок 29 – Результаты апробации SCoT-STR ДНК-маркеров

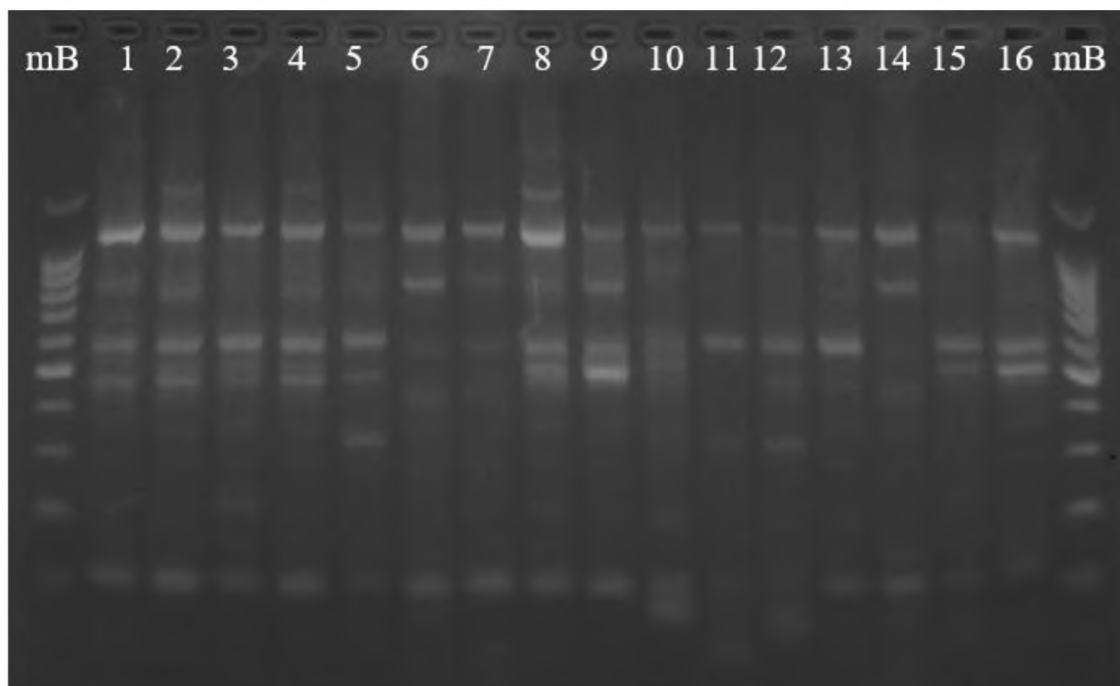


Примечания: М – маркер молекулярной массы ДНК; 1-10 апробируемые ДНК маркеры: 1 - SCoT18-UBC849, 2 - SCoT14-UBC849, 3 - SCoT19-UBC849, 4 - SCoT28-UBC849, 5 - SCoT1-UBC849, 6 - SCoT2-UBC849, 7 - SCoT4-UBC849, 8 - SCoT6-UBC849, 9 - SCoT13-UBC849, 10 - SCoT20-UBC849

Рисунок 30 – Результаты апробации SCoT -STR ДНК-маркеров

Результаты апробации выявили различные паттерны амплификации. В электрофоретических спектрах апробируемых маркеров было выявлено от отсутствия четких и дискретных фрагментов (маркер SCoT6-UBC849) или одного фрагментов (маркеры SCoT18-UBC864, SCoT1-UBC864) до пяти-шести фрагментов (маркеры SCoT19-UBC864, SCoT20-UBC864).

На следующем этапе было выполнено генотипирование выборки из 16 сортов яблони, включая сорта отечественной и зарубежной селекции в целях оценки перспективности использования маркеров для ДНК-паспортизации. На рисунке 31, для примера, приведены результаты электрофоретического разделения продуктов амплификации по маркеру SCoT 20-UBC849.



Примечания: mB – маркер молекулярной массы; 1-16 – сорта яблони: 1-Голд стар, 2 – Фуджи, 3 – Ренет Симиренко, 4 – Фуджи Кику, 5 – Женева Эрли, 6 – Рассвет, 7 – Либерти, 8 – Хоней крисп, 9 – Смеральда, 10 – Фуджион, 11 – Кримсон Крисп, 12 – Джеремини, 13 – Гренни Смит, 14 – Флорина, 15 – Кариот, 16 – Ренуар

Рисунок 31 – Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с использованием ДНК-маркера SCoT20-UBC849

По результатам анализа, было выявлено, что уже ДНК-профиль уже по двум маркерам обеспечивает уникальные, сортоспецифичные ДНК-паспорта в изученной выборке сортов. В таблице 1, в качестве примера, приведены ДНК-паспорта изученных сортов яблони по четырем ДНК-маркерам. В таблице 15 указан относительный размер амплифицированного фрагмента в парах нуклеотидов (п.н.). Размер подсчитывался исходя из положения фрагмента в спектре и относительно фрагментов маркера молекулярной массы, размеры фрагментов по которому известны.

Таблица 15 – ДНК-паспорта изученных сортов яблони

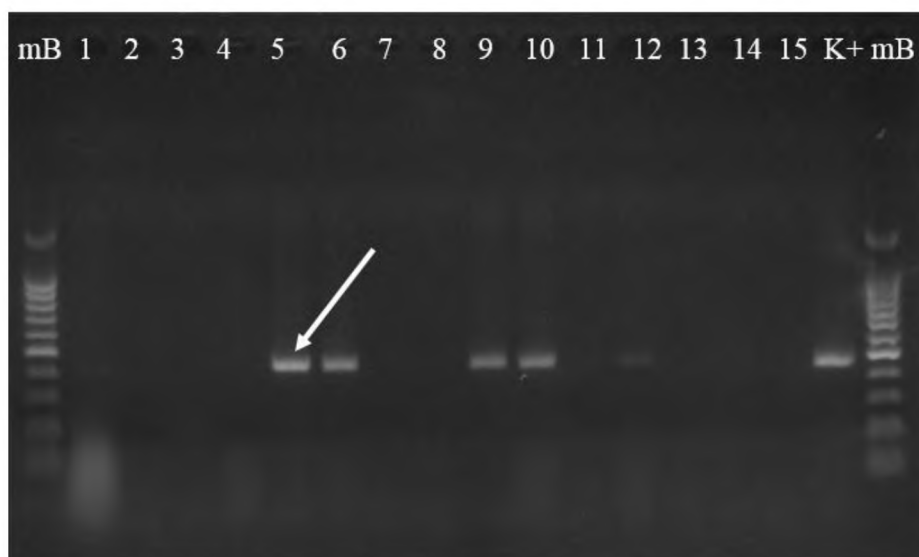
Сорт	Продукты реакции, п.н.			
	SCoT19-UBC864	SCoT20-BC864	SCoT19-UBC849	SCoT20-UBC849
Голд стар	1500, 780, 330, 240, 180, 120	1300, 1100, 250	1000, 420, 320	1200, 850, 590, 480, 110
Фуджи	1500, 780, 330, 240, 180	1300, 1000, 650, 250	1000, 420, 320	1500, 1200, 820, 590, 480, 110
Ренет Симиренко	780, 330, 240	1300, 1200, 250	1000	1200, 590, 500, 200, 110
Женева Эрли	780, 330, 180	1200, 350, 250	1200, 1000, 510, 420, 320	1200, 590, 500, 330, 110
Рассвет	780, 330, 240, 180	250	1000, 420, 320	1200, 850, 590, 440, 110
Либерти	1500, 780, 330, 240, 180	250	1000, 420, 320	1200, 850, 590, 110
Хоней крисп	1500, 780, 330, 240, 80	1300, 1200, 1000, 650, 250	1500, 1000, 320	1500, 1200, 820, 590, 500, 200, 110
Смеральда	1200, 780, 330, 240, 180, 120	1300, 1200, 1000, 570, 250	1000, 420, 320	1200, 850, 590, 500, 110
Фуджион	1500, 780, 330, 240, 180	570	1000, 920, 420	1200, 590, 500, 200
Кримсон Крисп			1200, 1000, 420	1200, 590, 200
Джеремини		1200, 500, 350, 240	1200, 1000, 420, 320	1200, 590, 500, 330
Гренни Смит	780, 330, 240	1200, 650, 350, 240	1000, 420, 320	1200, 590, 500, 110
Флорина	1500, 780, 330, 240, 180	1200, 650, 240	1000, 420, 320	1200, 850, 500, 110
Кариот		240	1000, 320	1200, 590, 500, 110
Ренуар	1500, 780, 330, 240, 180, 120	1300, 1200, 1000, 500, 240	1000, 420, 320	1200, 590, 500

Полученные результаты позволяют говорить о высоком уровне информативности и перспективности использования разработанных ДНК-маркеров для целей сортовой идентификации яблони. Существенным преимуществом данных ДНК-маркеров является низкая себестоимость выполнения анализа, в сравнении с микросателлитными ДНК-маркерами.

2.3.3 Молекулярно-генетическая паспортизация генотипов яблони по аллелям гена самонесовместимости

Был выполнен анализ аллельного полиморфизма S-гена, детерминирующего совместимость при опылении с использованием аллель-специфичных SCAR ДНК-маркеров. Проводили генотипирование по следующим аллелям данного гена: S2, S3 и S5. Данные аллели S-гена являются наиболее распространенными в мировой генплазме яблони, поэтому, на данном этапе исследования, они были определены в качестве целевых.

Получены результаты молекулярно-генетической идентификации целевых аллелей гена самонесовместимости для 21 образца яблони (сорта мировой селекции, перспективные гибридные формы селекции СКФНЦСВВ). В изученной выборке образцов идентифицировали все целевые аллели. На рисунках 32-33 представлены результаты ПЦР идентификации целевых аллелей у изучаемых образцов.



Примечания: mB-маркер молекулярного веса ДНК; K+ - сорт контроль (Pink lady); 1 –15 Исследуемые сорта и гибриды яблони: 5 - Эвелина, 6 – Иноред, 9 – Восторг, 10 – Гала Маст, 12 – Корнет

Рисунок 32 – Идентификация аллели S2 у образцов яблони



Примечания: mB-маркер молекулярного веса ДНК; K1,2 - сорта контроли (K1-Либерти, K2- Гала); 10 – Гала Маст, 14 – 2рк 7 м., 15 – Одиссо, 18 – 30-61-110

Рисунок 33 – Идентификация аллели S5 у образцов яблони

Выявление фрагмента на электрофореграмме на уровне, отмеченном стрелкой, соответствующем стандартному образцу, свидетельствует о наличии искомого аллеля гена самонесовместимости, отсутствие фрагмента - об отсутствии аллеля. В ходе исследования идентифицировали все целевые аллели. Результаты генотипирования изученной выборки генотипов яблони по локусу S-гена представлены в таблице 16.

Таблица 16 – ДНК-паспорта сортов и гибридов яблони по трем аллелям гена самонесовместимости

№ п/п	Сорт/гибрид	S аллель		
		S2	S3	S5
1	Эвелина	+	+	-
2	Есения	-	-	-
3	Байя Марисса	-	-	+
4	Вайнпро	-	+	-
5	Эвелина	+	-	-
6	Иноред	+	+	-
7	15-1-34	-	-	+
8	14-2-5	-	-	-
9	Восторг	+	-	-
10	Гала Маст	+	-	+
11	15-1-7	-	-	+
12	Корнет	+	+	-

Продолжение таблицы 16

13	Блади плаумен	-	+	-
14	17-1-11	-	-	+
15	Одиссо	-	-	+
16	Созвездие	-	+	-
17	14-3-12	-	+	-
18	30-61-110	-	-	+
19	Приокское	-	-	-
20	16-2-34	-	-	-
21	Поэзия	+	+	-

На основании полученных результатов выполнили анализ частоты встречаемости искомых аллелей. На рисунке 34 представлена информация о частоте встречаемости искомых аллелей.

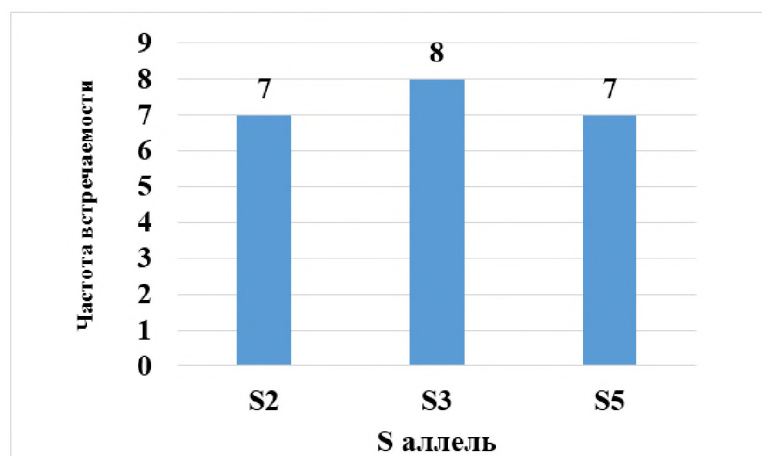


Рисунок 34 – Частота встречаемости аллелей S-гена в изученной выборке образцов яблони

Как видно из таблицы 16 и рисунка 34 аллели идентифицируются примерно с одинаковой частотой встречаемости. Наиболее распространена аллель S3. У четырех сортов идентифицировались 2 аллеля S2 и S3 одновременно (Эвелина, Иноред, Корнет, Поэзия). У сорта Гала маст идентифицировались аллели S2+S5, что согласуется с его принадлежностью к группе клонов сорта Гала. Примечательно, что гибриды 15-1-34 и 15-1-7, у которых идентифицирована аллель S5, имеют в качестве одной из родительских форм сорт Гала маст. Наличие аллеля S5 объясняется его наследованием от данного сорта.

Таким образом, по результатам работы были получены данные о встречаемости аллелей S2, S3 и S5 у изученных образцов яблони. Эти данные представляют ценность не только для прогнозирования эффективности их опыления с другими сортами, но также являются их ДНК-паспортом.

2.3.4 Генотипирование сортов и форм абрикоса из разных эколого-географических групп и природных популяций Дагестана и анализ их генетических взаимосвязей

Для генотипирования сортов и природных форм абрикоса обыкновенного нами был проведен отбор эффективных CDDP-маркеров путем их апробации на генотипе распространенного в садоводческой практике сорта Шалах. В ходе апробации 16-ти CDDP-маркеров были выявлены праймеры перспективные для дальнейшего использования в генотипировании образцов абрикоса обыкновенного. Наряду с этим, были оптимизированы условия ПЦР и электрофореза для апробированных ДНК-маркеров. Реакционная смесь включала: 1х Буфер, 0,35 mM каждого dNTP, по 0,3 µl каждого праймера, 1 ед. активности Taq полимеразы, 40 нг ДНК. Амплификацию проводили при следующих условиях, также оптимизированных в ходе выполнения исследований: 3 минуты при 95 °C – начальная денатурация, затем 42 цикла при следующих параметрах: 30 сек. при 95 °C - денатурация, 30 сек. При 45 °C – отжиг, 2 минуты при 72 °C – элонгация; этап финальной элонгации – 15 мин при 72 °C.

В качестве критериев отбора перспективных маркеров послужили следующие характеристики установленных ДНК-фингерпринтов (специфического ДНК-профиля характерного для генотипа): Количество амплифицированных ДНК-фрагментов, диапазон выявленных ДНК-фрагментов и качество амплификации ДНК-фрагментов.

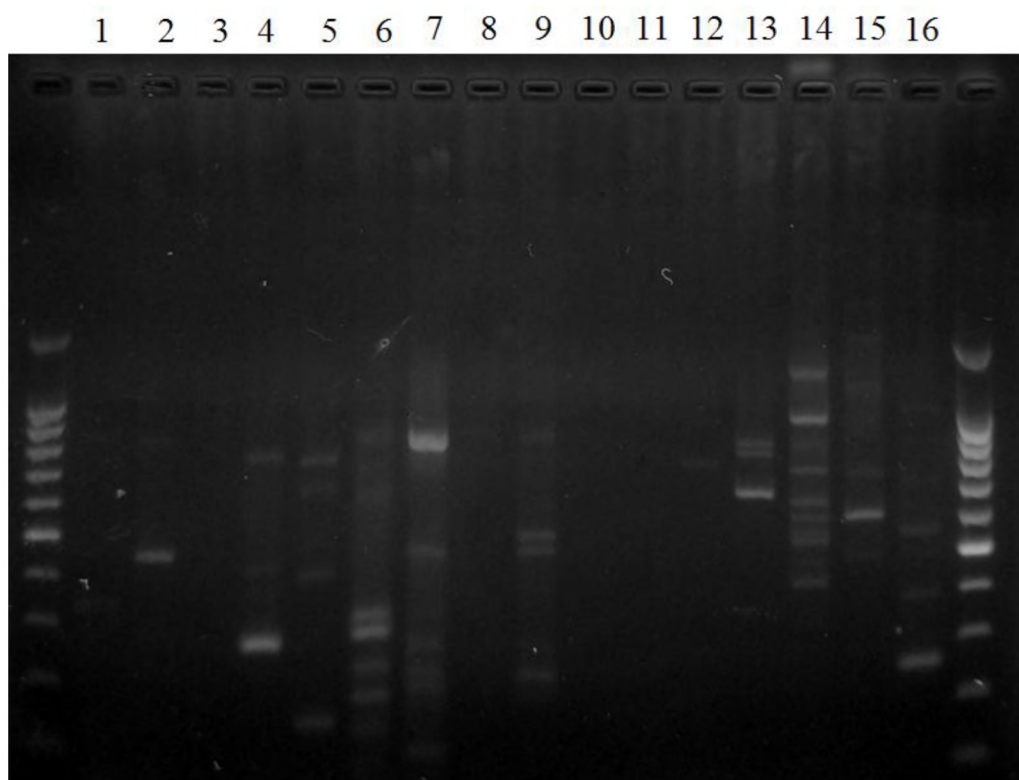
Приоритетными были ДНК-фингерпринты с большим количеством хорошо амплифицированных ДНК-фрагментов в диапазоне от 3000 п н до

100 п н. Исходя из указанных выше критериев нами были определены три группы апробированных маркеров.

Третья группа – отсутствие амплификации.

Вторая группа – слишком маленькое количество амплифицированных ДНК-фрагментов (от 1 до 4) или (и) плохая амплификация синтезированных ДНК-фрагментов выраженная в яркости бэндов при проведении электрофореза, который проводили в 2,5% в агарозном геле.

В первую группу вошли маркеры устраивающие исследование по трем выше указанным критериям. На рисунке 35 отображены результаты апробации 16 CDDP-маркеров на сорте Шалах.



Примечания: 1 - *ERF 2*, 2 - *ERF 3*, 3 - *KNOX 1*, 4 - *KNOX 2*, 5 - *KNOX 3*, 6 - *MADS 1*, 7 - *MADS 2*, 8 - *MADS 3*, 9 - *WRKY F1*, 10 - *WRKY R1*, 11 - *WRKY R2*, 12 - *WRKY R2B*, 13 - *WRKY R3B*, 14 - *MgB 1*, 15 - *MgB 2*, 16 - *ERF 1*

Рисунок 35 – Электрофореграмма результатов апробации 16 CDDP-маркеров на сорте Шалах

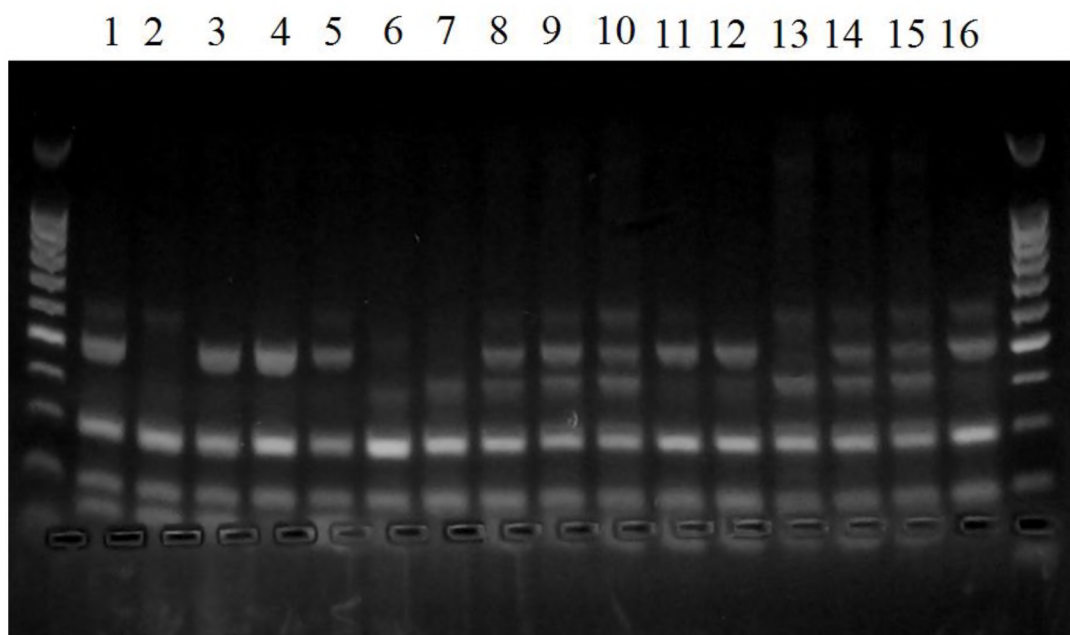
Исходя из результатов апробации CDDP-праймеров, маркеры были распределены по группам, отражающим перспективность их использования для генотипирования следующим образом:

Первая группа (наибольший уровень приоритета и перспективности) включала маркеры MADS 1 и MgB 1;

Во вторую группу были отнесены маркеры ERF 3, KNOX 2, KNOX 3, MADS 2, WRKY F1, WRKY R3B, MgB 2, ERF 1;

Третья группа содержала маркеры ERF 2, KNOX 1, MADS 3, WRKY R1, WRKY R2, WRKY R2B.

Так как указанным требованиям качества мультилокусных маркеров соответствовали 2 (MADS 1 и MgB 1) из 16 апробированных маркеров, они были отобраны для последующего генотипирования 16 генотипов абрикоса обыкновенного. Выборка образцов включала 6 сортов абрикоса различного эколого-географического происхождения и 10 генотипов абрикоса отобранного в природной популяции близ селения Салта расположенного в Гунибском районе в горной части Дагестана. Шесть задействованных в работе сортов относятся к следующим эколого-географическим группам: европейская (Краснощёкий), ирано-кавказская (Чамастик и Шалах), среднеазиатская (Супханы и Алтайский), китайская (Hong Yu). Результаты генотипирования всей выборки сортов представлены на рисунках 36 и 37.



Примечания: 1-Краснощёкий, 2 – Чамастик, 3 – Супханы, 4 – Алтайский, 5 – Шалах 6 – Hong Yu, 7 – 16 Образцы-отборы в окрестностях с. Салта

Рисунок 36 – Электрофореграмма продуктов ПЦР с использованием праймера MADS1



Примечания: 1-Краснощёкий, 2 – Чамастик, 3 – Супханы, 4 – Алтайский, 5 – Шалах 6 – Hong Yu, 7 – 16 Образцы - отборы в окрестностях с. Салта

Рисунок 37 – Электрофореграмма продуктов ПЦР с использованием праймера MgV1

Полученные в ходе генотипирования ДНК-фингерпринты были проанализированы и отображены в виде таблицы 1. В таблице для каждого образца обозначены установленные у него ДНК-фрагменты, в виде размеров этих фрагментов, выраженных в парах нуклеотидов (п. н.). Размеры ДНК-фрагментов носят относительный характер, что связано с разрешающими возможностями метода разделения нуклеиновых кислот в агарозном геле (15-25 п. н.).

Основываясь на данных ДНК-фингерпринтов 16 генотипов абрикоса, была проведена кластеризация методом UPGMA с использованием коэффициента Дайса.

Таблица 17 - ДНК-фингерпринты исследованных сортов и форм абрикоса обыкновенного

Сорт, форма	Продукты реакции, п.н.	
	MADS1	MgB1
Краснощёкий	600,500, 300, 190, 110	1300, 1000, 860, 750, 610, 520, 400
Чамастик	600, 300, 190, 110	1300, 1000, 860, 750, 610, 520, 400
Супханы	500, 300, 190, 110	1300,1000, 860, 750, 400
Алтайский	500, 300, 190	1300, 1000, 860, 600, 500, 400
Шалах	500, 300, 190, 110	1300, 1000, 600, 500, 400
Hong Yu	390, 300, 190, 110	1300, 1000, 800, 600, 400
Салта 1	400, 300, 190, 110	1000, 850, 500, 400, 200
Салта 2	600, 500, 400, 300, 190, 110	1000, 850, 750, 600, 500, 400, 200
Салта 3	600, 500, 400, 300, 190, 110	1000, 850, 750, 600, 500, 400, 200
Салта 4	600, 500, 400, 300, 190, 110	1000, 850, 750, 600, 500, 400, 200
Салта 5	500, 300, 190, 110	1000, 850, 600, 500, 400, 200
Салта 6	500, 300, 190, 110	1000, 850, 750, 600, 500, 400, 200
Салта 7	1300, 600, 400, 300, 190, 110	1000, 850, 750, 600, 500, 400, 200
Салта 8	600, 500, 400, 300, 190, 110	1000, 850, 750, 600, 500, 400, 200
Салта 9	600, 500, 400, 300, 190, 110	1000, 850, 750, 600, 500, 400, 200
Салта 10	600, 500, 300, 190	1000, 850, 750, 600, 550, 450, 400

Дендрограмма созданная в ходе кластеризации методом UPGMA была сформирована тремя кластерами. Два кластера включали сорта, третий кластер был представлен образцами абрикоса обыкновенного отобранными из природной популяции близ селения Салта.

Кластеризация 16 генотипов абрикоса обыкновенного представлена в виде дендрограммы на рисунке 38.

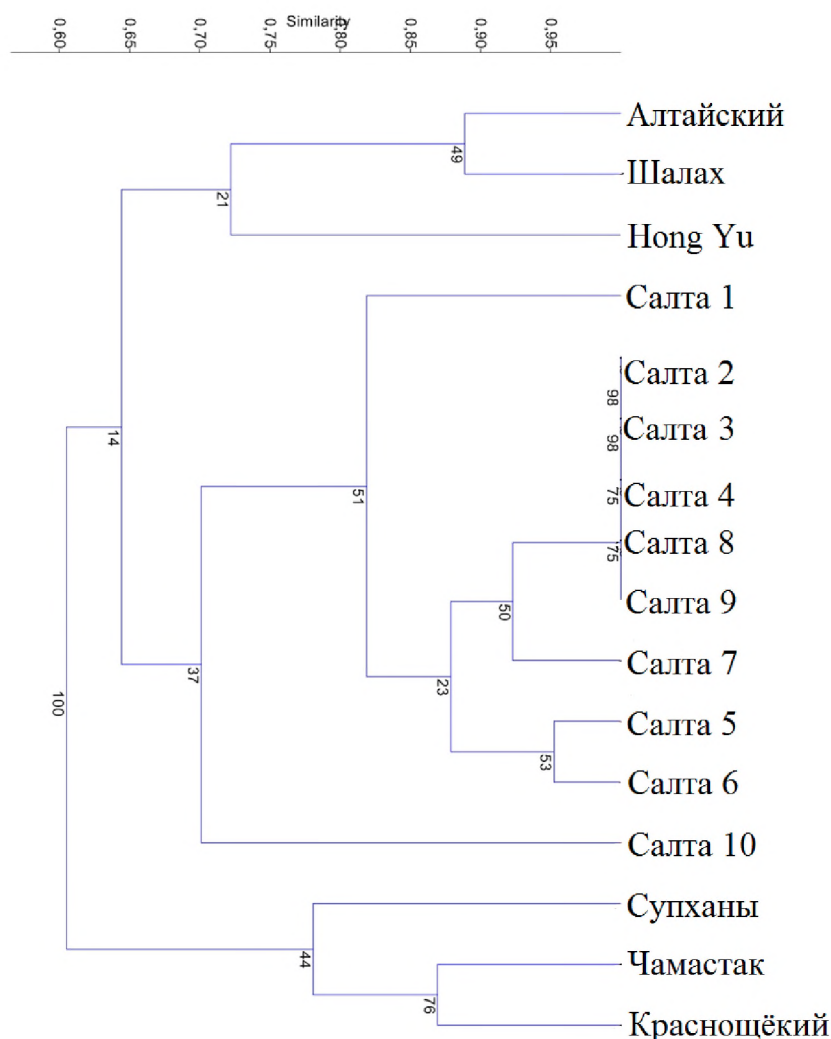


Рисунок 38 – Кластеризация 16 генотипов абрикоса обыкновенного методом UPGMA

Первый кластер включал сорт Алтайский, имеющий алтайское происхождение, классический сорт Шалах армянской селекции и китайский сорт Hong Yu.

Второй кластер представлен дагестанским сортом Чамастак, среднеазиатским сортом Супханы и европейским сортом Краснощёкий. Таким образом, использованные в работе сорта не образуют каких-либо обособленных групп исходя из их эколого-географического положения.

В свою очередь, третья группа включает все формы из естественной популяции Дагестана. Стоит отметить, что образцы из дагестанской популяции не занимают внешнего положения относительно культурных

сортов абрикоса на дендрограмме и располагаются между первым и вторым кластером в виде обособленной группы. Данный факт может свидетельствовать о происхождении популяции из Салта, представленной в исследовании 10 образцами, от одичавших культурных форм абрикоса.

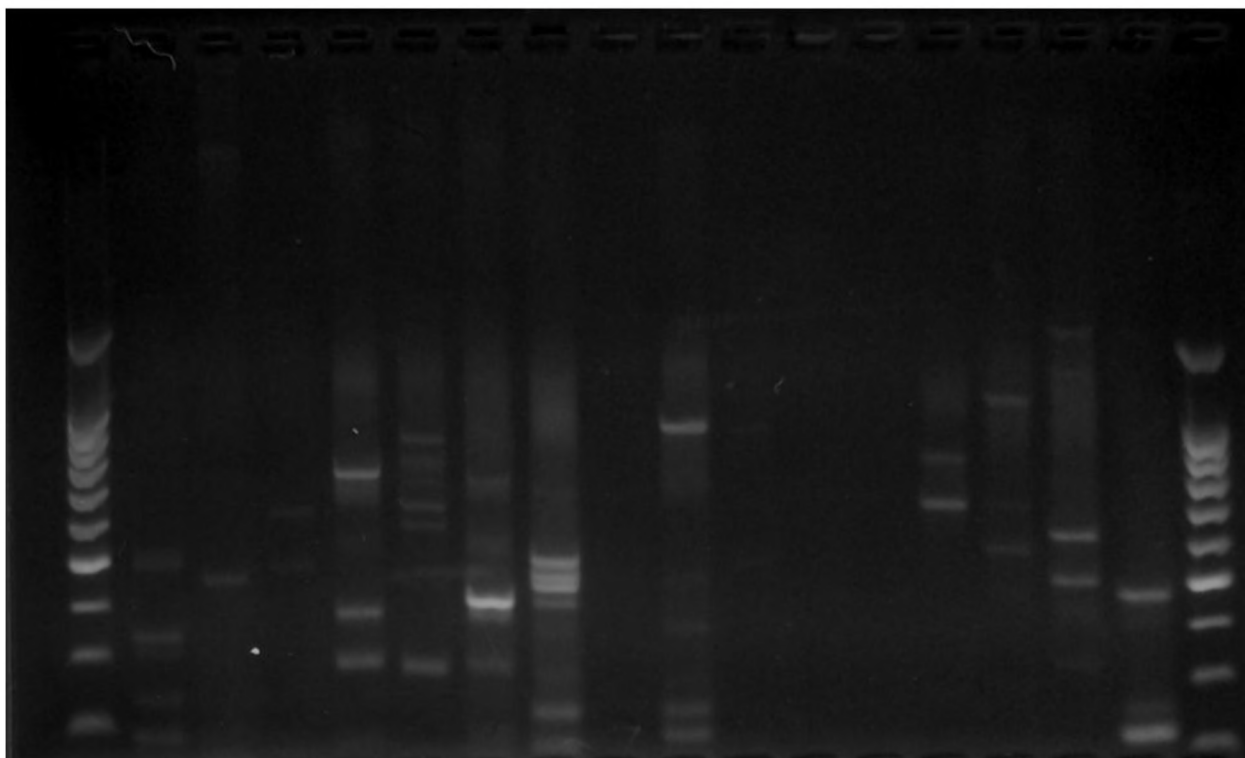
Таким образом, на данном этапе исследования нами была проведена апробация 16 CDDP-маркеров позволившая отобрать два перспективных ДНК-маркера для последующего генотипирования 16 образцов абрикоса для оценки генетических взаимоотношений между сортами мировой селекции и формами абрикоса из природной популяции Дагестана. Полученные сведения будут использованы для последующей работы направленной на изучение генетического потенциала генофонда абрикоса из Дагестана.

2.3.5 Молекулярно-генетический анализ современных и автохтонных сортов винограда и изучение их генетических взаимосвязей

Для проведения генотипирования сортов винограда была предварительно осуществлена оценка перспективности применения 16 CDDP маркеров.

В работе были задействованы следующие CDDP маркеры: ERF 1, ERF 2, ERF 3, KNOX 1, KNOX 2, KNOX 3, MADS 1, MADS 2, MADS 3, WRKY F1, WRKY R1, WRKY R2, WRKY R2B, WRKY R3B, MgB 1, MgB 2. Результаты апробации CDDP маркеров представлены на рисунке 39.

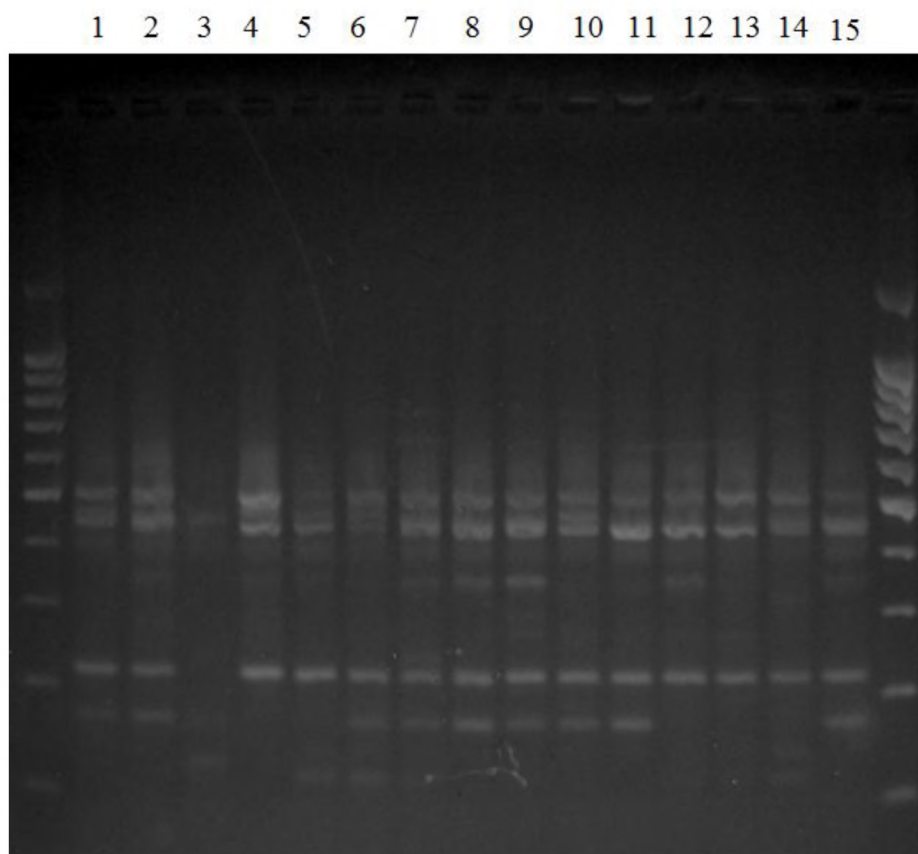
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



Примечания: 1 - ERF 2, 2 - ERF 3, 3 - KNOX 1, 4 - KNOX 2, 5 - KNOX 3, 6 - MADS 1, 7 - MADS 2, 8 - MADS 3, 9 - WRKY F1, 10 - WRKY R1, 11 - WRKY R2, 12 - WRKY R2B, 13 - WRKY R3B, 14 - MgB 1, 15 - MgB 2, 16 - ERF 1

Рисунок 39 – Апробация CDDP маркеров на генотипе винограда

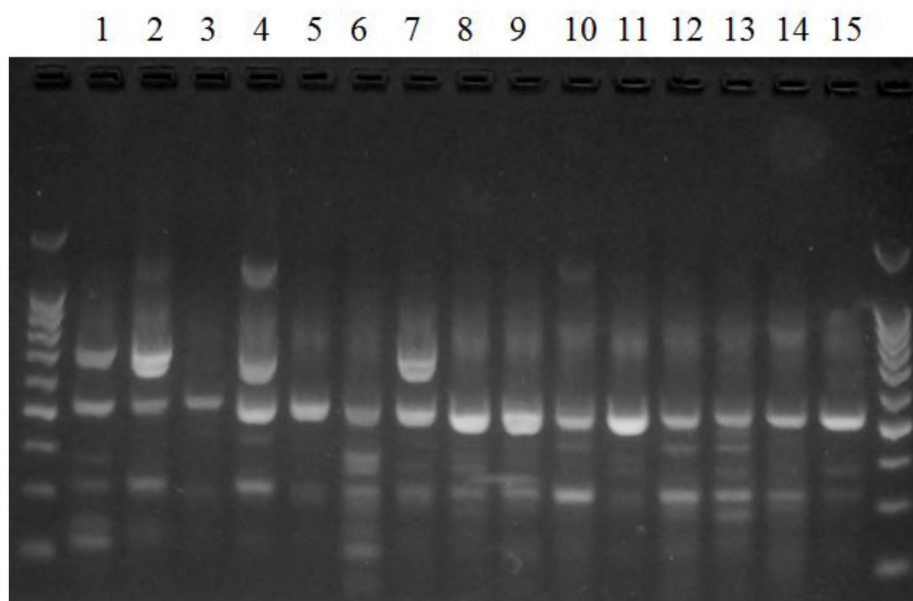
При сопоставлении качества ДНК-фингерпринтов CDDP маркеров полученных в ходе их апробации на генотипе винограда Агадаи были выделены четыре перспективных для дальнейшего использования CDDP маркера: KNOX 2, KNOX 3, MADS 1, MADS 2. Четыре маркера не показали амплификации на генотипе винограда: KNOX 1, WRKY R1, WRKY R2, WRKY R2B. По одном из отобранных маркеров (MADS 2) было проведено генотипирование 15 сортов винограда культурного. 13 сортов из выборки имели дагестанское происхождение, два отобранных образца являлись европейскими сортами (Шардоне и Совиньон Блан). Результаты генотипирования сортов винограда по маркеру MADS 2 отображены на рисунке 40.



Примечания: 1 – Хатми, 2 - Гулеби дагестанский, 3 – Шардоне, 4 - Совиньон Блан, 5 – Дольчатый, 6 - Аг изюм, 7 – Нарма, 8 - Заря Дербента, 9 – Эльдар, 10 - Мускат транспортабельный, 11 - Жемчужина Юга, 12 – Агадаи, 13 – Булатовский, 14 – Везне, 15 - Леки

Рисунок 40 – Генотипирование 15 сортов винограда по маркеру MADS 2

Дополнительно для генотипирования данной выборки сортов были отобраны 4 IRAP маркера (DKS 007, DKS 014, DKS 019, DKS 024) из работы Strioto D. K. et al 2019 года. На рисунке 41 показана электрофореграмма, отображающая ДНК-фингерпринты 15 сортов винограда по маркеру DKS 007.



Примечания: 1 – Хатми, 2 - Гулеби дагестанский, 3 – Шардоне, 4 - Совиньон Блан, 5 – Дольчатый, 6 - Аг изюм, 7 – Нарма, 8 - Заря Дербента, 9 – Эльдар, 10 - Мускат транспортабельный, 11 - Жемчужина Юга, 12 – Агадаи, 13 – Булатовский, 14 – Везне, 15 - Леки

Рисунок 41 - ДНК-фингерпринты 15 сортов винограда по маркеру DKS 007

Результаты ДНК-генотипирования образцов винограда культурного позволили построить дендрограмму с использованием метода UPGMA. Созданная UPGMA методом дендрограмма распределения 15 сортов винограда отображена на рисунке 42.

Наиболее генетически отдаленными сортами выступили Дольчатый и Аг изюм, Агадаи и Булатовский. Остальные сорта, представленные в выборке, были распределены между тремя кластерами. В первый кластер вошли три сорта дагестанского происхождения Жемчужина Юга, Леки и Везне. Второй кластер сформирован сортами Заря Дербента, Эльдар, Мускат транспортабельный, Шардоне, Хатми. Третий кластер состоит из сортов Нарма, Гулеби дагестанский и Совиньон Блан. Как видно из распределения сортов по установленным кластерам европейские сорта не выделяются из общего массива сортов дагестанского происхождения, что может свидетельствовать о влиянии европейского генофонда винограда культурного на формирование сортимента дагестанского винограда.

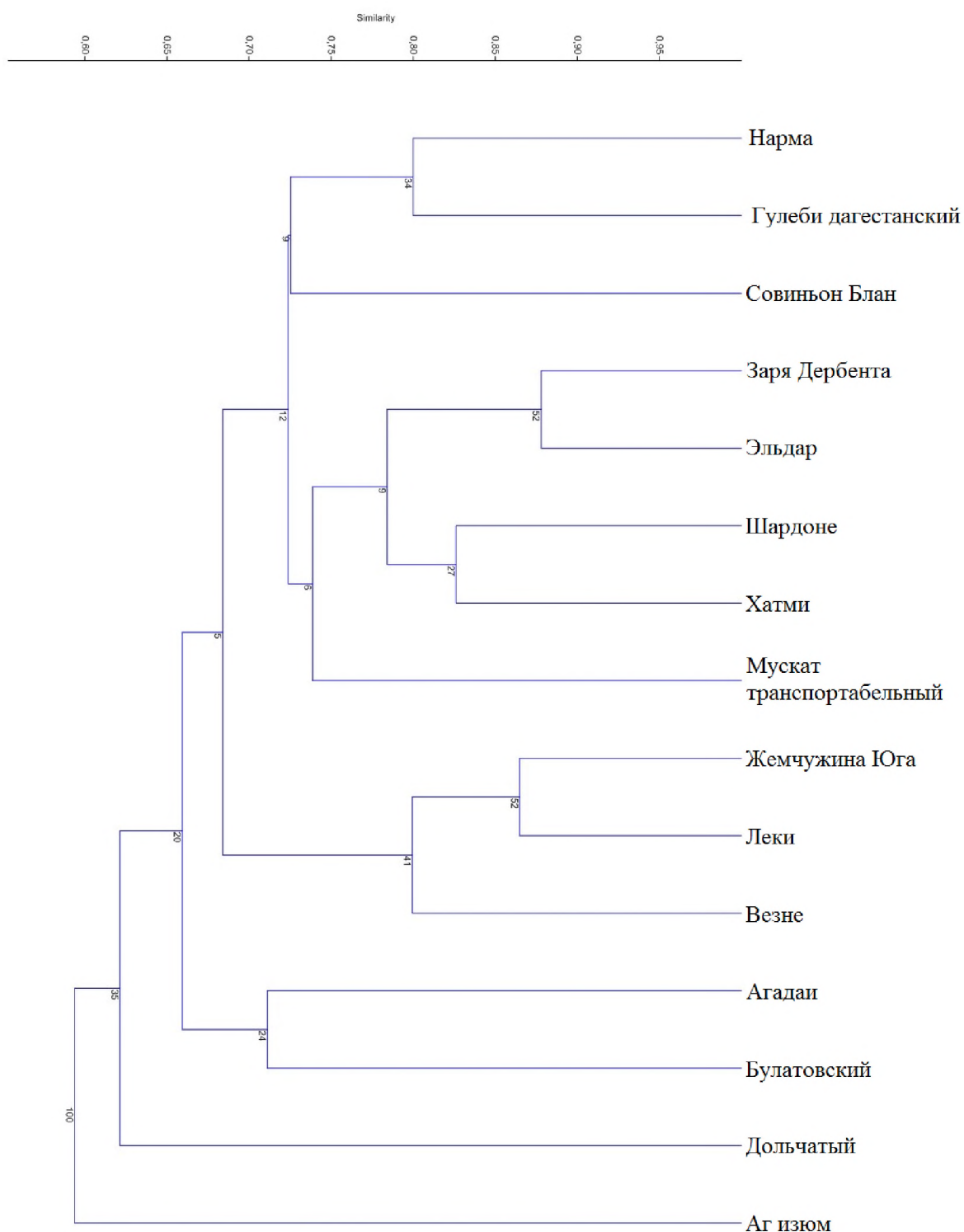


Рисунок 42 – Дендрограмма распределения 15 сортов винограда методом UPGMA

Таким образом, на первоначальном этапе исследовательской работы была проведена апробация 20 мультилокусных ДНК-маркеров (16 CDDP и 4 IRAP) на аборигенных сортах из Дагестана с последующей предварительной

оценкой их генетических взаимосвязей с современными европейскими сортами. В дальнейшем планируется расширение выборки сортов и количества задействованных в ДНК-анализе маркеров для более детального исследования генетических взаимоотношений сортов европейского и дагестанского происхождения.

2.4 Выводы

Таким образом, в ходе выполненных исследований:

- разработан метод молекулярно-генетической идентификации генов хозяйственно-ценных признаков на основе использования мультиплексной ПЦР (ген устойчивости к парше Rvi6, гены, контролирующие признаки качества плодов Md-Exp7, Md-PG-1) и паспортизации генотипов. Метод позволяет проводить одновременную идентификацию целевых генов при постановке одной реакции;
- выполнена экспериментальная апробация и оценка полиморфизма 36 локуспецифичных (8 SSR-маркеров) и мультилокусных (20 маркеров на основе SCoT праймеров; 8 ISSR ДНК-маркеров) ДНК-маркеров применительно к семечковым культурам (айва, яблоня);
- выявлены информативные SCoT ДНК-маркеры, перспективные для генотипирования сортов яблони, а также ISSR и SSR-маркеры, перспективные для генотипирования айвы. Разработан новый тип ДНК-маркеров SCoT-STR, обладающие достаточным уровнем информативности для выполнения ДНК-паспортизации сортов; по результатам генотипирования с использованием маркеров на основе SCoT-праймеров, получены ДНК-паспорта по указанным мультилокусным ДНК-маркерам для 16 востребованных в садоводстве отечественных и зарубежных сортов яблони;
- выполнена экспериментальная апробация 16 мультилокусных ДНК-маркеров (CDDP-маркеры) на абрикосе и винограде, выявлены ДНК-маркеры наиболее перспективные к использованию для генотипирования данных культур;

- с использованием наиболее полиморфных CDDP ДНК-маркеров выполнено генотипирование сортообразцов и форм абрикоса из природных популяций, отобранных на территории Дагестана, а также автохтонных и современных сортов винограда, и получены научные данные о степени генетического родства изученных образцов – установлена наибольшая вероятность происхождения популяции дикорастущих форм абрикоса из Салта, от одичавших культурных форм абрикоса;

- выполненное с использованием CDDP ДНК-маркеров MADS1 и MgB1 генотипирование современных и автохтонных сортов винограда выявило, что европейские сорта не изолированы генетически, что может свидетельствовать о влиянии европейского генофонда винограда культурного на формирование сортимента дагестанского винограда или о наличии общих предковых форм;

- выполнена молекулярно-генетическая паспортизация по трем аллелям локуса самонесовместимости (S2, S3 и S5) яблони данные для 21 генотипа рода *Malus*.

3 Реализация исследовательских проектов по разработке и совершенствованию методов ускоренного размножения растений, свободных от вирусных и фитоплазменных патогенов садовых культур и винограда на основе использования методов культуры клеток и тканей *in vitro* и современных методов размножения *in vivo*

3.1 Обоснование необходимости проведения НИР

Для ускоренного внедрения новых, перспективных сортов в производство очень важно наличие высокоэффективных методов размножения, позволяющих в сжатые сроки получать генетически однородный и свободный от патогенов посадочный материал. Немаловажно наличие таких методов и для поддержания питомниководческой отрасли на высоком уровне за счет создания насаждений базисных маточных растений, свободных от вирусных и фитоплазменных инфекций для последующего получения оздоровленного посадочного материала. Методы биотехнологии, основанные на культивировании тканей растений в условиях *in vitro*, позволяют получить здоровый, свободный от вирусов и фитоплазм посадочный материал. Культура растительных тканей *in vitro* – основа всей биотехнологии растений, представляет собой интересную область фундаментальных и прикладных наук с широкими возможностями для дальнейших исследований. Метод клонального микроразмножения растений меристемным способом в совокупности с хемо – и термотерапией является одним из наиболее перспективных подходов для оздоровления растений.

Данный способ размножения имеет ряд преимуществ. Получение оздоровленного посадочного материала, тиражирование необходимого количества растений в короткие сроки – наиболее важное из них. Однако на каждом этапе размножения имеются свои сложности. Эффективность размножения определяется правильным выбором питательной среды для микроразмножения, режимом и препаратами для стерилизации эксплантов, гормональным составом среды, условиями культивирования, а также зависит

от генотипа сорта. Завершающим этапом клонального микроразмножения является этап адаптации растений к нестерильным условиям, т.е. перевод растений из условий *in vitro* в условия *ex vitro*. Сложность перевода пробирочных растений в нестерильные условия связана с некоторыми физиологическими и анатомическими особенностями растений, выращенных в культуре *in vitro*. Причин низкой приживаемости несколько: водный стресс (недостаток кутикулярного воска, высокая активность транспирации), низкий уровень фотосинтетических процессов, неразвитая корневая система (пониженная всасывающая способность корней, ввиду малого количества или отсутствия корневых волосков). Поэтому для растений необходимо создать благоприятные условия для их адаптации. Однако индивидуальная оптимизация отдельных элементов адаптации (водный режим, почвенный субстрат и т.д.) является длительным и затратным процессом. Исследование физиологических механизмов адаптации растений *in vitro* в условиях *ex vitro* позволит более эффективно производить посадочный материал, снизить потери растений в процессе акклиматизации.

Эти трудности в микроклонировании связаны, прежде всего, с видо- и сортоспецифичными особенностями размножаемых образцов [54,55]. Принимая во внимание, что при размножении в искусственных условиях индивидуальная генотипическая реакция проявляется значительно сильнее, чем при традиционных способах размножения, возникает необходимость экспериментальной оптимизации и поиска физиологических условий культивирования *in vitro* и адаптации растений-регенерантов *in vivo* с учетом видовых и сортовых особенностей [56].

Первый этап микроклонального размножения – введение эксплантов в *in vitro* культуру имеет ряд трудностей, связанных с обсемененностью спорами фитопатогенной и сапрофитной микрофлоры, которая кантаминирует экспланты и питательную среду, а также проблемой является продуцирование фенольных соединений эксплантами, что снижает результативность инициации [57-59].

Очень важно выбрать оптимальный период отбора эксплантов для введения в культуру – большое значение имеет не только фаза вегетации, но и возраст растения-донора эксплантов, а также его физиологическое состояние, в том числе, прохождение фаз органо- и морфогенеза конкретной культуры [60-62]. Для одних пород плодовых считается оптимальным, отбор меристем апексов из пророщенных в лабораторных условиях почек (март, апрель), для других период активного роста – май, июнь [63-65]. Иногда это осенний период, как, к примеру, для земляники: показаны высокие показатели приживаемости эксплантов в культуру *in vitro* при отборе в позднеосенний период – процент регенерации составляет до 75-80 % [66].

Для целей микроразмножения растений допустимо использовать эксплянты крупного размера 0,5-2,0 мм – до 15 мм, В тоже время для целей оздоровления растений от вирусных и фитоплазменных заболеваний необходимо вычленять апикальные меристемы размером не более 0,1-0,2 мм [67, 68].

Важным этапом является стерилизация эксплантов и, соответственно, выбор стерилизующего вещества, его концентрация и экспозиция эксплантов в нем. Для обработки эксплантов плодовых культур и земляники часто используют хлорсодержащие вещества, такие как гипохлорит натрия и кальция, хлорамин [69-75]. Известны примеры успешного применения для уничтожения поверхностной грибной микрофлоры фунгицидных препаратов [71, 76-78]. При контаминации эксплантов внутренней инфекцией в среду возможно введение антибиотиков (групп Цефалоспоринов, Стрептомицина и др.) [79]. Внутренние инфекции могут появляться не сразу, а через несколько недель культивирования; кроме того, могут внешне не проявляться, но оказывать влияние на рост и развитие эксплантатов.

Поэтому экспериментальный поиск эффективных обеззараживающих препаратов и эффективных протоколов их использования на разных культурах, остается актуальным.

Эффективность клонального микроразмножения в значительной степени определяется правильным выбором состава питательной среды. При этом основную роль играет оптимальное соотношение и концентрация внесенных в питательную среду стимуляторов роста (биологически активных веществ).

Анализ научных работ в области клонального микроразмножения растений показал высокую частоту использования среды Мурасиге и Скуга (MS), Кворина-Лепуавра (QL), Driver and Kuniyuki (DKW), WPM, Шенка и Хильдебрандта (SH), с различными вариациями гормональных веществ, витаминов, макроэлементов, сахарозы [57,72,76,80-87]. Оптимизация состава среды под конкретную культуру и даже сорт может иметь особую важность, ввиду зачастую проявляемой генотипической специфичности реакции растения на условия *in vitro*.

На этапе укоренения растений-регенерантов *in vitro* также важное значение имеет состав питательной среды, тип и концентрация стимулятора корнеобразования, а также источников микро- и мезоэлементов, включая необходимость использования разных хелатных форм железа. [74, 88, 89].

В качестве стимуляторов ризогенеза чаще всего используют ауксины: β -индолилмасляную кислоту (β -ИМК), β -индолилуксусную кислоту (β -ИУК), ф-нафтилуксусную кислоту (ф-НУК) в различных концентрациях [90].

На этом этапе важно подобрать интенсивность освещения и спектральный состав светового потока, т.к. это оказывает значительное влияние на процессы формирования как надземной части растений так и корнеобразования [91, 92].

Завершающий и один из наиболее сложных этапов в процессе клонального микроразмножения – адаптация пробирочных растений к условиям *ex vitro* и их последующая закалка [93]. При переводе пробирочных растений в нестерильные условия гибель растений связана с тем, что у пробирочных растений нарушен процесс транспирации, ввиду слабого функционирования устьиц. У некоторых растений на сформированных в

условиях *in vitro* на микрокорешках не образуются корневые волоски. По этой причине нарушается поглощение воды и минеральных веществ из субстрата. После высадки пробирочных растений в субстрат необходимо создать условия для адаптации к изменившейся окружающей среде [94].

Несмотря на длительный период существования технологий микроклонирования растений в условиях *in vitro* и наличие протоколов микроклонального размножения для значительного количества культур, существует ряд проблем, которые связаны, в первую очередь с генотипической специфичностью размножаемых *in vitro* образцов (сортов, гибридов и т.д.). В связи с этим, значительной актуальностью на сегодняшний день в мире обладают направления исследований, связанные с разработкой сортоспецифичных протоколов микроклонального размножения по всем этапам – от первичного введения в культуру, до адаптации в условиях *in vivo*. В связи с актуальностью данных вопросов, нами были поставлены следующие задачи:

- изучить уровень отзывчивости сортов садовых культур и винограда на компонентный состав искусственных питательных сред в условиях *in vitro*;
- усовершенствовать экспериментальные протоколы микроклонального размножения по этапам: введение в культуру и мультипликация;
- изучить влияние биологически активных препаратов на эффективность размножения садовых культур в условиях *in vivo*.
- разработать стандартные операционные процедуры создания и ведения маточников подвойных и привойных сортов садовой культуры – подвоев крупнокосточковых и винограда;

3.2 Объекты, методы, методики и условия проведения исследований

Объекты исследований – сорта, подвои, виды, гибриды и клоны плодовых, ягодных культур и винограда.

Основное используемое лабораторное оборудование: микродозаторы автоматические Thermo Labsystems и Biohit с переменным объемом.

стерилизатор ВК-30, шкаф сушильный ШС-80 (0+200), дистиллятор ДЭ-10, термостаты с воздушным охлаждением ТСО-1/80, шкафы ламинарные для создания абактериальной рабочей среды С-1,2 (код 110.120), рециркуляторы воздуха бактерицидные ОБР-30, облучатель ОБН-1х30, весы аналитические Shinko НТР-220-Е, мешалка магнитная С-MAG HS 7, , рН-метры рН-150И, весы лабораторные Ohaus, стеллажи световые, оборудованные лампами люминесцентными и светодиодными, люксметр ТКА-люкс.

Расходные материалы, реактивы и материалы, не являющиеся амортизируемым имуществом, использованные в ходе выполнения НИР, включая приобретенные за счет средств гранта:

- химреактивы для приготовления искусственных питательных сред (микро- и макросоли, агар-агар, глюкоза, сахароза, фитогормоны);
- лабораторная посуда, расходные и другие материалы для биотехнологических исследований в культуре *in vitro* (средства дезинфицирующие ОКА-Таб, Санилекс, Альфасептин, Бетадез; перчатки, марля, вата, бумага фильтровальная, фольга, бахилы, береты, нарукавники, халаты; лабораторные принадлежности – скальпели, пинцеты, лезвия к скальпелям; лабораторная посуда, включая стаканы, цилиндры, колбы, бутылки для приготовления и хранения растворов; субстраты для приготовления грунтосмесей, включая грунт садовый, перлит, вермикулит; минипарники, кассеты рассадные для высадки микрорастений, горшки для растений различного объема);

Расходные материалы, реактивы и материалы, не являющиеся амортизируемым имуществом, использовались как приобретенные за счет средств гранта, так и ранее приобретенные, в том числе из внебюджетных источников. Часть реактивов и расходных материалов не являющиеся, амортизируемым имуществом, приобретенные за счет средств гранта, будут использоваться для выполнения части исследований, запланированных на 2022 год.

Общая организация работ по микроклональному размножению растений соответствовала общим требованиям и правилам [95,96,97] и проводилась в следующем порядке:

1. Отбор эксплантов с выделенных селекционерами исходных визуально здоровых растений в полевых условиях;
2. Введение эксплантов в культуру *in vitro*;
3. Клональное микроразмножение сортообразцов в условиях *in vitro*;
4. Укоренение, полученных *in vitro* регенерантов на искусственной питательной среде;
5. Адаптация пробирочных растений к нестерильным условиям.

Стерилизацию растительного материала проводили по схеме: часовая промывка проточной водопроводной водой – стерилизация стерилизующим препаратом по вариантам опыта (0,5 % р-р «ОКА-ТАБ», р-р «Белизна» в разведении 1:1 и 1:3), 3-х кратная отмывка стерильной водой с экспозицией по 5 минут. Экспланты вычленили в асептических условиях в ламинарных боксах и высаживали в пробирки с питательной средой.

Размер вводимого в культуру *in vitro* апекса –2-3 мм.

Культивирование эксплантов проводили сначала в стеклянных пробирках и банках для культивирования при температуре 24-26 °С и 16-ти часовом освещении с интенсивностью 3500-5000 люкс.

В опытах использовали питательную среду по прописи Мурасиге и Скуга (MS).

На этапе введения в культуру *in vitro* проводились ежедекадные наблюдения за ростом и развитием эксплантов. При этом учитывались:

1. Приживаемость эксплантов.
2. Количество инфицированных эксплантов, эксплантов с некрозом, регенерировавших эксплантов.

На этапе микроразмножения учитывали коэффициент размножения (количество микро побегов, развившихся из одного экспланта), размер микропобегов.

На этапе адаптации растения высаживали на субстрат, содержащий готовую почвенную смесь "Агробалт", песок, вермикулит, перлит и кокосовое волокно в равном соотношении. Адаптацию проводили при температуре +22+26 °С, освещенности 4,5 тыс. люкс, при фотопериоде 16/8.

В период адаптации проводили корневые подкормки разведенным вдвое раствором макросолей MS. При адаптации земляники однократно вносили под корень препараты Агринос 1 и Агринос 2 с интервалом 7 дней.

Агринос 1- содержит активные полезные микроорганизмы из 10 различных семейств и более 80 штаммов: аэробные, анаэробные и микроаэрофильные бактерии. Внесение препарата в почву улучшает усвоение растениями элементов питания, стимулирует корнеобразование, подавляет вредную микрофлору.

Агринос 2 - биостимулятор-антистрессант, содержит L-аминокислоты и дополнительно обогащен биодоступными элементами питания: азот, калий, углерод, магний, медь, железо, хитин и хитозан. Внесение препарата улучшает общее физиологическое состояние растений, в том числе активность фотосинтеза, увеличивается накопление сложных и простых сахаров, усиливаются ростовые процессы. Хитин и хитозан в составе препарата служат иммуномодуляторами, выполняют функции репеллентов и фунгицидов (<https://agroexpert.md/rus/agronomiya/raskryvaem-sekrety-biopreparatov>).

3.3 Результаты исследований

3.3.1 Совершенствование протоколов микроклонального размножения по этапам: введение в культуру *in vitro* и мультипликация

Оптимизация способа поверхностной стерилизации эксплантов земляники садовой при введении в культуру *in vitro*

Успешность введения эксплантов в культуру *in vitro* зависит от многих факторы, которые необходимо учитывать – это сроки изоляции эксплантов, фитосанитарное и физиологическое состояние маточных растений, с которых

были отобраны экспланты, а также стерилизатор, его концентрация и экспозиция обработки.

Поскольку с 2020 г. производство и применение любых товаров, содержащих ртуть и ее соединения запрещено, в целях защиты здоровья людей и окружающей среды от вредного воздействия ртути, поиск эффективных протоколов стерилизации, новых дезинфицирующих средств для поверхностной обработки эксплантов является актуальной задачей.

В текущем году продолжено испытание в качестве дезинфицирующего средства хлорсодержащих таблеток «ОКА-ТАБ» (табл. 18).

В ходе исследований были испытаны следующие способы поверхностной стерилизации эксплантов земляники:

1. Контроль – гипохлорит натрия (NaOCl) в составе бытового средства «Белизна», в разведении 1:3, экспозиция 5 минут

2. Гипохлорит натрия (NaOCl) в составе бытового средства «Белизна», в разведении 1:1, экспозиция 1 минута;

3. Вариант - дезинфицирующие таблетки «ОКА-ТАБ» (0,5 %), экспозиция 5 минут.

4. Вариант - дезинфицирующие таблетки «ОКА-ТАБ» (0,5 %), экспозиция 7 минут.

Оценка качества обработки производилась по проценту выхода жизнеспособных эксплантов, проценту контаминированных эксплантов и некрозу эксплантов через 10 дней. Повторность опыта – трехкратная, по 20 эксплантов в повторности.

По данным таблицы видно, что 0,5 %-ный водный раствор дезинфицирующих таблеток "ОКА-ТАБ" в двух вариантах экспозиции показали достаточно высокий результат. При обработке эксплантов сорта Азия выход чистых жизнеспособных эксплантов составил 86 % при длительности обработки 7 минут и 83 % при обработке в течении 5 минут, в контрольном варианте при обработке раствором "Белизны" (1:3, 5 мин.) только

50 %. Уровень инфекции в обоих случаях составил 14 %, в контрольном варианте - 40 %.

Таблица 18 – Процент приживаемости эксплантов земляники при введении в культуру *in vitro* в зависимости от способа стерилизации

Вариант	Показатель	Сорт	
		Азия	Мальвина
Контроль - Белизна 1:3, 5 мин.	Жизнеспособные	50	34
	Контаминация	40	34
	Некроз	10	32
Белизна 1:1, 1 мин.	Жизнеспособные	63	33
	Контаминация	33	35
	Некроз	4	32
ОКА-ТАБ, 5 мин.	Жизнеспособные	83	83
	Контаминация	14	17
	Некроз	3	0
ОКА-ТАБ, 7 мин.	Жизнеспособные	86	68
	Контаминация	14	17
	Некроз	0	15

При обработке эксплантов сорта Мальвина лучшим вариантом обработки оказался вариант "ОКА-ТАБ", 5 минут. Выход жизнеспособных эксплантов в данном варианте составил 83 %, уровень контаминации 17 %. В варианте с экспозицией 7 минут, жизнеспособных эксплантов было 68 %, уровень контаминации 17 %, но уже было 15 % эксплантов поврежденных стерилизатором. При использовании раствора "Белизна" и в варианте 1:1 и в контрольном варианте была отмечена сильная фитотоксичность для тканей эксплантов. Повреждение тканей составляло 32 %, выход жизнеспособных эксплантов составлял всего 33-34 %, при этом в процессе обработки 34-35 %

были с поверхностной инфекцией. Таким образом, для сорта Мальвина использование раствора "Белизны", в качестве стерилизатора не подходит.

Поскольку способ поверхностной обработки эксплантов земляники с помощью дезинфицирующих таблеток «ОКА-ТАБ» (0,5 % р-р) в течение 5 и 7 мин. показал высокую эффективность, рекомендуется использовать, именно, этот способ обработки.

Определение оптимальных сроков введения в культуру *in vitro* подвоев косточковых культур

Эффективность введения в культуру *in vitro* определяется количеством развившихся на среде эксплантов. Кроме хорошей санации эксплантов от поверхностной патогенной микрофлоры, необходимо выбрать оптимальные сроки введения эксплантов в культуру *in vitro*, период, когда регенерация тканей проходит более успешно.

Активный рост побегов плодовых культур в Краснодарском крае по средним многолетним данным отмечается в апреле-мае. В летний период, при высоких температурах и отсутствии осадков (июнь-июль) активность образования новых побегов падает. Позже, при благоприятных условиях (осадки, температура) может быть вторая волна роста (конец июля - начало августа).

Двухлетний анализ приживаемости эксплантов подвоев косточковых культур АИ 1 и ПК СК 1 при введении в культуру *in vitro*, показывает, что прослеживается общая тенденция повышения приживаемости в период активного роста побегов.

У подвоя АИ 1 наиболее высокий уровень регенерации эксплантов отмечается во 2-3 декаде мая и варьирует от 70,2- 78,2 % (2020 г.) до 83,3- 88,3 % (2021 г.) В первой декаде июня уровень приживаемости снижается и составляет в среднем 57,9 % (2020-62,4 %, 2021-53,3 %) (рис. 43).

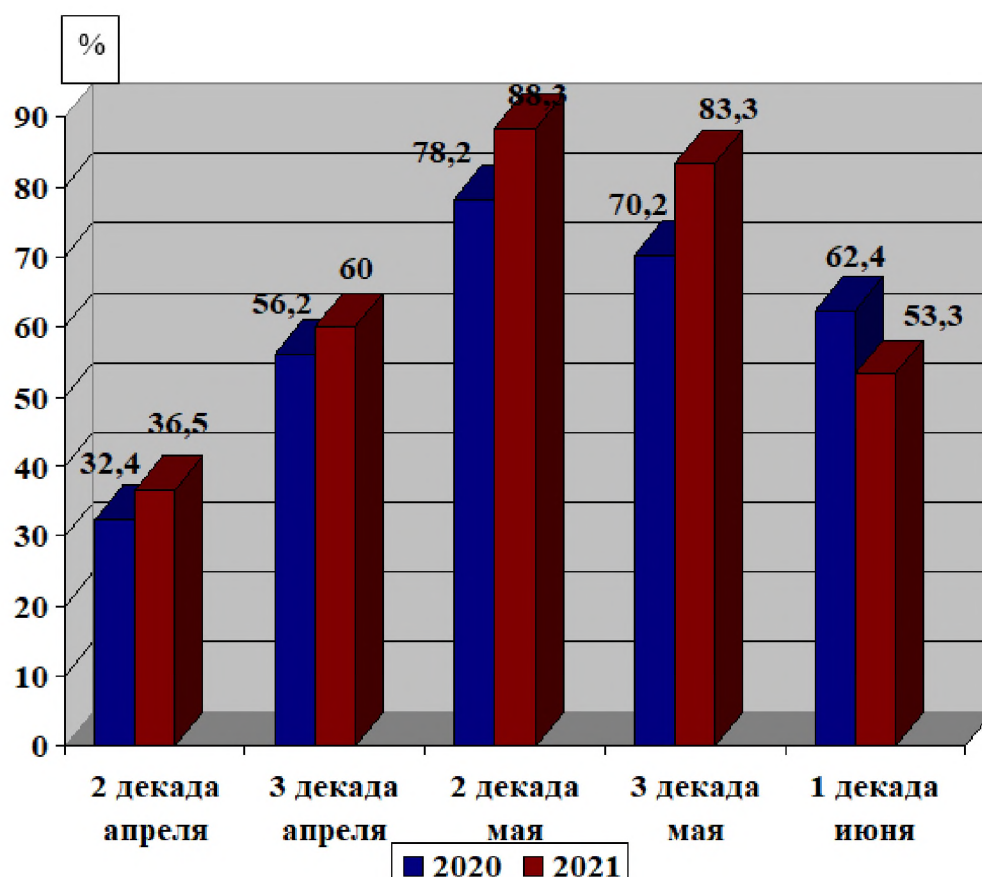


Рисунок 43 – Приживаемость эксплантов подвоя АИ 1 при введении в культуру *in vitro* на разных этапах вегетации

Когда в качестве инициальных эксплантов используются апексы, отобранные из пробуждающихся в условиях лаборатории почек, приживаемость эксплантов слабая составляет в среднем 34,5 %.

Таким образом, наиболее эффективным сроком инициации эксплантов подвоя для мелкокосточковых культур АИ 1 является период с начала второй и до конца третьей декады мая (рис. 44).



Рисунок 44 – Экспланты клонового подвоя АИ 1 (регенерация)

У подвоя крупнокосточковых культур ПК СК 1 отмечена такая же зависимость, как и у подвоя АИ 1 (рис. 45).

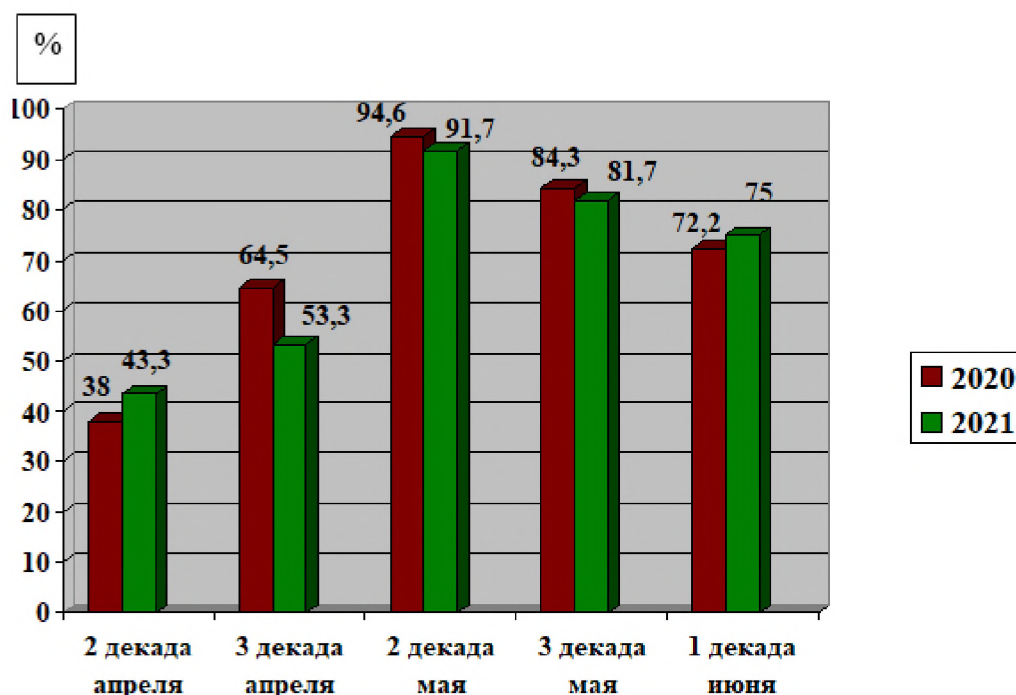


Рисунок 45 – Приживаемость эксплантов подвоя ПК СК1 при разных сроках введения эксплантов в культуру *in vitro*

Приживаемость эксплантов начинает повышаться ко 2 декаде мая и в среднем по годам составляет 93,1 %. К третьей декаде уровень регенерации эксплантов начинает снижаться и составляет 81,7 % (2021 г.) - 84,3 % (2020 г.). В первой декаде июня приживаемость падает еще более чем на 10 %. При введении в культуру эксплантов из почек, приживаемость эксплантов низкая и варьирует в пределах 38-43,3 %.

Поэтому наиболее оптимальным периодом для введения подвоев АИ 1 и ПК СК 1 является период с начала второй и до конца третьей декады мая.

3.3.2 Изучение уровня отзывчивости клонового подвоя косточковых культур ПК СК 1 на компонентный состав искусственной питательной среды и оптимизация этапа мультипликации микропобегов

На этапе клонального микроразмножения экспланты подвоев косточковых культур высаживали на среду Мурасиге и Скуга. В качестве контроля использована среда с содержанием Fe-EDTA с различным содержанием цитокинина 6-БАП. В качестве варианта опыта в среду добавили Fe-EDDHA (6 %, 100 мг/л) с различным содержанием 6-БАП.

Это высокоэффективная хелатная форма железа, применяемая в качестве источника железа в удобрениях или для лечения и предотвращения хлороза, вызванного дефицитом железа. Данная форма железа легкоусвояемая. При внесении этого хелата нормализуется уровень хлорофилла в растениях, улучшаются фотосинтез и дыхательная функция, стимулируется рост вегетативной массы растений. Еще один плюс форме EDDHA железо устойчиво в широком диапазоне pH от 3.0 до 9.0.

Опыт проводился после 2 пассажей. Эффективность размножения оценивалась по коэффициенту размножения (табл. 19). Учет проведен спустя 5 недель после пересадки.

Изменение формы хелата железа в среде в целом не отразилось на коэффициенте размножения. На среде с концентрацией 6-БАП 0,5 мг/л формировалось в среднем 5-6 новых побегов (рис. 46), на среде с концентрацией БАП 0,75 мг/л - 7-9 побегов, на среде с БАП 1,0 мг/л из одного побега формировался конгломерат, состоящий в среднем из 9-10 побегов различного размера (рис. 47).

Таблица 19 – Коэффициент размножения подвоя ПК СК 1 на средах с различным содержанием 6-БАП и хелатной формы железа

Вариант среды	Концентрация 6-БАП, мг/л	Коэффициент размножения 1:N		Процент витрифицированных побегов
		сред.	max	
MS с Fe-EDTA	0,5	1:5	1:10	25
	0,75	1:7	1:8	34
	1,0	1:9	1:12	68
MS с Fe-EDDHA	0,5	1:6	1:12	10
	0,75	1:9	1:10	21
	1,0	1:10	1:15	42



Рисунок 46 - Микропобеги подвоя ПК СК 1 на среде
MS + Fe-EDTA + 6-БАП 0,5 мг/л



Рисунок 47- Микропобеги подвоя ПК СК 1 на среде
MS + Fe-EDDHA + 6-БАП 1,0 мг/л

Положительным моментом является то, что на среде с Fe-EDDHA количество витрифицированных побегов на 13-26 % меньше, чем на среде с Fe-EDTA (рис. 48).



Рисунок 48 - Витрифицированные побеги ПК СК 1 на среде MS + Fe-EDTA+ 6-БАП 0,5 мг/л

Таким образом, оптимальным вариантом для микроразмножения подвоя ПК СК 1 является использование среды MS с добавлением Fe-EDDHA и 6-БАП в количестве 0,75-1,0 мг/л, при этом формируется 9-10 новых побегов с одного экспланта.

3.3.3 Изучение регенерационной отзывчивости генотипов винограда на компонентный состав модифицированной питательной среды MS в условиях *in vitro*

На этапе введения в культуру винограда *in vitro* проводилась оптимизация питательной среды Мурасиге-Скуга для эффективной регенерации эксплантов. Для изучения приживаемости эксплантов подвоев винограда Берландиери x Рипариа Кобер 5ББ и Рипариа x Рупестрис 101-14 использовали два варианта сочетания 6-БАП и ИУК, в качестве контроля использована среда с содержанием 6-БАП-1 мг/л (рис. 49).

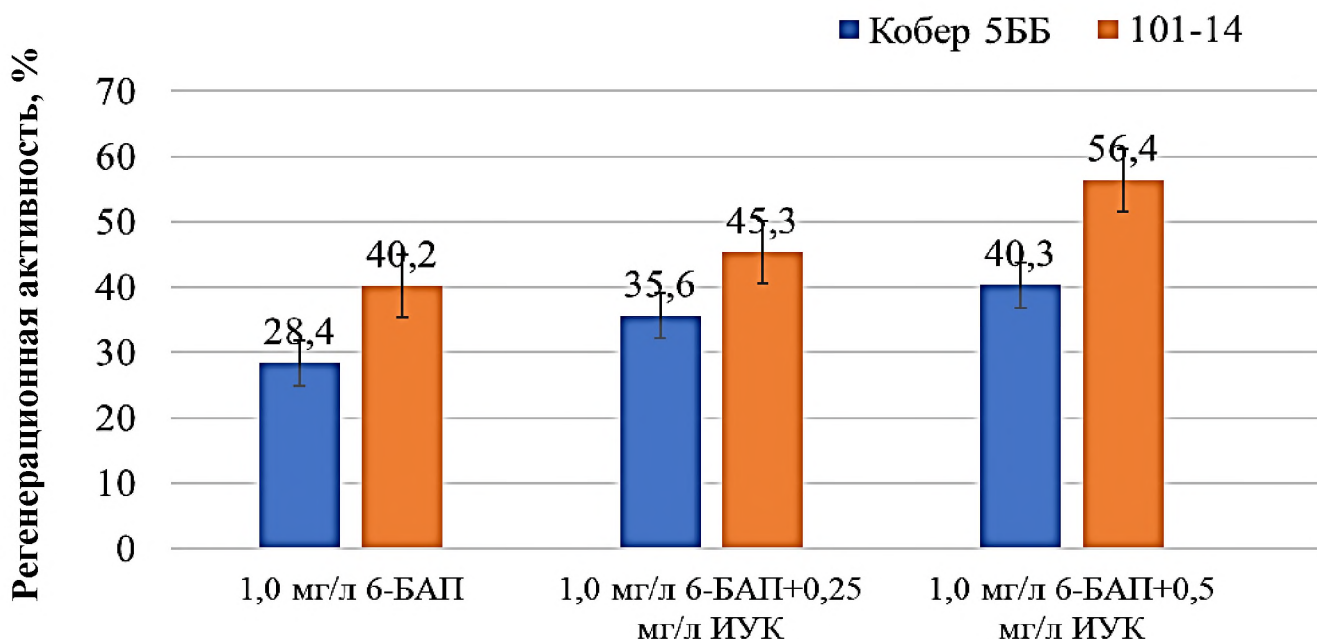


Рисунок 49 – Регенерационная активность подвоев винограда на модифицированной среде Мурасиге-Скуга с различным содержанием регуляторов роста (через 35 дней культивирования)

Сравнение регенерационной активности изучаемых сортов винограда показало, что приживаемость эксплантов подвоя Рипариа х Рупестрис 101-14 на исследуемых средах была выше, чем в контроле на 5,1 и 16,2 %. Наивысший уровень регенерации был на среде, содержащей 1,0 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ИУК и составлял 56,4 % от всех введенных эксплантов.

Приживаемость эксплантов подвоя Берландиери х Рипариа Кобер 5ББ была ниже на 7,2 и 11,9 %, чем в контроле и составляла 35,6 % в варианте с содержанием 6-БАП - 1,0 мг/л + ИУК - 0,25 мг/л и 40,3 % в варианте с содержанием 6-БАП - 1,0 мг/л + ИУК - 0,5 мг/л.

По результатам работы можно сделать вывод о наличии сортоспецифической реакции подвоев винограда Берландиери х Рипариа Кобер 5ББ и Рипариа х Рупестрис 101-14 на гормональный состав среды (рис. 50).



А



Б

Рисунок 50 – Экспланты подвоя винограда на среде 6-БАП - 1,0 мг/л + ИУК - 0,5 мг/л: А) Рипария х Рупестрис 101-14, Б) Берландиери х Рипария Кобер 5ББ

Подвой Рипария х Рупестрис 101-14 проявил более высокую регенерационную активность.

3.3.4 Изучение влияния биологически активных препаратов на эффективность размножения садовых культур в условиях *in vivo*

Влияние препаратов Агринос 1 и Агринос 2 на эффективность адаптации *in vivo* земляники садовой

Одним из основных и проблематичных этапов в процессе производства посадочного материала с использованием методов клонального размножения растений, особенно древесных культур, является перевод укорененных растений в условиях *in vitro* в нестерильные условия *ex vitro*. Поэтому разработка способов адаптации, ускорение этого процесса является актуальной задачей.

Для адаптации растений земляники использовали субстрат, состоящий из готовой почвенной смеси "Агробалт", песка, вермикулита, перлита в соотношении 3:1:1:1. Адаптацию проводили в микропарниках при температуре +22...+26 °С, освещенности 4,5 тыс. люкс, при фотопериоде 16/8 (день - 16 часов, ночь - 8 часов).

Для повышения адаптивности растений, для улучшения роста вегетативной и корневой системы были использованы натуральные биостимуляторы Агринос 1 и Агринос 2. В некоторых научных работах

приводятся данные о том, что обработка растений биостимуляторами содержащими азотные бактерии, приводит к существенному увеличению роста и урожайности сельскохозяйственных культур. Биостимуляторы, содержащие микроорганизмы, свободно живущие в почве, либо являются симбиотическими с растениями, вносят прямой или косвенный вклад в азотное и фосфорное питание растений. Азотные бактерии способны фиксировать атмосферный азот, производить гормоны, витамины и другие вещества, необходимые для роста и развития растений.

При пересадке отбирались растения примерно одинаковой высоты и количеством листьев. После пересадки в нестерильные условия растения полили раствором Агринос 1, спустя неделю в качестве корневой подкормки растения пролили раствором Агринос 2. Спустя 45 суток при пересадке растений в контейнеры большей емкости провели контрольные замеры показателей. В варианте с обработкой биопрепаратами отмечено положительное влияние на габитус растений. Средняя высота растений на фоне применений препаратов была выше на 25-35 % и составила у сортов земляники Клери – 10,8 см, Кемия – 9,8 см, Альба – 6,4 см (рис. 51, 52). В контрольном варианте этот показатель составлял у сорта Клери – 8 см, Кемия – 7,5 см, Альба – 5,1 см.

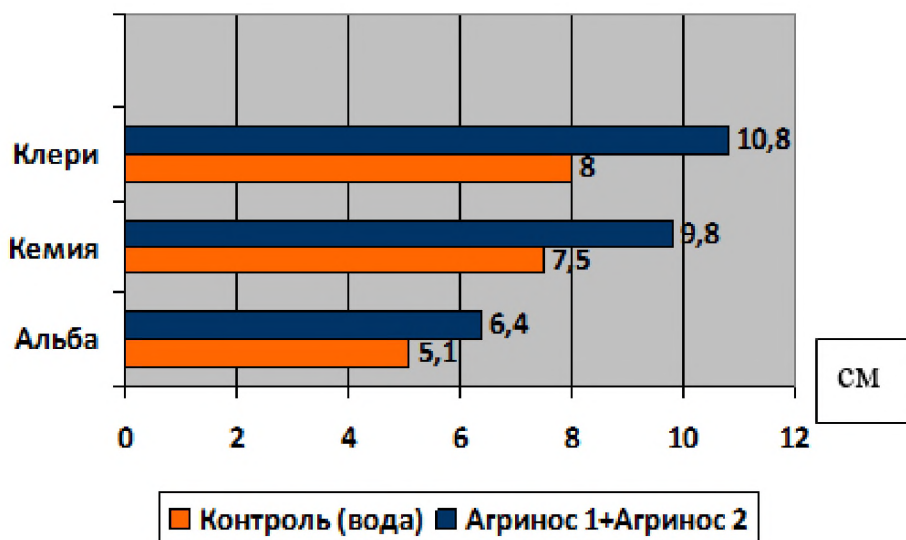


Рисунок 51 – Влияние микробиологических препаратов Агринос 1 и Агринос 2 на рост земляники садовой при адаптации *ex vitro*



контроль



Агринос 1+ Агринос 2

Рисунок 52 – Внешний вид растений, сорт Кемия

Также отмечено нарастание вегетативной массы растений в варианте с обработкой препаратами. Среднее количество листьев было выше на 31,0 % у сорта Альба и составило 7,6 шт. на растение, у сорта Клери выше на 22,6 % - 6,6 шт. на растение, у растений сорта Кемия на 7,4 % и составило 7,3 шт. на растение (рис. 53, 54). В контрольных вариантах этот показатель варьировал от 5,3 до 6,8 шт. на растение.

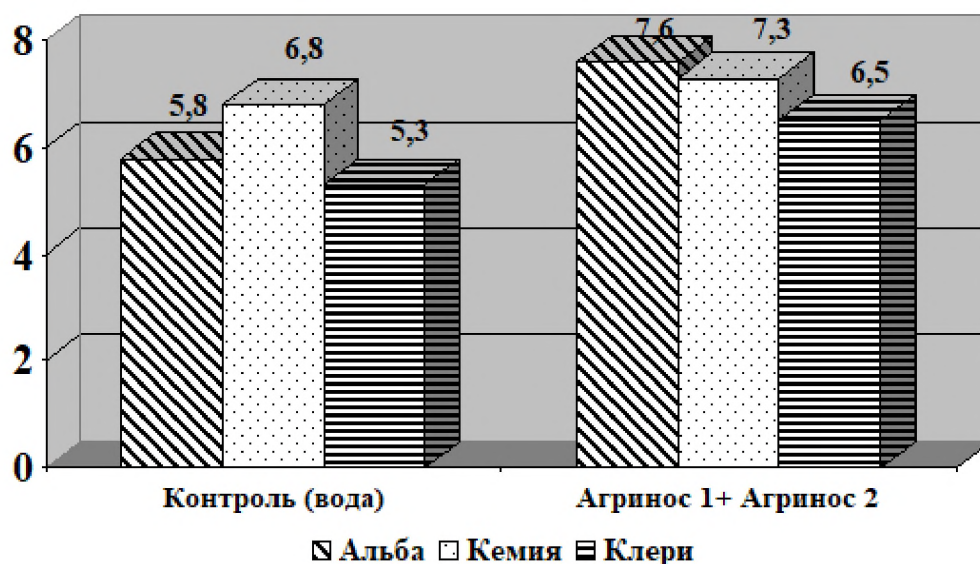


Рисунок 53 – Влияние микробиологических препаратов на количество листьев

Кроме того, следует отметить, что в контрольных вариантах, чаще наблюдалось усыхание листочков земляники, в начальный период адаптации *ex vitro*. У обработанных растений этого почти не было.



Контроль



Агринос 1+ Агринос 2

Рисунок 54 – Внешний вид растений земляники садовой, сорт Альба

Увеличение вегетативной массы у обработанных растений чаще всего связано с повышением количества хлорофилла при внесении азотфиксаторов и с выработкой бактериями в ризосфере регуляторов роста растений, которые поглощаются корнями. Следовательно, усиление вегетативного роста может быть вызвано повышенной биологической азотфиксацией.

Применение комплекса биостимуляторов Агринос 1, содержащий активные микроорганизмы и Агринос 2, содержащий аминокислоты, комплекс ферментов и основных микроэлементов способствовало также к стимулированию корнеобразования.

Длина корневой системы в варианте с применением препаратов была в пределах 15-20 см и составляла в среднем у сорта Альба 15,5 см, у сорта Кемия 18,4 см, у сорта Клери 14,3 см. В контрольном варианте длина корней варьировала от 4 до 10 см и составляла в среднем у сорта Альба 6,2 см, у Кемии - 9,6 см, у Клери - 8,4 см (рис. 55, 56).

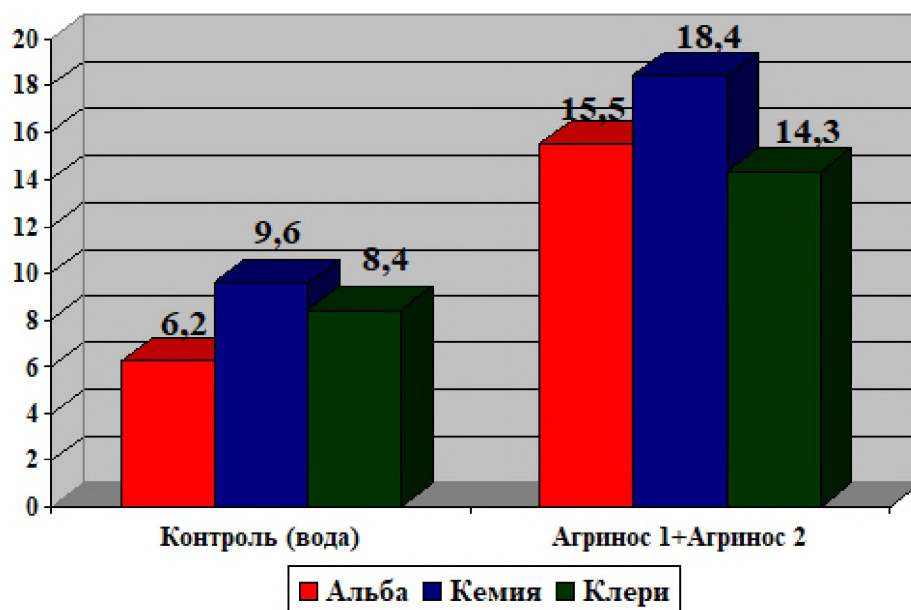


Рисунок 55 – Влияние препаратов Агринос 1 и Агринос 2 на развитие корневой системы



Контроль



Агринос 1 + Агринос 2

Рисунок 56 – Корневая система растений земляники, сорт Клери

Кроме того, отмечено, что у земляники сорта Клери в варианте с обработкой биопрепаратами отмечено стимулирование усообразования. Уже через 3 месяца после пересадки из условий *in vitro* в условия *ex vitro*, каждое

растение имело по 2-3 дочерних розетки. В контрольном варианте усообразования не наблюдалось (рис. 57).



Контроль



Обработка Агринос 1 и Агринос 2

Рисунок 57 – Усообразование земляники садовой, сорт Клери

Таким образом, в результате выполненных исследований было установлено значимое положительное влияние биостимуляторов Агринос 1 и Агринос 2 на силу роста и вегетативное размножение земляники.

3.3.5 Разработка стандартных операционных процедур создания и ведения маточников подвойных и привойных сортов садовых культур и винограда

3.3.5.1 Создание и ведение маточников подвойных и привойных сортов яблони

Обеспечение стабильного роста производства высококачественного посадочного материала плодовых, ягодных, орехоплодных культур современных конкурентоспособных российских сортов на основе применения новых высокотехнологичных отечественных разработок, включающих элементы полного комплексного научно-технического цикла, и освоения современных (молекулярной биологии и биохимии, генной инженерии, биоинформатики) методов ускоренного создания сортов и гибридов растений с заданными хозяйственно-ценными признаками, разработку сортоориентированных агротехнологий является основной целью подпрограммы «Развитие питомниководства и садоводства» на 2017-2025 гг.

В Краснодарском крае в 2021 году было заложено более 5,9 тыс. га многолетних плодовых насаждений, из них яблони **80 %** от новых насаждений, так как эта культура наиболее приспособлена давать качественный и высокий урожай в условиях юга России («Аграрная Кубань», № 44 (384), 13 декабря 2021 г.). Востребованность в посадочном материале яблони заставляет в первую очередь разрабатывать нормативные документы производства саженцев высшей категории качества.

В ГОСТе 34231-2017 «Межгосударственный стандарт. Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Термины и определения» прописано «Маточное насаждение плодовой [ягодной] культуры – это насаждение плодовой [ягодной] культуры, заложенное посадочным материалом высших категорий качества и возделываемое с целью получения семян, черенков, отводков, отпрысков, специализированных органов (розеток), используемых для размножения плодовой [ягодной] культуры.

Примечание — Маточники различных типов, севообороты полей формирования и школы сеянцев должны иметь пространственную изоляцию от плодоносящих насаждений в радиусе 2 км.» [1].

Поэтому при производстве посадочного материала любой категории необходимо при планировании питомников соблюдать пространственную изоляцию.

Производство посадочного материала яблони в современных питомниках требует наличие маточно-черенкового сада и маточника вегетативно размножаемых подвоев.

Организация конструкции агроценоза маточно-черенкового сортового сада яблони:

Маточно-черенковый сад плодовой культуры – это насаждение плодовой [ягодной] культуры, возделываемое в качестве маточного с целью получения чистосортных высококачественных побегов и приростов стеблей текущего года, используемых при производстве саженцев.

Для размещения маточника такого типа необходимо учитывать определенные требования. Участки должны быть расположены в равнинной местности или на пологих северных или северо-западных склонах с уклоном до 5 ° с почвами, обладающими легкой структурой и хорошими водно-воздушным и тепловым режимами: мощность корнеобитаемой толщи – более 80 см при строго выдержанном орошении; гранулометрический состав почвы – от легкосуглинистого до легкоглинистого, обеспечивающей формирование хорошо развитой корневой системы; плотность сложения почвы в корнеобитаемом слое – до 1,44 г/см³; рН_{водн} 6,0-8,5; карбонатность (содержание активного кальция) – не более 15 %; содержание солей – не более 0,15 % от массы сухой почвы; оптимальная влажность почвы – 70-80 % НВ; гидрогеологические условия: глубина залегания грунтовых вод не менее 1,5-2,0 м; сумма активных температур: свыше 3000 °С; требования к качеству поливной воды: рН 6,5-8,4, общее содержание солей не более 1,0 г/л.

По фитосанитарным нормам при выращивании сертифицированного посадочного материала в открытом грунте необходима пространственная изоляция участков размножения от насаждений плодовых и ягодных культур категории ниже «Базисные», которая должна составлять по российским нормативам не менее 2 км. Маточно-черенковый (сортовой и подвойный) сад размещают согласно утвержденному проекту после проведения комплексного обследования особенностей рельефа и почв на их садопригодность. Маточные насаждения размещают среди других частей питомника с учетом требований современной логистики для сокращения времени на переходы, переезды и перевозку отводков по территории питомника. Размеры отводимой под маточно-черенковый (сортовой и подвойный) сад территории должны обеспечивать в будущем возможность садооборота (перенос маточных насаждений после окончания срока эксплуатации на другое место), а также увеличения производства посадочного материала.

Необходимо учитывать, что почвы, предназначенные для размещения питомника, должны быть проверены на наличие нематод – переносчиков вирусных болезней за год до посадки. Положительное решение об использовании участка принимается исключительно при полном отсутствии нематод-переносчиков вирусных болезней.

Для равномерного увлажнения почвы на участке, даже при капельном орошении, необходимо провести его выравнивание. Работа выполняется за год до закладки маточно-черенкового, сортового и подвойного сада (июль-август предыдущего года).

Против сорных растений при достижении ими высоты 10-15 см применяются системные гербициды (торнадо, ВР, или его аналоги). Норма расхода препарата 3-4 л/га в зависимости от концентрации д.в. и от степени засоренности участка, расход рабочего раствора 100- 200 л/га.

Для окультуривания почвы, улучшения ее агрофизических и агрохимических свойств, особенно при невозможности внесения навоза,

высевают озимые сидераты: рапс -5-20 кг/га, озимый ячмень, озимая рожь 250 кг/га и другие в сентябре-октябре.

Проводится не менее, чем за 6 месяцев (июнь-июль) до высадки отводков плантажная вспашка с целью искоренения болезней и вредителей, населяющих пахотный слой, для улучшения питательного и водно-воздушного режимов почвы в корнеобитаемом слое. Для выравнивания гребней и борозд сразу после плантажной вспашки необходимо 2-х кратное дискование или культивацию по диагонали в двух направлениях на глубину 8-10 см.

До высадки саженцев в поле требуется поддержание в его чистом от сорняков состоянии, посредством 3-4 культиваций на глубину 8-10 см.

Для оптимизации питательного режима почв проводят внесение минеральных удобрений с одновременной заделкой за 4-6 месяцев до посадки растений на глубину 30 см. Рекомендуемые нормы внесения: $N_{30}H_{60-90}K_{60-90}$.

При закладке маточно-черенкового сада собственным посадочным материалом проверяется факт оформления документации на категорию саженцев. При получении посадочного материала в сторонних питомниках, следует внимательно изучить сопроводительные документы на предмет действительного происхождения посадочного материала и его соответствия ГОСТ Р 59653-2021. Непосредственно перед началом посадки сада проводится культивация почвы на глубину 8-10 см. Наличие техники с навигационной системой позволяет проводить разбивку участка благодаря картированию, с выбором опорной точки. Для проведения мелиорации необходима базовая комплектация системы капельного орошения включающая источник водоснабжения, насосную станцию и водозабор, магистральные трубопроводы, гравийный или сетчатый фильтры, узел внесения удобрений – бак (объём до 90 до 220 л). Расстояние между капельницами на поливopоpоде должны составлять 50 см. Посадка должна проводиться согласно принятой схемы размещения деревьев; отклонение саженца от места посадки в ряду не должно превышать 5-7 см, саженцы должны высаживаться с плотной заделкой

корней в почву без пустот, при посадке саженцев место прививки культурного сорта на подвой должно находиться на высоте не менее 10 см над уровнем почвы с учетом проседания саженца после полива. Под корневую систему высаженного саженца выливают около 20 л воды. Для защиты от грызунов на штамбе высаженных растений устанавливают специальную трубообразную сетку с продольным разрезом, нижнюю часть которой заделывают в почву.

Первая обрезка маточно-черенкового сада проводится весной после прекращения морозов, но до наступления сокодвижения. Обрезка направлена на получение большого количества качественных черенков. С этой целью формируют штаб высотой 60-70 см. Высота дерева не должна превышать 2 м. Крона формируется объёмная или по типу «кордон». Возможно формирование и ведение маточно-черенкового сада по типу «лугового». За вегетационный период проводят до 4-5 культиваций почвы в междурядьях насаждений на глубину 8-10 см. Против сорных растений при достижении ими высоты 10-15 см применяют системные гербициды (торнадо, ВР или его аналоги). Цветки удаляют в фазе бутонизации вручную, механизировано или с применением химических веществ. Оптимальный нижний порог предполивной влажности на супесчаных и легкосуглинистых почвах необходимо поддерживать на уровне 60-70 % наименьшей влагоемкости (НВ), на тяжелосуглинистых и легкосуглинистых – 70-80 % НВ, поливы производить с интервалом в 3-4 дня. При капельном орошении проводят подкормки растений минеральными удобрениями (фертигация). Средняя рекомендуемая норма внесения минеральных удобрений при фертигации составляет $N_{30}P_{15}K_{40}$. В течение вегетации проводят от 5 до 7 обработок от вредителей и болезней, руководствуясь «Государственным каталогом пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации», который ежегодно обновляется. Установление сортовой достоверности маточных деревьев проводят методом полевой апробации. Фитосанитарные исследования маточно-черенкового сада проводят сотрудниками аккредитованных испытательных лабораторий системы Россельхозцентр или

Россельхознадзор в установленном порядке. Тестирование на вирусоносительство проводится аккредитованными испытательными лабораториями системы Россельхозцентр или Россельхознадзор. Образцы для тестирования (биопробы) отбираются сотрудниками Россельхозцентра или Россельхознадзора в установленном порядке согласно нормативам. Выборке с последующей раскорчевкой подлежат деревья-примеси других сортов, а также больные деревья и деревья с большим количеством «волчков» и других жирующих побегов. При уходе за продуктивным маточно-черенковым садом необходимо до начала сокодвижения проводить омолаживающую обрезку со срезом всего прошлогоднего прироста с оставлением пенька с 3-4 почками. Внесение и заделка минеральных удобрений в почву осуществляется в ранневесенний период в борозды на глубину 20-25 см и на расстоянии 70-80 см от штамба дерева. Доза внесения определяется на основании результатов почвенной диагностики. На почвах со средней обеспеченностью элементами питания доза внесения минеральных удобрений составляет $N_{30}P_{15}K_{40}$ д.в./га. Необходимое удаление цветков рекомендовано проводить в фазе бутонизации вручную, механизировано или с применением химических веществ. Прикорневую поросль нужно удалять с вырезкой ее ниже поверхности почвы, без оставления пеньков. Междурядья содержатся свободными от сорняков. В течение вегетации проводят от 7 до 9 обработок от вредителей и болезней. В системе защиты рекомендуется применение до 10-30 % микробиологических препаратов. Фитосанитарные исследования и тестирование на вирусоносительство проводятся аккредитованными испытательными лабораториями системы Россельхозцентр или Россельхознадзор. Выборке с последующей раскорчевкой подлежат деревья-примеси других сортов, больные деревья и деревья с большим количеством «волчков» и других жирующих побегов, особенно отрастающих из стволов и старых сучьев.

Заготовку черенков для окулировки необходимо проводить в ранние утренние часы (с 4 до 10 часов), желательно в день использования. Черенки связывают в пучки по 50-100 шт. Качественные испытания черенков

проводятся аккредитованными испытательными лабораториями системы Россельхозцентр или Россельхознадзор. Образцы для испытания отбираются сотрудниками Россельхозцентра или Россельхознадзора в установленном порядке согласно нормативам. В случае соответствия заготовленных черенков требованиям ГОСТ Р 59653-2021, а также прохождения фитосанитарных обследований, тестирования на вирусоносительство и сортовую апробацию, им в установленном порядке присваивается категория. Проводится защита от грибных заболеваний препаратами, допущенными к использованию в РФ. Хранят черенки в холодильнике при температуре 1-3 °С, или в подвале во влажном песке или опилках.

***Организация конструкции маточного насаждения для производства
вегетативно размножаемых подвоев яблони:***

Маточник вегетативно размножаемых подвоев – это маточное насаждение вегетативно размножаемых подвоев плодовых культур, возделываемое по специальной технологии и предназначенное для получения отводков или черенков данного вида подвоев.

При выборе участка для маточника вегетативно размножаемых подвоев необходимо выполнение ряда условий. Питомник размещают в равнинной местности на садопригодных участках с высокоплодородными почвами, обладающими легкой структурой и хорошими воздушно-водным и тепловым режимами. В целях предупреждения заражения насаждения вирусами, виридами или фитоплазмами путем их заноса насекомыми и нематодами-переносчиками или сельскохозяйственными орудиями, ливневыми и тальными водами маточник должен размещаться на водоразделе или в средней части склона. Почвы, предназначенные для размещения питомника, должны быть проверены на отсутствие нематод – переносчиков вирусных болезней за год до посадки. Образцы почвы следует отбирать со слоя 10-30 см по схеме решетки согласно принятым стандартам: 20 образцов (по 1 кг) почвы с участка до 0,2 га и 40 образцов с участка от 0,2 до 4 га. Для равномерного увлажнения почвы на

участке, даже при капельном орошении, необходимо провести его выравнивание. Работа выполняется за год до закладки маточника вегетативно размножаемых подвоев (июль-август предыдущего года). Плантажная вспашка на участке проводится с целью искоренения болезней и вредителей, населяющих пахотный слой, для улучшения питательного и водно-воздушного режимов почвы в корнеобитаемом слое. Проводится не менее, чем за 6 месяцев (июнь-июль) до высадки растений для того, чтобы почва к моменту посадки сада могла осесть. После подъема плантажа до посадки почву содержат под черным паром для борьбы с сорняками и накопления влаги. Для оптимизации питательного режима почв проводят внесение минеральных удобрений с одновременной заделкой за 4-6 месяцев до посадки растений в оптимальные агротехнические сроки на глубину до 30 см.

При закладке **маточника отводков** собственным посадочным материалом проверяется факт оформления документации на категорию. При получении посадочного материала в сторонних питомниках, следует внимательно изучить сопроводительные документы на предмет действительного происхождения посадочного материала и его соответствия ГОСТ Р 59653-2021. Механизированная разбивка участка проводится с помощью культиватора, на который вместо пропалочных лап ставят окучники. Начинают разбивку с обозначения посадочных мест в рядах. По обозначенным рядам бороздорезом нарезают борозды глубиной 35-40 см. Отводки для закладки маточника используют с диаметром ствола 12-20 мм и длиной 60-70 см. При выемке подвоев из прикопа или холодильника необходимо не допустить поломки надземной части и обрыва корневой системы, а также потери этикеток. Подготовка подвоев к посадке состоит в укорачивании корней до 10 см, обматывании их в навозно-глиняную болтушку с ростовыми веществами. Сразу после посадки проводится полив из расчета 10 л воды на 1 погонный метр борозды. Через неделю полив повторяют. Дополнительно на зиму корневую систему подвоев окучивают холмиком земли высотой 10 см.

При уходе за растениями в маточнике подвоев необходимо иметь капельное орошение. Базовая комплектация системы капельного орошения включает: источник водоснабжения, насосную станцию и водозабор, магистральные трубопроводы, гравийный или сетчатый фильтры, узел внесения удобрений – бак (объём до 90 до 220 л). Растворимые минеральные удобрения смешивают в емкости с водой одновременно с поливом. Расстояние между капельницами на поливopоводе составляет 30 см, норма расхода воды – 1,2 л/час, рабочее давление 0,5-3,0 бар. При отрастании на маточных кустах побегов высотой 15-20 см, проводят ручное окучивание на высоту 5-10 см. Окучивание совмещают с удалением сорняков в рядах. В период вегетации по мере необходимости проводятся поливы, внесение удобрений, защита от болезней, вредителей, сорняков. Установление сортовой достоверности маточных растений подвоев проводят методом полевой. Выбраковке с последующей раскорчевкой подлежат растения – примеси других типов подвоев, а также ослабленные или больные растения. Примеси выкорчевывают под наблюдением апробатора, в почве не должны оставаться корни толщиной 4-5 мм, чтобы не произошло возобновление удаляемого растения.

Фитосанитарные исследования маточника вегетативно размножаемых подвоев проводят сотрудниками аккредитованных испытательных лабораторий системы Россельхозцентр или Россельхознадзор. Тестирование на вирусоносительство проводится аккредитованными испытательными лабораториями системы Россельхозцентр или Россельхознадзор. Образцы для тестирования (биопробы) отбираются сотрудниками Россельхозцентра или Россельхознадзора в установленном порядке. Выделение в ходе сортовой апробации и фитосанитарных обследований примесь и больные растения раскорчевываются и выносятся за периметр маточника с последующим сжиганием. Инвентаризация проводится с целью определения изреженности маточника для планирования объёмов последующего ремонта.

Ремонт маточника проводят осенью отводками того же типа подвоя. Проведение ремонта эффективно в течение первых двух лет после закладки маточника.

Ко времени отделения отводков (конец октября-ноябрь) часто естественный листопад еще не происходит, поэтому можно стимулировать опадение листьев с помощью опрыскивания разрешенными препаратами. Лучшее время для отделения отводков в условиях Северо-Кавказского региона – середина ноября, когда корни переходят во вторичное строение, одревесневают и при выкопке не обламываются. Вырезку побегов делают вручную секатором или ножовкой с оставлением пеньков длиной 1-2 см. что обеспечивает появление новых побегов. После отделения отводков, чтобы не допустить подмерзания головок маточных кустов. Проводят их окучивание холмиком земли 10 см. Весной для обеспечения хорошего отрастания побегов маточные кусты разокучивают с обнажением пеньков от срезов на 2-3 см. делать это надо до распускания почек, запаздывание с разокучиванием ведет к снижению прорастания почек. Качественные испытания посадочного материала проводятся аккредитованными испытательными лабораториями системы Россельхозцентр или Россельхознадзор. Образцы для тестирования отбираются сотрудниками Россельхозцентра или Россельхознадзора в установленном порядке.

Сортируют отводки на 1 и 2 сорт согласно ГОСТ Р 59653-2021. У отдельных отводков, не предназначенных для выполнения зимней прививки, секатором срезают верхушки и формируют корневую систему. Отсортированные отводки 1 и 2 сорта связывают в пучки по 50 шт. или 100 шт., на которые навешивают этикетку с названием подвоя, указанием товарного сорта и количества отводков в пучке. Отсортированные отводки переводят на прикоп, исключая подсушивание корней. Отводки прикапывают в траншеи на глубину 20-30 см так, чтобы корни и часть ствола были в земле. Почву хорошо уплотняют и проводят полив, следя за тем, чтобы все пустоты заполнились почвой. Хранение подвоя проводят в холодильнике при

температуре 0...+3 °С при влажности воздуха 85-90 %. Предварительно подвой обрабатывают фунгицидами.

Подвоям принадлежит основная роль в регулировании роста деревьев. Велико их влияние на скороплодность, продуктивность, адаптивность привитых сортов. Большой размах производственно-биологических свойств подвоев позволяет создавать различные конструкции насаждений как для определенных технологий возделывания, так и для конкретных почвенно-климатических условий.

В результате проделанной работы разработан СОП 00668034-01-2021 «Создание и ведение маточников подвойных и привойных сортов яблони».

3.3.5.2 Создание и ведение репродукционных маточников привойных сортов винограда

Развитие виноградо-винодельческой отрасли относится к приоритетным направлениям в современной аграрной политике Российской Федерации и имеет целью увеличение не только объемов производства качественной продукции и эквивалентного импортозамещения, но и собственного ресурсно-технологического обеспечения. Одной из подготовленных к утверждению Подпрограмм Федеральной научно-технической программы развития сельского хозяйства на 2017–2025 гг., утвержденной Постановлением Правительства Российской Федерации № 996 от 25 августа 2017 г., является «Развитие виноградарства, включая питомниководство». В своем целеполагании Подпрограмма ориентирована на обеспечение роста объемов производства продукции виноградарства. Обоснование увеличения промышленного производства винодельческой продукции четко изложены в этом документе.

Разработка стандартной операционной процедуры (СОП) по созданию и ведению репродукционных маточников привойных сортов винограда необходима для выполнения цели и задач изложенных в этой программе. Репродукционный маточник привойных сортов винограда служит базой для

заготовки черенков привоя, используемых в процессе прививки при производстве привитого посадочного материала, и является обязательной составной частью виноградного питомника.

Цель СОПа: разработка технологических мероприятий по созданию ресурсосберегающих способов формирования и ведения маточных насаждений привойных сортов винограда для производства высококачественного черенкового посадочного материала.

Задачи СОПа:

- создание плана технологических мероприятий;
- составление описания основных технологических процедур;
- создание технологической карты на устройство шпалеры виноградника.

Организация репродукционного маточника привойных сортов винограда состоит из нескольких технологических процессов:

1. Выбор участка и предпосадочная подготовка почвы для закладки и посадки виноградных маточников.
2. Закладка репродукционного маточника привойных сортов винограда.
3. Уход и ремонт маточников винограда с 1-го по 4-й год после посадки.
4. Заготовка черенкового материала. Заготавливаемые черенки с растений репродукционного маточника привойных сортов винограда должны отвечать требованиям и параметрам ГОСТ Р 31783-2012.

Организация репродукционного маточника привойных сортов винограда:

Следует ответственно подойти к выбору участка для закладки маточника. Почвы, предназначенные для размещения репродукционного маточника, должны быть проверены на: агрохимический состав с целью дальнейшего планирования норм удобрений; на наличие основных патогенов, а также нематод – переносчиков вирусных болезней за год до посадки. Предпосадочная подготовка почвы начинается с обработки почвы

гербицидами, которая проводится по мере отрастания сорных растений при достижении ими высоты 10-15 см, применяются гербициды сплошного действия (глифосфаты). Норма расхода препарата в зависимости от степени засоренности участка. Для оптимизации питательного режима почв проводят внесение органических удобрений при норме внесения 80 т/га. Для оптимизации питательного режима почв проводят внесение минеральных удобрений до 4 т/га. После этого проводится плантажная вспашка на глубину 60 см с целью искоренения болезней и вредителей, населяющих пахотный слой, для улучшения питательного и водно-воздушного режимов почвы в корнеобитаемом слое. Двукратно проводят следующие операции: дискование почвы, культивацию, боронование, выравнивание почвы (проводят планировщиком при заглублении 6-8 см).

Закладка репродукционного маточника винограда осуществляется апробированным и идентифицированным посадочным материалом, полученным из элитного маточника привойных сортов винограда. Перед посадкой проводится механизированная разбивка участка. Наличие техники с навигационной системой позволяет проводить разбивку участка благодаря картированию, с выбором опорной точки. Непосредственно перед посадкой привитых саженцев проводят их парафинирование. С целью предотвращения роста росяных корней одевают полиэтиленовые чехлики. Посадка саженцев проводится согласно принятой схеме размещения кустов винограда посредством виноградо-посадочной машины; с плотной заделкой корней в почву без пустот на глубину около 40 см, при этом место прививки культурного сорта на подвой должно находиться строго на уровне почвы. В ходе посадки составляется подробная схема месторасположения кустов в ряду. С целью дополнительной защиты саженцев от высыхания проводится механизированное окучивание саженцев винограда после посадки с помощью виноградо-посадочной машины.

Уходные работы в маточнике винограда в 1-й год после посадки состоят в доокучивании и разокучивании саженцев (по мере размывания почвы

у основания саженце в месте прививки), дисковании почвы в междурядьях, периодической культивации междурядий наряду с обработкой приштамбовых полос. Весной проводят чизелевание междурядий, что позволяет создать условия для лучшего проникновения в нее влаги, способствует уничтожению сорной растительности, болезней и вредителей. Обработка маточника гербицидами от сорняков проводится 1 раз в ранневесенний период. Полив саженцев производится при помощи гидробура дважды за сезон. Обломка побегов однолетних кустов проводится в начальный период их роста, является самой важной из зеленых операций и имеет большое значение как прием, дополняющий обрезку. Обработка маточника от вредителей и болезней проводится 6 раз за вегетационный период путем опрыскивания насаждений при расходе рабочего раствора до 800 л/га. С целью выявления погибших или заболевших саженцев и расчетов на их ремонт проводится инвентаризация. В этот же период методом полевой апробации проводят установление сортовой достоверности маточных кустов.

Ремонт насаждений проводится путем замены ослабленных саженцев здоровыми экземплярами с заранее запарафинированными спайками (места прививок) и последующим одеванием полиэтиленовых чехликов, с посадкой под гидробур. Сразу после посадки проводится окучивание саженцев вручную. Установка шпалеры на маточные насаждения производится не позднее второго года вегетации растений.

Уходные работы в маточнике винограда во 2-й год после посадки состоят в доокучивании и разокучивании саженцев, отремонтированных в 1-й год. У двухлетних кустов операции начинаются с сухой подвязки лоз к проволокам шпалеры весной. Для борьбы с сорняками проводится дискование междурядий (1-2 раза за сезон), культивация междурядий наряду с обработкой приштамбовых полос (шестикратно). Обработка маточника гербицидами от сорняков проводится 1 раз в ранневесенний период. Обработки от вредителей и болезней проводится 6 раз за вегетационный период путем опрыскивания насаждений при расходе рабочего раствора до 800 л/га. Весной проводится

первая обломка – удаление лишних зеленых побегов и представляет собой дополнение обрезки. Вторая обломка при обламывании двухлетних кустов винограда производится в том случае, когда уже формируются рукава, удалению подлежат все побеги, которые не могут быть использованы для формирования плодовых звеньев. Трехкратно за сезон проводится подвязка штамбов саженцев к кольям и подвязка зеленых побегов к шпалере. У двухлетних кустов удаляют пасынки в пазухах листьев. По необходимости проводят ремонт маточника, и окучивание свежесаживаемых кустов. У двухлетних кустов также проводят поправочную обрезку с учетом силы роста куста. Срезанные лозы удаляют с участка или запахивают их в измельченном виде в почву как дополнительное органическое питание растений.

Уходные работы в маточнике винограда в 3-й год после посадки состоят в доокучивании и разокучивании саженцев, отремонтированных во 2-й год. У трехлетних кустов операции начинаются с сухой подвязки лоз к проволокам шпалеры весной. Чизелевание междурядий также проводят весной, что позволяет создать условия для лучшего проникновения в нее влаги, способствует уничтожению сорной растительности, болезней и вредителей. Для борьбы с сорняками проводится дискование междурядий (3-4 раза за сезон), культивация междурядий наряду с обработкой приштамбовых полос (шестикратно). У трехлетних кустов проводят катаровку. Удаляются поверхностные корни на подземном штамбе виноградного куста до глубины 15-20 см, для лучшего роста и развития. Опрыскивание насаждений от вредителей и болезней проводят 12-тикратно при ширине междурядий 3,0 м и расходе рабочего раствора до 1000 л/га. Обрезка трехлетних кустов проводится с целью правильного формирования рукавов, из которых в последующем растут плодовые побеги. Двукратно за сезон проводятся такие операции как: первая, вторая и третья обломка побегов, подвязка зеленых побегов к шпалере, подвязка штамбов 3-х летних саженцев к кольям, первая заводка побегов за проволоку отремонтированных саженцев в 1-й год и 3-х летних кустов, вторая и третья заводка побегов отремонтированных саженцев

в 1-й год и 3-х летних кустов. Ремонт шпалеры производят в течение сезона по мере поломок.

С целью выявления погибших или заболевших саженцев и расчетов на их ремонт проводится инвентаризация, а с целью установления сортовой достоверности маточных кустов проводят полевую апробацию. С маточных кустов 3-х летнего возраста производится заготовка черенков.

Уходные работы в маточнике винограда в 4-й год после посадки полностью повторяют уход за трехлетними насаждениями.

Заготовка черенков проводится с маточных кустов, начиная 3-х летнего возраста. Длина черенков – 6-8 глазков, диаметр черенков 7-12 мм.

Качественные испытания черенков проводится аккредитованными испытательными лабораториями системы Россельхозцентр или Россельхознадзор. Образцы для испытания отбираются сотрудниками Россельхозцентра или Россельхознадзора в установленном порядке согласно нормативам.

Заготавливаемые черенки с растений репродукционного маточника привойных сортов винограда должны отвечать требованиям и параметрам ГОСТ Р 31783-2012.

Защита черенков от грибковых заболеваний проводится препаратами, допущенными к использованию в РФ. Хранят черенки в холодильнике при температуре 1-3 °С, или в подвале во влажном песке или опилках.

В результате проделанной работы разработан СОП 00668034-02-2021 «Создание и ведение репродукционных маточников привойных сортов винограда».

3.4 Выводы

Таким образом, в ходе выполненных исследований:

- установлено, что способ поверхностной обработки эксплантов земляники сортов Азия и Мальвина с помощью дезинфицирующих таблеток «ОКА-ТАБ» (0,5 % р-р) в течение 5 и 7 мин. показывает высокую

эффективность в пределах 83-86 %, поэтому способ рекомендуется к использованию;

- выявлено, что для подвоя мелкокосточковых культур АИ 1 и подвоя крупнокосточковых культур ПК СК 1 наиболее оптимальным периодом для введения в культуру *in vitro* является период с начала второй и до конца третьей декады мая, приживаемость эксплантов в это время составляет от 83,3 до 93,1 %;

- определено, что оптимальным вариантом для микроразмножения подвоя ПК СК 1 является использование среды MS с добавлением Fe-EDDHA и 6-БАП в количестве 0,75-1,0 мг/л, при этом формируется 9-10 новых побегов с одного экспланта;

- установлено, что на среде с добавлением Fe-EDDHA в качестве источника железа образуется на 13-26 % меньше витрифицированных побегов, чем на среде с Fe-EDTA;

- выявлено наличие сортоспецифической реакции подвоев винограда Берландиери x Рипариа Кобер 5ББ и Рипариа x Рупестрис 101-14 на гормональный состав среды MS – установлена повышенная отзывчивость подвоя Рипариа x Рупестрис 101-14 при концентрации фитогормонов 1,0 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ИУК в питательной среде;

- установлено, прикорневая обработка микрорастений земляники при адаптации к нестерильным условиям способствует росту растений в высоту на 25 -35 %. Средняя высота растений на фоне применений препаратов составила у сортов земляники Клери – 10,8 см, Кемия – 9,8 см, Альба – 6,4 см. Среднее количество листьев в варианте с обработкой препаратами Агринос 1 и Агринос 2 был выше на 31,0 % у сорта Альба (7,6 шт.), у сорта Клери на 22,6 % (6,6 шт.), у сорта Кемия на 7,4 % (7,3 шт.), по сравнению с контролем. Длина корневой системы в варианте с обработкой микробиологическими препаратами в 1,7-2,5 раза превышала размер корневой системы в контрольном варианте;

- выявлено, что у земляники сорта Клери обработка биопрепаратами Агринос 1 и Агринос 2 стимулировала усообразование. Уже через 3 месяца после пересадки из условий *in vitro* в условия *ex vitro*, каждое растение имело по 2-3 дочерних розетки;

- в результате проделанной работы разработан СОП 00668034-01-2021 «Создание и ведение маточников подвойных и привойных сортов яблони» и СОП 00668034-02-2021 «Создание и ведение репродукционных маточников привойных сортов винограда».

Заключение

В настоящее время ускоренное решение задач селекционного совершенствования сортимента плодовых растений юга России обусловлено углубленным изучением генофонда, правильным подбором ценных родительских форм – исходного материала для селекции, базирующимся на знании закономерностей наследования и выявлении ценных для селекции источников и доноров основных хозяйственных признаков.

На данный момент в коллекционных садах ФГБНУ СКФНЦСВВ сохраняется генофонд плодовых культур и винограда в количестве 6639 генотипов, в том числе: 958 образцов плодовых культур, из них: семечковых – 630: яблоня – 436, груша – 132, айва – 62; косточковых – 328: черешня – 119, вишня – 50, слива – 66, подвой вишни, черешни – 56, подвой сливы – 37; а также 5681 образец винограда, в том числе: столового направления – 3477, технического направления – 2151, сорта-подвой – 53.

В ходе выполнения исследований в отчетном 2021 году выполнены все поставленные задачи:

- получены новые знания о фенотипическом и генотипическом разнообразии образцов генофонда садовых культур и винограда ФГБНУ СКФНЦСВВ; выделены 2 донора по признакам: 12/3-21-25 – иммунитета яблони к парше (с геном *Rvi6*); сорт винограда Станичный - донор гена устойчивости к милдью *Rpv10*; 7 источников хозяйственно ценных признаков: 2 яблони – 12/3-21-27 и 12/1-20-34 (качества плодов), 1 груши – Июльская ранняя (высокой продуктивности), 1 черешни – Алая (зимостойкости), 2 вишни: Чудо-вишня (крупноплодности) и Джуси Фрут (устойчивости к клостероспориозу), 1 сливы домашней – Осенняя (слаборослости); выделено 5 элитных форм: яблони (12/2-21-33), айвы (3-21-2); черешни (2-13), сливы домашней (17-1-17), элитная форма винограда Тана 88-1.

- создано и передано в государственное сортоиспытание 2 новых сорта: Стасовское – иммунный к парше (ген *Rvi6*) зимний сорт яблони; 1 подвой мелкокосточковых культур ПМК СКЗ;

- оптимизирован метод оценки засухоустойчивости растений за счет введения индекса скорости потери воды, что позволило значительно повысить точность определения этого признака у плодовых растений (привойно-подвойных комбинаций и подвоев);

- приведена полноценная по структуре и содержанию компонентов агроценоза, точная по параметрам, управляемая по техногенным регламентам и ресурсам, реализующая сформированный потенциал плодового ценоза в оптимальной технолого-экономической размерности технология организации конструкции агроценоза маточно-черенкового сортового сада яблони и репродукционных маточников привойных сортов винограда;

- получен комплекс экспериментальных данных об отзывчивости садовых культур и винограда на компонентный состав питательных сред и усовершенствованы экспериментальные протоколы микроклонального размножения по этапам: введение в культуру *in vitro* и мультипликация: разработаны оптимальные параметры для стерилизации эксплантов земляники при введении в культуру; определен оптимальный период для отбора эксплантов и введения в культуру *in vitro* подвоев косточковых культур АИ1 и ПК СК1; установлен уровень генотипспецифической отзывчивости для подвоев винограда на концентрацию фитогормонов 6-БАП и ИУК, и Fe-EDDHA и 6-БАП для подвоев косточковых культур, установлены оптимальные концентрации этих компонентов; установлено положительное влияние биологически активных препаратов Агринос 1 и Агринос 2 на размножение земляники садовой *in vivo*;

- выполненный комплекс молекулярно-генетических исследований позволил апробировать широкий перечень мультилокусных и локуспецифичных ДНК маркеров для плодовых культур (яблоня, айва, абрикос) и винограда - суммарно апробировано 52 ДНК-маркера (ISSR, SSR, SCoT, CDDP). Разработан новый метод мультилокусного генотипирования – SCoT – STR и метод мультиплексной идентификации генов хозяйственно- (ген устойчивости к парше Rvi6, гены качества плодов Md-Exp7, Md-PG-1).

Выполнено генотипирование и получены ДНК-паспорта и научные знания о генетических взаимосвязях для сортов яблони, абрикоса, винограда. Идентифицирован аллельный набор по локусу гена самонесовместимости яблони для 21 генотипа по трем аллелям искомого локуса - S2, S3 и S5.

Работы по всем направлениям выполнены полностью. Получены завершённые научные разработки: заявка на патент по подвою ПМК СК 3 (заявка от 4.10.2021); СТО 00668034-122-2021 «Метод выделения засухоустойчивых форм подвоев и привойно-подвойных комбинаций плодовых культур» и СОП 00668034-01-2021 «Создание и ведение маточников подвойных и привойных сортов яблони»; СОП 00668034-02-2021 «Создание и ведение репродукционных маточников привойных сортов винограда»; СТО 00668034-132-2021 «Метод мультиплексной молекулярно-генетической идентификации генов хозяйственно-ценных признаков (Rvi6, Md-Exp7, Md-PG1) и паспортизации сортов яблони».

По результатам сравнительной оценки засухоустойчивости и степени адаптации подвоев выделен ПК СК 1 и заключен неисключительный Лицензионный договор № 1 НЛ-П/2021 от 26.03.2021 г. с ООО «ОПХ им. К.А. Тимирязева» на использование подвоя ПК СК 1.

Полученные в ходе исследований результаты содержат принципиально новые знания для развития современной отечественной селекции садовых культур и винограда, значимы для Российской Федерации и соответствуют приоритетным направлениям развития науки, технологий и техники в РФ: «Науки о жизни».

Полученные отечественные сорта и селекционные формы нового поколения, сочетающие высокие показатели качества плодов, устойчивости к грибным патогенам, адаптивности, продуктивности и технологичности, перспективны для создания интенсивных, ресурсо-энергосберегающих технологий садоводства в условиях необходимости ускоренного решения проблемы импортозамещения. Научные знания, разработанные и усовершенствованные методы в части микроклонального размножения и

молекулярно-генетических исследований соответствуют современному уровню исследований по данным направлениям. Качество полученных результатов сопоставимо с национальным и мировым уровнем с точки зрения новизны, оригинальности, значимости и точности.

Подтверждением высокого уровня актуальности и высокого уровня полученных результатов является и тот факт, что аналогичные направления исследований (селекция для создания новых перспективных сортов; биотехнология – для получения оздоровленного посадочного материала и ускоренного размножения генотипов; ДНК-маркерные технологии для решения задач селекции и эффективного управления генофондом) являются актуальными в мире и выполняются во многих ведущих мировых научных центрах, а также в крупных частных селекционных и биотехнологических компаниях. Молекулярно-генетические исследования генофонда плодовых культур и винограда выполняются во многих мировых научно-исследовательских центрах. Результаты публикуются в широком перечне научных изданий, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

В качестве примера можно привести такие селекционные компании как CIV (Centro Innovazione Varietale) Италия, выполняющие селекционной работы по яблоне, груше и землянике и также осуществляющие обеспечение безвирусным посадочным материалом. Важным направлением работы по яблоне в данной компании является создание устойчивых к парше сортов (мировую известность имеют такие их иммунные к парше сорта как Моди, Гая, Джемини, Смеральда, Фуджион). Важное место это направление селекции яблони занимает и в известной французской селекционно-питомниководческой компании Novadi, которая осуществляет селекцию яблони совместно с известным научно-исследовательским центром INRAE. Создан ряд иммунных к парше сортов с высокими потребительскими качествами плодов.

Выполняемые нами селекционные работы позволят создать сорта устойчивые к патогенам и с высокими потребительскими качествами плодов,

а также с высоким уровнем адаптации к местным климатическим условиям, что будет являться преимуществом в сравнении с сортами зарубежной селекции. Это позволяет сделать вывод о конкурентном преимуществе создаваемых сортов. В связи с этим важным является вопрос получения высококачественного посадочного материала, адаптированных к условиям региона сортов. Решение этой задачи невозможно без выполнения исследований по разработке оптимальных методов микроклонального размножения растений и их оздоровления от фитопатогенов. В мировой питомниководческой отрасли это является важным вопросом. Одним из наглядных примеров, подтверждающих это является созданная в США сеть организаций Clean Plant Network и финансируемая министерством сельского хозяйства США. В их задачи входит получение оздоровленного посадочного материала и молекулярно-генетический контроль сортовой чистоты и отсутствия вирусов и фитоплазм.

Биотехнологические и молекулярно-генетические исследования, выполняемые в рамках реализации проекта и полученные результаты являются конкурентными на мировом уровне и позволяют повысить эффективность решения задач по созданию новых сортов, конкурентноспособных на мировом уровне и развития высокотехнологичного питомниководства для обеспечения отрасли садоводства и виноградарства высококачественным посадочным материалом.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Еремин Г.В., Заремук Р.Ш., Супрун И.И., Ульяновская Е.В. Ускорение и повышение эффективности селекции плодовых культур. – Краснодар, 2010. – 55 с.
- 2 Седов Е.Н. Селекция и новые сорта яблони. – Орел: ВНИИСПК, 2011. – 624 с.
- 3 Егоров Е.А. Актуализация приоритетов в селекции плодовых, ягодных, орехоплодных культур и винограда для субъектов Северного Кавказа / Е.А. Егоров // Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии, 2012. – С. 3-45.
- 4 Keulemans J. Genetic Diversity, Ploudy and Apomixis in Putative Qbince (Cydonia oblonga) x Apple (Malus domestica) Hybrids // 28th Internat. Hort. Congr. – Lisbon, 2010. – Vol. 1. – P. 202.
- 5 Sedov E.N. Results and prospects in apple breeding // Universal J. of Plant Science. – 2013. – Vol. 1 (3). – P. 55-65.
- 6 Седов Е.Н., Седышева Г.А., Макаркина М.А., Левгерова Н.С., Серова З.М. и др. Инновации в изменении генома яблони // Новые перспективы в селекции. – Орел: ВНИИСПК, 2015. – 336 с.
- 7 Kumar P., Chandel R.S. Generative developments and pomological traits of apple (Malus × domestica Borkh.) scion cultivars canopy on dwarf clonal rootstocks in dry temperate ecosystem of north-west Himalayas // Scientia Horticulturae. – 2017. – Vol. 215, №27. – P. 28-37.
- 8 Matsumoto Shogo, Tianzhong Li, Otagaki Shungo, Yang Li, Songling Bai Efficient Breeding and Cultivation of Type 2 Red-fleshed Apple Cultivars Using a Search System for Suitable Apple Cultivar Combination // Horticultural Plant Journal. – 2018. – Vol. 4, Issue 6, P. 219-225.

- 9 Жданов В.В. Отбор устойчивых к парше сортов и сеянцев яблони на искусственных инфекционных фонах: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. – Мичуринск, 1989. – 52 с.
- 10 Жданов В.В., Седов Е.Н. Селекция яблони на устойчивость к парше. – Тула, 1991. – 208 с.
- 11 Седов Е.Н. Яблоня. – Харьков: Фолио, 2002. – 319 с.
- 12 Подгорная М.Е., Якуба Г.В., Черкезова С.Р., Прах С.В., Холод Н.А., Мищенко И.Г. Формирование устойчивых пато- и энтомосистем садовых агроценозов // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2011. – № 12 (6). – С. 107-118.
- 13 Якуба Г.В. Экологизированная защита яблони от парши в условиях климатических изменений. – Краснодар, 2013. – 213 с.
- 14 Hough L.F., Shay J.R., Dayton D.F. Apple scab resistance from *Malus floribunda* Sieb. // Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. – 1953. – Vol. 62. – P. 341-347.
- 15 Седов Е.Н., Жданов В.В. Устойчивость яблони к парше. – Орел, 1983. – 113 с.
- 16 Седов Е.Н., Жданов В.В. Селекция на устойчивость к болезням // Селекция яблони. – М., 1989. – С. 115-155.
- 17 Janick J. History of the PRI apple breeding program // Acta Horticulturae. – 2002. – Vol. 595. – P. 55-60.
- 18 Xu M.A., Korban S.S. cluster of four receptor-like genes resides in the Vf locus that confers resistance to apple scab disease // Genetics. – 2002. – Vol. 162, № 4. – С. 1995-2006.
- 19 Gessler C., Patocchi A., Sansavini S. *Venturia inaequalis* resistance in apple // Critical Reviews in Plant Sciences. – 2006. – Vol. 25, №.6. – P. 473-503.
- 20 Marini R. P. et al. Apple rootstocks: History, physiology, management, and breeding // Hort. Rev. – 2018. – Vol. 45. – P. 197-312.
- 21 Bus V.G.M. et al. Revision of the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus* // Annual Review of Phytopathology. – 2011. – Vol. 49. – P. 391-413.

22 Седов Е.Н. Комплексные программы исследований по селекции плодовых и ягодных культур и их эффективность // Селекция и сорторазведение садовых культур. – 2016. – Т.3. – С. 126-129.

23 Программа Северо-Кавказского центра по селекции плодовых, ягодных, цветочно-декоративных культур и винограда на период до 2030 года. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2013. – 202 с.

24 Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве. – Краснодар, 2012. – 569 с.

25 Методическое и аналитическое обеспечение исследований по садоводству. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2010. – 300 с.

26 Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур. – Орел, 1995. – 503 с.

27 Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. – Орел, 1999. – 606 с.

28 Методика опытного дела и методические рекомендации Северо-Кавказского зонального НИИ садоводства и виноградарства. – Краснодар, 2002. – 215 с.

29 Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Яблоня. RTG/0014/2. – URL: http://www.gossort.com/mtd_dus.html [Электронный ресурс]. – 2010.

30 Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Айва. RTG/0100/2. – URL: http://www.gossort.com/mtd_dus.html [Электронный ресурс].

31 Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Груша. RTG/0015/2. – URL: http://www.gossort.com/mtd_dus.html [Электронный ресурс].

32 Хавкин Э.Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве // Сельскохозяйственная биология. – 1997. – № 5. – С.3-19.

33 Ahmad R., Anjum M.A., Naz S. and Balal R.M. Applications of Molecular Markers in Fruit Crops for Breeding Programs // *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, *Phyton*, 2021. – Vol. 90(1). – P. 17-34. DOI:10.32604/phyton.2020.011680.

34 Nybom H., Laciš G. Recent Large-Scale Genotyping and Phenotyping of Plant Genetic Resources of Vegetatively Propagated Crops // *Plants*. – 2021. – Vol. 10. – P.415. – URL: <https://doi.org/10.3390/plants10020415>.

35 Alzohairy A.M., Gyulai G.B., Ramadan M.F. et al. Retrotransposon-based molecular markers for assessment of genomic diversity // *Funct Plant Biol.* – 2014. – № 41(8). – P. 781-789. DOI: 10.1071/FP13351.

36 Strioto D.K., Kuhn B.C., Nagata W.S.L. et al. Development and use of retrotransposons based markers (IRAP/REMAP) to assess genetic divergence among table grape cultivars // *Plant Genetic Resources*. – 2019. – № 1. – P. 8. DOI:10.1017/s1479262119000029.

37 Collard B.C.Y., Mackill D.J. Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants // *Plant Mol Biol Rep.* – 2009. – № 27. – P. 86. – URL: <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0060-5>

38 Collard B.C.Y., Mackill D.J. Conserved DNA-Derived Polymorphism (CDDP): A Simple and Novel Method for Generating DNA Markers in Plants // *Plant Mol Biol Rep.* – 2009. – № 27. – P. 558. – URL: <https://doi.org/10.1007/s11105-009-0118-z>.

39 Суриков И. М. Несовместимость и эмбриональная стерильность растений. – М., 1991. – 220 с.

40 Janssens G. A., Goderis I.J., Broekaert W.F. et al. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR // *Theor. Appl. Genet.* – 1995. – Vol. 91. – P. 691-698.

41 Broothaerts W. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles // *Theor Appl Genet.* – 2003. – Vol. 106. – P. 703–714.

42 Hegedûs A. Review of the self-incompatibility in apple (*Malus* × *domestica* Borkh., syn.: *Malus pumila* Mill.) // International Journal of Horticultural Science. – 2006. – Vol. 12. – P. 31–36.

43 Vinatzer B.A., Patocchi A., Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini S., Gessler C. Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the Vf scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in *Malus* germplasm // Plant Breeding. – 2004. – № 123(4). – P. 321–326.

44 Gessler C., Pertot I. Vf scab resistance of *Malus* // Trees. – 2012. – № 26. – P. 95–108. DOI 10.1007/s00468-011-0618-y.

45 Costa F., Van de Weg W.E., Stella S. et al. Map position and functional allelic diversity of Md-Exp7, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*) // Tree Genetics & Genomes. – 2008. – №4. – P. 575–586.

46 Nybom H., Ahmadi-Afzadi M., Sehic J. et al. DNA marker-assisted evaluation of fruit firmness at harvest and post-harvest fruit softening in a diverse apple germplasm // Tree Genetics & Genomes. – 2012. – DOI 10.1007/s11295-012-0554-z.

47 Costa F., Peace C. P., Stella S. et al. QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) // J. Expt. Bot. – 2010. – № 61. – P. 3029–3039.

48 Wakasa Y., Kudo H., Ishikawa R. et al. Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential // Postharvest Biol. Technol. – 2006. – №39. – P. 193–198.

49 Mann H. S., Alton J. J., Kim S. et al. Differential expression of cell-wall-modifying genes and novel cDNAs in apple fruit during storage // J Amer. Soc. Hort. Sci. – 2008. – №133. – P. 152–157.

50 Longhi S., Hamblin M. T., Trainotti L. et al. A candidate gene based approach validates Md-PG1 as the main responsible for a QTL impacting fruit texture in apple (*Malus domestica* Borkh.) // BMC Plant Biol. – 2013. – №13. – P. 37.

51 Longhi S., Moretto M., Viola R., Velasco R., Costa F. Comprehensive QTL mapping survey dissects the complex fruit texture physiology in apple (*Malus x domestica* Borkh) // J. Exp. Bot. – 2012. – № 63 (3). P. – 1107-1121. 10.1093/jxb/err326

52 Schwander F., Eibach R., Fechter I. et al. Rpv10: a new locus from the Asian Vitis gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine // Theor. App. Genet. – 2012. – Vol. 124, No. 1. – P. 163–176.

53 Nei, M. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. / M. Nei, W-H. Li // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – Vol. 76. – P. 5269-5273.

54 Иванова-Ханина Л.В. Оптимизация условий введения в малины и ежевики в культуру *in vitro* // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета [Электронный ресурс]. – 2014. – № 101 (07). – URL: <http://ej.kubagro.ru/2014/01/pdf/65.pdf>

55 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.

56 Муратова С.А., Янковская М.Б., Шорников Д.Г. и др. Особенности введения в культуру *in vitro* плодовых и ягодных растений // Плодоводство. ИП НАН Беларуси. – Самохваловичи, 2005. – Т. 17, ч. 2. - С. 102-104.

57 Amiri S., Ashtari S., Babaiy A.H. et al. Control of contamination during micropropagation process of Rootstocks Mariana (*Prunus mariana*) // Annals of Biological Research. – 2013. – Vol. 4 (3). – P. 149-151.

58 Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе: Учебное пособие / Р.Г. Бутенко. - М.: МФБК – ПРЕСС, 1999. - 160 с.

59 Rezadost H.M., Sohan M.M., Hatamzadeh A., Mirzai R.M. In vitro regeneration of sour orange *Citrus aurantium* L. via direct organogenesis // Plant Knowledge Journal. – 2013. – Vol. 2. – P. 150-156.

60 Teixeira da Silva J.A., Gulyás A., Magyar-Tábori K. et al. In vitro tissue culture of apple and other *Malus* species: recent advances and applications // Planta. – 2019. – Vol. 249. – P. 975-1006. – URL: <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03100-x>.

61 Кастрицкая М.С., Змушко А.А., Красинская Т.А. Микроразмножение растений рода *Prunus* L.: инициация и размножение // В сб.: «Плодоводство», РУП «Институт плодоводства». - Минск, 2018. – С. 258-264.

62 Dorić D., Ognjanov V., Ljubojević M., Barać G., Dulić J., Pranjić A., Dugalić K. Rapid Propagation of Sweet and Sour Cherry Rootstocks // Not Bot Horti Agrobi. – 2014. – 42 (2). – P. 488-494. – URL: <https://www.notulaeobotanicae.ro/index.php/nbha/article/view/9671/7757>

63 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.

64 Муратова С.А., Янковская М.Б., Шорников Д.Г. и др. Особенности введения в культуру in vitro плодовых и ягодных растений // Плодоводство: Научные труды, Самохваловичи, 2005. – Т. 17, Ч. 2. – С. 182-184.

65 Мацнева О.В., Ташматова Л.В. Оптимизация сроков введения земляники в культуру in vitro // Современное садоводство [Электронный ресурс]. – 2018. – №2. – С. 78-83. – URL: <http://journal.vniispk.ru/pdf/2018/2/38.pdf> (Дата обращения: 26.07.2018 г.)

66 Кухарчик Н.В., Семенас С.Э., Чиковани М.С., Пугачев Р.М. Роль экспланта при инициации культур in vitro некоторых плодовых и ягодных растений // Плодоводство: ИПНАН Беларуси – Самохваловичи, 1999. – Т.12. – С. 25-28.

67 Высоцкий В.А. Повышение эффективности культуры изолированных зародышей плодовых растений // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: материалы конф. – М., 2000. – С. 148-149.

68 Mihaljevic I., Dugalic K., Tomas V. et al. In vitro sterilization procedures for micropropagation of «Oblacin-ska» sour cherry // Journal of Agricultural Sciences. – 2013. – Vol. 58(2). – P. 117-126. – URL: <http://joas.agrif.bg.ac.rs/archive/article/349>

69 Munir M., Iqbal S., Baloch J.U.D., Khakwani A.A. In vitro explant sterilization and bud initiation studies of four strawberry cultivars // Journal of Applied Horticulture. – 2015. – Vol. 17 (3). – P. 192-198.

70 Ghasheem N.AL., Stănică F., Peticilă A. G., Venat O. In vitro effect of various sterilization techniques on peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) explants // Scientific Papers. Series B, Horticulture. – 2018. – Vol. LXII. – P.227-234.

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

72 Lazo Javalera M.F., Troncoso Rojas R., Tiznado Hernández M. E. et al. Surface disinfection procedure and in vitro regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds // Springer Plus. – 2016. – Vol. 5:453. – 9 p. - DOI 10.1186/s40064-016-2081-0. – URL: <https://springerplus.springeropen.com/track/pdf/10.1186/s40064-016-2081-0>

73 Castillo A., Cabrera D., Rodríguez P. et. al. A. In vitro Micropropagation of CG41 Apple Rootstock // Proc. VIII th IS on In Vitro Culture and Horticultural Breeding. Acta Hort. – 2015. – Vol. 1083. – P. 569-576. DOI:10.17660/ActaHortic.2015.1083.76

74 Stanisavljević A., Bošnjak D., Štolfa I. et al. Sterilization of different explant types in micropropagation of CAB-6P and Gisela 6 cherry rootstock // POLJOPRIVREDA. – 2017. – Vol. 2(23). – P. 31-37. – DOI: 10.18047/poljo.23.2.5. – URL: <https://hrcak.srce.hr/file/282499>

75 Bošnjaković D., Ognjanov V., Barać G., Ljubojević M. et al. Micropropagation of low-vigorous rootstock selections for sweet and sour cherry // J Pomol. – 2013. – Vol. 47. – P. 121-128.

76 Ghanbari A. Impacts of plant growth regulators and culture media on in vitro propagation of three apple (*Malus domestica* Borkh.) rootstocks // Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding. – 2014. – Vol. 3(1). – P. 11-20. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/305264755>

77 Buntsevich L.L., Bamatov I. M., Vinter M.A. Improvement of the efficiency of sanitation and primary propagation technology of garden strawberry in vitro culture // Journal of Pharmaceutical sciences and research. – 2018. – Vol. 10(1). – P. 79-84. – URL: <http://www.jpsr.pharmainfo.in/issue.php?page=101>

78 Qin Y.H., Teixeira da Silva J.A., Bi J.H. et al. Response of in vitro strawberry to antibiotics // Plant Growth Regulation. – 2011. – Vol. 65(1). – P.183-193.

79 Druart Ph. Micropropagation of *Prunus* species relevant to cherry fruit production // Methods Mol Biol. – 2013. – Vol. 11013. – P. 36-119. DOI: 10.1007/978-1-62703-074-8_9.

80 Khamurzaev S.M., Bamatov I.M., Butsaeva E.M., Sibiryatkin S.V. The use of the Driver-Kuniyuki nutrient medium for micropropagation of rootstocks of lc-52 (*Cerasus vulgaris* x *Cerasus fruticose*) and Gizela 6 (*Peisica Vulgaris* X *Cerasus Canescens*) Stone Fruit Crops // Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences. – 2018. – Vol. 6(3). – P. 623 – 627. https://www.jebas.org/uploads/206_pdf.pdf 33

81 Mahdavian M., Bouzari N., Abdollahi H. // Biharean Biologist. – 2011. – № 5(2). – P. 86-90.

82 Kassaye E., Bekele B.D. // Biotechnology International. – 2015. – № 8(4). – P. 137-148. – URL: <http://www.bti.org.in/wp-content/uploads/2016/08/BTI-8.4.4.pdf>

83 Salih Maha I., Shmarey Ibrahim A. Al, Al Dabagh Farqad M.K. Indole-3-Butyric Acid and Naphthalene Acetic Acid Impacts on in Vitro Rooting of Mariana

and Nemaguard Rootstocks // IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS). – 2016. – Vol. 9(7,2). – P. 50-53. – URL: <https://www.iosrjournals.org/iosr-javs/papers/vol9-issue7/Version-2/J0907025053.pdf>

84 Pakyürek M., Hepaksoy S. A research on micropropagation of Pixy Rootstock // Euroasia Journal of Mathematics-Engineering Natural & Medical Sciences. – 2020. – Vol. 8. – P. 146-159. – URL: https://pdfs.semanticscholar.org/e826/823995ef7e39e0f76b633e5219bd96637925.pdf?_ga=2.109193989.1605528451.1595838082-1484798313.1595244390

85 Ostadsharif O., Garoosi G., Haddad R., Nezami E. Effect of Medium, Sugar and Plant Growth Regulators on Micropropagation of Saint Julien A (*Prunus domestica* spp. Insititia) Rootstock // Agricultural Biotechnology. – 2014. – V.13(1). – P. 3-5. – URL: http://www.ikiu.ac.ir/public-files/profiles/items/090ad_1435487423.pdf

86 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.

87 Zou Y.N. Micropropagation of Chinese plum (*Prunus salicina* Lindl.) using mature stem segments // Horti Agrobot. – 2010. – Vol. 38(3). – P. 214-218.

88 Antonopoulou C., Dimassi K., Therios I., Chatzissavvidis C., Papadakis I. The effect of Fe-EDDHA and of ascorbic acid on in vitro rooting of the peach rootstock GF-677 explants // Acta Physiol Plant. – 2007. – Vol. 29. – P.559–561. DOI10.1007/s11738-007-0067-9

89 Soni M., Thakur M., Modgil M. In vitro multiplication of Merton I. 793– An apple rootstock suitable for replantation // Indian Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10. – P. 362-368.

90 Маркова М.Г., Сомова Е.Н. Влияние питательной среды и спектрального состава света на размножение земляники in vitro // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2018. – Т. 63, № 2. – С. 35-41.

91 Мороз Д.С., Шпак М.Ю., Петровская Е.А., Медведик С.Е. Особенности адаптации меристемных растений земляники садовой *Fragaria x ananassa* Duch. в условиях светодиодного освещения // Вестник БарГУ. Серия: БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ. СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ. – 2019. – № 7. – С. 73-82.

92 Кухарчик Н.В., Красинская Т.А., Семенас С.Э., Колбанов Е.В. Адаптация регенерантов *in vitro* // Плодоводство / ИПНАН Беларуси. – Самохваловичи, 2006. – Т. 8, ч. 2. – С174-181.

93 Yildiz A., Cagdas A., Aslihan A., Yesim Y., Sedat S., Ibrahim O. The effect of mycorrhiza in nutrient uptake and biomass of cherry rootstocks during acclimatization // Romanian Biotechnological Letters. – 2010. – Vol. 15, N 3. – P. 5246-5252.

94 Иванова-Ханина Л.В. Влияние состава субстрата на приживаемость микрорастений *Vitis vinifera* L. *in vivo* // Ekosystemy. – 2018. – Vol. 13 (43). – P. 84-88.

95 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.

96 Тимофеева О.А., Невмержицкая Ю.Ю. Клональное микроразмножение растений: учеб.-метод. пособие. – Казань: Казанский университет, 2012. – 56 с.

97 Тимофеева С.Н., Смолькина Ю.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Технологии микроразмножения *in vitro*: учеб.-метод. пособие. – Саратов: Саратовский государственный университет, 2016. – 38 с.

Приложение 1
Паспорт разработанной технологии
Создание и ведение маточников подвойных и привойных сортов садовых культур
(на примере яблони)
(СОП 00668034-01-2021)

Показатель	Характеристика технологии
Назначение технологии	Технология предназначена для производства черенков и отводков как исходного материала для производства посадочного материала яблони высших категорий качества
Описание технологии	Технология создания и ведения маточников подвойных и привойных сортов садовых культур включает: I. Организацию конструкции агроценоза маточно-черенкового сортового сада, включающую следующие основные технологические процессы: – выбор участка и предпосадочная подготовка почвы; – закладка маточно-черенкового сортового сада; – уход за молодыми насаждениями; – уход за продуктивными насаждениями; – заготовка черенков. II этап: Организацию конструкции маточного насаждения для производства вегетативно размножаемых подвоев яблони, состоящую из следующих технологических процессов: – выбор участка и предпосадочная подготовка почвы; – закладка маточника отводками; – уход за растениями в маточнике подвоев; – отделение отводков. Технологические критерии выбора участка и режимы технологических процессов создания и ведения маточников подвойных и привойных сортов садовых культур на каждом этапе приведены в СОП 00668034-01-2021.
Основные показатели технологии	Технология характеризуется следующими основными показателями: – высокой продуктивностью маточно-черенкового сортового сада яблони; – высокой стандартностью получаемого черенкового материала сортов яблони; – высокой продуктивностью маточных насаждений вегетативно размножаемых подвоев яблони; – высоким уровнем выхода стандартных отводков яблони по биометрическим показателям: диаметр ствола подвоя, высота подвоя; – высоким выходом стандартных саженцев яблони во 2 поле питомника по показателям: диаметра штамба, высота, количество и длина боковых ветвей саженцев; – высокой адаптивностью сортимента выпускаемого посадочного материала, обусловленной использованием генотипического разнообразия подвоев и привойно-подвойных комбинаций яблони по признакам устойчивости к стрессорам среды.

	Конкурентные преимущества представленной технологии создания и ведения маточников подвойных и привойных сортов садовых культур (на примере яблони) обеспечены учетом особенностей зональных почвенно-климатических условий, подбором породно-сортового состава с максимальной степенью реализации биопотенциала в этих условиях и конкретизацией технологических требований к выполнению агроприемов, реализующих сформированный потенциал маточников подвойных и привойных сортов садовых культур в оптимальной технолого-экономической размерности.
Сведения об использованных при разработке технологии научно-технических заделах (собственных разработках) Получателя	Разработка технологии создания и ведения маточников подвойных и привойных сортов садовых культур базируется на научно-техническом заделе, полученном в результате проведенных ранее исследований и включает: – <i>структурирование элементов технологии ведения маточников подвойных и привойных сортов яблони на основе системного анализа</i> (Егоров Е.А., Кузнецова А.П., Ефимова И.Л. и др. Технолого-территориальная организация производства саженцев и других видов посадочного материала плодовых, орехоплодных и ягодных культур (репродукционный питомник): методические рекомендации. – Краснодар, 2017. – 41 с.); – <i>разработанный алгоритм, основные приемы и режимы технологических процессов производства посадочного материала категорий «исходный», «базисный», «сертифицированный» садовых культур</i> (Кузнецова А.П., Ефимова И.Л., Карпушина М.В. Алгоритм производства сертифицированного посадочного материала // в книге: Организация технологических процессов производства посадочного материала плодовых культур. – Краснодар, 2019. – С. 167-169); – <i>установленные на основе многолетних исследований требования к почвам и подбору участков для маточников</i> (Кузнецова А.П., Ефимова И.Л., Алферов В.А., Гриднев С.И., Федоренко А.М. Территориальная организация производства саженцев и других видов посадочного материала садовых культур // в книге: Организация технологических процессов производства посадочного материала плодовых культур. – Краснодар, 2019. – С. 20-27); – <i>выявленные особенности создания и содержания маточников яблони на юге России</i> (Егоров Е.А., Кузнецова А.П., Ефимова И.Л. и др. Типовые технологии и технологические карты выращивания сертифицированных подвоев и привоев плодовых культур // в книге: Организация технологических процессов производства посадочного материала плодовых культур. – Краснодар, 2019. – С. 34-162).
Сведения об эффективности и конкурентоспособности технологии	Эффективность и конкурентоспособность технологии подтверждается следующими результатами: – установленными оптимальными параметрами выращивания маточников привойных сортов и маточных насаждений вегетативно размножаемых подвоев для производства

	стандартных саженцев яблони в новых экологических условиях юга России, позволяющих обеспечить рост рентабельности производства на 11,8 процентных пункта (раздел 3 отчета); – данными по оценке в изменяющихся экологических условиях генотипического разнообразия подвоев и привойно-подвойных комбинаций яблони по признакам устойчивости к холодовым и высокотемпературным стрессам на фоне повышенного температурного режима, позволяющим провести обновление сортимента не менее, чем на 10 % в течение 5 лет (Егоров Е.А., Супрун И.И., Драгавцева И.А., Кузнецова А.П. и др. Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2012. – 569 с.); – многолетними данными по оценке и выделению высокопродуктивных сортов и подвоев яблони с повышенными устойчивостью к погодным стрессам и продуктивностью, обеспечивающими более высокую эффективность технологических процессов производства плодов и увеличение продуктивности маточных насаждений яблони до 18% (Ульяновская Е.В., Кузнецова А.П., Ефимова И.Л. и др. Основные результаты комплексных исследований СКФНЦСВВ и СОСС по селекции плодовых растений Ермоленко В.Г., Федоренко А.М. // Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. – 2020. – Т. 27. – С. 17-31); – использованием перспективных подвоев яблони серии СК (Северный Кавказ), внедрение которых в промышленное производство позволит рационально расходовать био- и техногенные ресурсы и в максимальной степени реализовать потенциал привитых сортов (Алехина Е.М., Алибеков Т.Б., Артюх С.Н. и др. Программа Северо-Кавказского центра по селекции плодовых, ягодных, цветочно-декоративных культур и винограда на период до 2030 года / Под ред. Е.А. Егорова, Г.В. Еремина, И.А. Ильиной и др. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2013. – 202 с.); – разработанной технологией производства сертифицированного посадочного материала плодовых культур высшей категории качества (Кузнецова А.П., Супрун И.И., Ефимова И.Л. Обеспечение репродукционных питомников маточными растениями категории «базисные» для производства сертифицированного посадочного материала плодовых культур // Агропромышленная газета Юга России. – 2019. – № 31-32 (548-549). – С. 15-16.) Эффективность и конкурентоспособность технологии подтверждается следующими параметрами: – увеличением продуктивности маточных насаждений вегетативно размножаемых подвоев яблони на 18 %; – повышением выхода стандартных отводков яблони на 28 %; – повышением выхода стандартных саженцев яблони на 17 %;
--	---

	– увеличением биометрических показателей растений в 1 поле питомника при выращивании саженцев яблони: диаметр ствола подвоя на 7-15 %, высоту подвоев на 10-22 %; во 2 поле питомника: диаметр штамба на 8-17-%, высоту саженцев на 9-16 %, количество боковых ветвей на 30-47 %; – снижением себестоимости продукции на 8,6 %; – обеспечением роста рентабельности производства на 11,8 процентных пункта.
Сведения о результатах интеллектуальной деятельности, в том числе селекционных достижениях, использованных в технологии	При разработке технологии были использованы полученные ранее результаты интеллектуальной деятельности: Свидетельство о регистрации базы данных RU 2019621442, 09.08.2019. Заявка № 2019621346 от 01.08.2019. База типовых технологий и технологических карт по производству посадочного материала плодовых культур. Авторы: Егоров Е.А., Шадрина Ж.А., Кочьян Г.А., Кузнецова А.П., Ефимова И.Л.

Руководитель



Егоров Е.А.

Приложение 2
Паспорт разработанной технологии
Создание и ведение маточников привойных и подвойных сортов винограда
(стандартная операционная процедура)
(СОП 00668034-02-2021)

Показатель	Характеристика технологии
Назначение технологии	Распространяется на виноградное питомниководство, а именно ведение маточников привойных и подвойных сортов винограда с целью получения черенков как исходного материала для производства саженцев
Описание технологии	Маточные насаждения виноградной культуры закладываются посадочным материалом высших категорий качества (оригинальные, элитные) и возделываются с целью получения черенков и саженцев, используемых для размножения данной культуры. Технология создания и ведения репродукционного маточника подвойных и привойных сортов винограда, состоит из следующих основных технологических процессов: – выбор участка и предпосадочная подготовка почвы для закладки и посадки виноградных маточников; – закладка репродукционного маточника привойных сортов винограда; – уход и ремонт маточников винограда в первый год после посадки; – уход и ремонт маточников винограда во второй год после посадки; – уход и ремонт маточников винограда в третий год после посадки; – уход и ремонт маточников винограда в четвертый год после посадки; заготовка черенкового материала. Технологические критерии выбора участка и режимы технологических процессов закладки, ухода и ремонта маточников подвойных и привойных сортов винограда на каждом этапе приведены в СОП 00668034-02-2021.
Основные показатели технологии	Технология характеризуется следующими основными показателями: – высоким выходом подвойных черенков; – увеличением притока органики в почву и улучшением воднофизических, тепловых и воздушных свойств почвы в маточнике; – формированием наиболее устойчивых к стресс-факторам среды и высокопродуктивных ампелоценозов; – высоким качеством посадочного материала; – снижением техногенного прессинга на ампелоценоз; – низкой ресурсоемкостью (снижением издержек) на производство черенкового материала. Указанные конкурентные преимущества достигаются за счет: – применения формирования кустов винограда (патент № RU 2615479 С2), что позволяет увеличить выход подвойных

	черенков на 32%, на 0,4 г/см³ плотность древесины и на 0,5% накопление в них углеводов; – применения биологизированных способов содержания почвы на основе травосеяния и вовлечения микроорганизмов в почвообразовательный процесс, что способствует увеличению притока органики в почву, восстановлению малого биологического круговорота элементов питания, естественного процесса воспроизводства почвенного плодородия, улучшению воднофизических, тепловых и воздушных свойств почвы, формированию наиболее устойчивых и высокопродуктивных ампелоценозов; – качества посадочного материала, что способствует снижению техногенного прессинга на 5%, обеспечению стабильного репродукционного потенциала ампелоценоза и снижению издержек относительно доходной части на 2,5 пункта. Комплекс конкурентных преимуществ обеспечивает рост рентабельности заготовки высококачественных черенков винограда на 2,5 п.п.
Сведения об использованных при разработке технологии научно-технических заделах (собственных разработках) Получателя	Основой для выполненных исследований послужили результаты многолетних работ по сортоизучению и ведению маточников привойных и подвойных сортов винограда: – изучены генотипические и фенотипические особенности сортов винограда, рекомендуемых для возделывания в агроэкологических условиях Северо-Кавказского региона; – для подбора сортимента при закладке маточника выявлены закономерности адаптации сортов к стресс-факторам природной среды, обуславливающие формирование устойчивых и продуктивных насаждений винограда, соответствующих агроэкологическим условиям Краснодарского края; – установлены зависимости влияния схемы посадки кустов винограда на ростовую активность побегов, качество черенкового материала; Полученные ранее результаты опубликованы в следующих научных публикациях: 1. Алейникова Г.Ю. Ростовые процессы растений винограда в зависимости от схемы посадки и нагрузки кустов побегами/Алейникова Г.Ю., Сегет О.Л., Цику Д.М., Разживина Ю.А.// Плодоводство и виноградарство Юга России. 2020. № 65(5). С. 222-237. DOI: 10.30679/2219-5335-2020-5-65-222-237. Режим доступа (e-library): https://www.elibrary.ru/item.asp?id=43999687. ИФ 0,641, РИНЦ, ВАК 2. Алейникова Г.Ю. Влияние схемы посадки и нагрузки кустов побегами на ростовые процессы, хозяйственную продуктивность и качество винограда/ Алейникова Г.Ю., Марморштейн А.А., Разживина Ю.А.// Магарах. Виноделие и виноградарство. 2020, 22(2), с. 134-141. DOI: 10.35547/IM.2020.83.17.010. https://elibrary.ru/item.asp?id=42990486

	3. Алейникова Г.Ю., Себет О.Л., Морморштейн А.А., Разживина Ю.А. Изменение ростовых процессов и продуктивности листового аппарата винограда под влиянием разной схемы посадки и нагрузки кустов побегами. Аграрная Россия. 2021. 10. с. 15-22. DOI: https://doi.org/10.30906/1999-5636-2021-10-15-22. http://agros.folium.ru/index.php/agros/article/view/3147 4. Патент № RU 2615479 C2. «Способ формирования подвойных кустов винограда». Заявка 2015131393, от 28.07.2015. Дата регистрации 04.04.2017, https://www.elibrary.ru/item.asp?id=38279951
Сведения об эффективности и конкурентоспособности технологии	Эффективность технологии обусловлена оптимизацией регламентов агротехнических приемов по уходу за насаждениями в соответствии с биологическими особенностями сорта в конкретных условиях его произрастания и заключается в: – увеличении выхода стандартной лозы до 32%; – вызревании лозы до 100% – увеличении выхода стандартных саженцев до 60-65% – снижении затрат на устройство, ремонт шпалеры и ведение подвойных кустов. В целом за счет улучшения качества посадочного материала, полученного из черенкового материала маточника привойных и подвойных сортов винограда, повысится уровень реализации продукционного потенциала ампелоценоза на 5-10%. Конкурентные преимущества технологии по сравнению с аналогами) так же обусловлены выращиванием преимущественно сортов отечественной селекции, обладающих: – высокой агробиологической и экологической устойчивостью ампелоценозов к биотическим и абиотическим стрессорам; – низкой восприимчивостью к основным болезням, что сопровождается упрощением агротехнологий, снижением химического прессинга, улучшением экологии и, как следствие, качества продукции. – высоким адаптивным потенциалом в условиях изменения климата, биотического и абиотического проявления стрессоров; – высоким уровнем реализации потенциала хозяйственной продуктивности винограда, в среднем 60 % по Краснодарскому краю. Это подтверждается данными в методических рекомендациях: 1. Сортимент для создания высокоадаптивных насаждений винограда в агроэкологических условиях Северо-Кавказского региона: Методические рекомендации /М.И. Панкин, В.С. Петров, Г.Ю. Алейникова, А.А. Морморштейн; Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия. – Краснодар: Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, 2021. – 74 с. – ISBN 978-5-98272-140-2 2. Петров В.С. Биологизированные способы содержания почвы на виноградниках: Учебное пособие. Краснодар: ФГБНУ СКФНЦСВВ, 2021. 131 с. ISBN 978-5-98272-138-9

Сведения о результатах интеллектуальной деятельности, в том числе селекционных достижениях, использованных в технологии	При разработке технологии были использованы полученные ранее результаты интеллектуальной деятельности, как участниками проекта, так и учеными ФНЦ «Виноградарство и виноделие» ФГБНУ СКФНЦСВВ: 1. Свидетельство о регистрации в Госреестре баз данных № 2020621941 от 19.10.2020 База данных карбонатных почв Анапского района Краснодарского края. Авторы: Лукьянов А.А., Петров В.С., Денисова Т.А. Правообладатель: ФГБНУ СКФНЦСВВ 2. Свидетельство о регистрации в Госреестре баз данных №2021622650 от 25.11.2021. База данных виноградопригодных почв Таманского полуострова Краснодарского края. Авторы: Лукьянов А.А., Петров В.С., Денисова Т.А. Правообладатель: ФГБНУ СКФНЦСВВ 3. Свидетельство о регистрации в Госреестре баз данных №2018621381 от 28.08.2018 База типовых технологий и технологических карт по возделыванию виноградных насаждений. Авторы: Егоров Е.А., Шадрина Ж.А., Кочьян Г.А., Петров В.С., Панкин М.И., Алейникова Г.Ю. Правообладатель: ФГБНУ СКФНЦСВВ 4. Свидетельство о регистрации в Госреестре баз данных №2019621201 от 05.07.2019 База данных высокоадаптивных и устойчивых отечественных и интродуцированных сортов винограда для Юга России. Авторы: Панкин М.И., Петров В.С., Алейникова Г.Ю. Правообладатель: ФГБНУ СКФНЦСВВ. 5. Свидетельство о регистрации в Госреестре баз данных №2018620924 от 26.06.2018. База параметров применения макро- и микроудобрений на культуре винограда в зависимости от природно-климатических зон Краснодарского края. Авторы: Руссо Д.Э., Красильников А.А. Правообладатель: ФГБНУ СКФНЦСВВ 6. Алейникова Г.Ю., Петров В.С., Мarmorштейн А.А. Агроклиматические показатели агротерритории Краснодарского края за 1989-2018 годы для выявления оптимальных агроэкологических условий и рационального размещения виноградных насаждений // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2020620453. Заявка № 2020620286 от 09.03.2020. Регистрация в Реестре баз данных 11.03.2020 г.
--	--

Руководитель



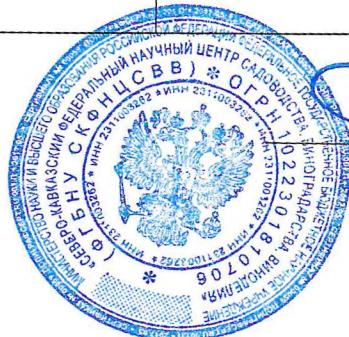
Егоров Е.А.

Приложение 3
Паспорт разработанной технологии
Метод выделения засухоустойчивых форм подвоев и привойно-подвойных
комбинаций плодовых культур
(СТО 00668034-122-2021)

Показатель	Характеристика технологии
Назначение технологии	Метод предназначен для оценки засухоустойчивости подвоев и посадочного материала привойно-подвойных комбинаций для выделения сортообразцов, устойчивых к высоким летним температурам и недостатку влаги
Описание технологии	Оценка засухоустойчивости подвоев и посадочного материала привойно-подвойных комбинаций базируется на использовании метода гравиметрии и включает следующие этапы: – отбор растительного материала; – взвешивание листьев: в самом начале опыта, через 2, 4, 24 часа; – расчет показателя «Индекс скорости потери воды». Основные критерии отбора растительного материала, условия проведения и расчетные формулы приведены в СОП 00668034-122-2021. Новизна метода заключается во введении для расчета засухоустойчивости плодовых культур показателя «Индекс скорости потери воды (ИСПВ)», формулы для его определения и формулы взаимосвязи показателя «Засухоустойчивость» с величиной отклонения ИСПВ от базовой величины.
Основные показатели технологии	Основными показателями разработанного метода, обеспечивающими конкурентные преимущества и возможность эффективного его применения, являются: – высокая точность выделения засухоустойчивых форм подвоев и привойно-подвойных комбинаций плодовых культур; – простота применения; – низкая ресурс- и трудоемкость. Высокая точность выделения засухоустойчивых форм подвоев и привойно-подвойных комбинаций плодовых культур обусловлена использованием в качестве основного критерия оценки засухоустойчивости расчетного показателя «индекса скорости потери воды» и его значения отклонения от базовой величины, что подтверждено результатами многолетних исследований большой выборки сортов семечковых и косточковых плодовых культур. При использовании данной разработки совпадение в оценке контрольных (модельных) образцов на 30 % выше, чем при использовании классической схемы оценки.
Сведения об использованных при разработке технологии научно-технических заделах (собственных)	Основой для выполненных исследований и разработки метода оценки засухоустойчивости форм подвоев и привойно-подвойных комбинаций плодовых культур послужили: – результаты многолетних работ по выделению засухоустойчивых форм плодовых культур, рекомендуемых для

разработках) Получателя	возделывания в агроэкологических условиях Северо-Кавказского региона; – выделение модельных объектов с разной степенью засухоустойчивости в полевых условиях при высоких летних температурах; – установленные закономерности соотношения водопотери растительной ткани за короткий и продолжительный период времени Полученные ранее результаты опубликованы в следующих научных публикациях: 1. Ульяновская Е.В., Кузнецова А.П., Ефимова И.Л., Ермоленко В.Г., Федоренко А.М. Основные результаты комплексных исследований СКФНЦСВВ и СОСС по селекции плодовых растений // Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. – 2020. – Т. 27. С. – 17-31. 2. Кузнецова А.П., Дрыгина А.И., Федоренко А.М., Маслова М.В. Выделение новых устойчивых подвоев для крупнокосточковых культур в условиях юга России // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2020. – № 64 (4). – С. 128-142. 3. Kuznetsova A.P., Dragavtseva I.A., Shcheglov S.N The genetic-selection improvement of approaches to the study of the fruit cultures adaptation to the stresses of the spring and summer period. В сборнике: BIO Web of Conferences. Federal State Budgetary Scientific Institution North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture. 2020. С. 02002. https://elibrary.ru/item.asp?id=44042694
Сведения об эффективности и конкурентоспособности технологии	Использование методики выделения засухоустойчивых форм подвоев и привойно-подвойных комбинаций плодовых культур в сравнении с классической схемой оценки засухоустойчивости обеспечивает: – повышение точности выполнения исследований по выделению засухоустойчивых форм на 30 %; – сокращение времени на проведение 1 анализа; – сокращение материальных и трудовых затрат в среднем на 10 %
Сведения о результатах интеллектуальной деятельности, в том числе селекционных достижениях, использованных в технологии	При разработке технологии были использованы полученные ранее результаты интеллектуальной деятельности - Подвой косточковых ПК СК 1 (Патент № 9860 от 17.10.2018. Заявка № 72527/8260951 от 23.08.2017. Патентообладатель: ФГБНУ СКФНЦСВВ) - Подвой косточковых культур ПК СК 2 (Патент № 10767 от 10 января 2020 г. Заявка №78014/8057034 от 10.01.2019 г. Патентообладатель: ФГБНУ СКФНЦСВВ)

Руководитель



Егоров Е.А.

Приложение 4
Паспорт разработанной технологии
Метод мультиплексной молекулярно-генетической идентификации генов
хозяйственно-ценных признаков
(Rvi6, Md-Exp7, Md-PG1) и паспортизации сортов яблони
(СТО 00668034-132-2021)

Показатель	Характеристика технологии
Назначение технологии	Метод предназначен для выполнения ДНК-маркерной идентификации генов хозяйственно ценных признаков яблони Rvi6, Md-Exp7 и Md-PG1 в сортах и селекционных образцах, а также для ДНК-паспортизации генотипов. Метод основан на использовании мультиплексной ПЦР и последующем фрагментном анализе на автоматических генетических анализаторах ABIprism 3130, Нанофор-05.
Описание технологии	Идентификация целевых генов сортов яблони включает 4 этапа: – экстракцию проб ДНК (проводится в соответствии с традиционным протоколом экстракции); – постановка ПЦР (проводится по разработанному протоколу, включающему описание оптимального компонентного состав реакционной смеси и параметры (технологические режимы проведения ПЦР); – подготовка продуктов ПЦР к фрагментному анализу (проводится по разработанному протоколу); – проведение фрагментного анализа и обработка данных (проводится по разработанному протоколу). I. ПРОТОКОЛ ПОСТАНОВКИ ПЦР: Компонентный состав реакционной смеси (в расчете на одну реакцию): – Буфер десятикратный для ПЦР (из набора для постановки ПЦР производства НПО «Сибэнзим», кат.№ K002): 2,5 мкл. – Дезоксинуклеотидтрифосфаты (смесь из набора для постановки ПЦР производства НПО «Сибэнзим», кат. № K002) в концентрации 0,5 мМ: 2 мкл. – Праймеры: по 2 мкл каждого праймера (прямого и обратного) из рабочего раствора с концентрацией 3,75 мМ для праймеров маркера Md-Exp7-SSR и по 4 мкл каждого праймера (прямого и обратного) для маркеров CH-VF1 и Md-PG1-SSR10kd. – Taq ДНК-полимераза: 1 единица активности. – ДНК – 1 мкл. – Вода Mq: до объема 25 мкл. Параметры (технологические режимы) ПЦР: – начальная денатурация – 1 мин. при 94°C; – проведение следующих 35 циклов при следующих режимах: - денатурация – 30 сек. при 95°C, - отжиг праймеров – 30 сек. при 58°C, - элонгация – 30 сек. при 72°C; – завершающий цикл синтеза – 5 мин. при 72°C II. ПРОТОКОЛ ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ К ПРОВЕДЕНИЮ ФРАГМЕНТНОГО АНАЛИЗА:

	Для подготовки образцов к фрагментному анализу по завершению ПЦР: – 1 мкл ПРЦ-продукта растворяют в 30 мкл деионизированной воды; – 1 мкл разбавленного ПРЦ-продукта переносят в приготовленный непосредственно перед использованием буфер нанесения следующего состава – 8,85 мкл Hi-Di™ Formamide или и 0,15 мкл размерного стандарта (S450, COrDIS, Syntol) и проводят денатурацию в течение 5 минут при 95°C; – после денатурации образцы охлаждают на льду и вносят в плашку генетического анализатора. III. ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕНИЯ ФРАГМЕНТНОГО АНАЛИЗА Фрагментный анализ можно проводить на генетическом анализаторе ABI prism3130 или Нанофор-05 На генетическом анализаторе ABI prism3130 фрагментный анализ проводят при следующих параметрах: – вольтаж при нанесении образцов – 1,2 кило Вольт. – время инъекции образцов – 16 секунд. – время задержки считывания результата – 240 секунд. – напряжение электрофореза – 15 кило Вольт. – длительность электрофореза – 1300 секунд. На генетическом анализаторе Нанофор-05 фрагментный анализ проводят при следующих параметрах: – вольтаж при нанесении образцов – 1,8 Кв – время инъекции образцов – 1,8 Кв, 5 сек. – напряжение электрофореза – 12,2 Кв (ступенчато возрастающее). – время электрофореза – 1400 сек. После проведения фрагментного анализа проводят обработку данных в программе GeneMapper 4.1 (ABI prism3130) или GeneMarker (Нанофор-05). Целевые пики на электрофореграмме идентифицируют по типу красителя и диапазону размера амплифицированных фрагментов. Используемый экспериментальный протокол обеспечивает достоверную идентификацию размеров идентифицированных аллелей. Обеспечивается максимальная амплификация целевых фрагментов при минимизации неспецифических ампликонов. Применение фрагментного анализа на автоматическом генетическом анализаторе имеет существенное конкурентное преимущество в сравнении с использованием денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием нитратом серебра, т.к. обеспечивает однозначную интерпретацию результатов и проводится полностью в автоматическом режиме, не требующем присутствия оператора до момента завершения электрофореза.
Основные показатели технологии	Технология характеризуется следующими основными показателями: – точность идентификации целевых фрагментов – до одной пары нуклеотидов; – возможность проведения части этапов в автоматическом режиме

	– возможность одновременной идентификации трех генов одновременно при постановке одной реакции. Наиболее важным конкурентным преимуществом является возможность одновременной идентификации трех генов при постановке одной реакции. Для этих целей SSR-маркеры искомым генов были объединены в мультиплексный набор. При этом каждый SSR-маркер в наборе имеет специфичную для него флуоресцентную метку, и специфичный диапазон размеров амплифицируемых фрагментов. Были оптимизированы концентрации компонентов реакционной смеси и условий реакции, что позволило получить достоверные, легко интерпретируемые результаты. Это обеспечивает достоверную идентификацию целевых продуктов амплификации при выполнении фрагментного анализа на автоматических генетических анализаторах ABIprism3130, Нанофор-05. Возможность детекции трех генов одновременно позволяет в три раза сократить затраты времени и реактивов на этап ПЦР и электрофореза, что повышает экономическую эффективность проведения анализа.
Сведения об использованных при разработке технологии научно-технических заделах (собственных разработках) Получателя	Основой для выполненных исследований послужили результаты многолетних работ по молекулярно-генетической идентификации генов хозяйственно-ценных признаков культурных растений и ДНК-маркерной паспортизации: – апробированы различные типы ДНК-маркеров для идентификации генов хозяйственно-ценных признаков и ДНК-паспортизации с использованием разных методов анализа получаемых продуктов амплификации: электрофорез в агарозном и полиакриламидном геле, фрагментный анализ на автоматических генетических анализаторах; – изучены закономерности влияния экспериментальных параметров на этапе ПЦР на протекание мультиплексной реакции, предполагающей одновременный анализ по двум и более маркерам в одной реакции и установлены наиболее эффективные способы оптимизации реакционных параметров; – установлены зависимости качества амплифицированных продуктов реакции по микросателлитным ДНК-маркерам от параметров реакции ПЦР (концентрации компонентов реакции, длительность циклов реакции), а также этапа фрагментного анализа на генетических анализаторах ABI prism3130 и Нанофор-05. Полученные ранее результаты опубликованы в следующих научных публикациях: 1. Супрун И.И., Токмаков С.В., Степанов И.В., Иванова А.М. Разработка мультиплексного набора для маркерной селекции яблони на устойчивость к парше // Научные труды Государственного научного учреждения Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского института садоводства и виноградарства Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2017. – Т. 12. – С. 26-30. 2. Suprun I.I., Tokmakov S.V., Lobodina E.V. Microsatellite DNA-markers in the study of the gene pool of fruit crops // В сборнике: BIO Web of Conferences. Federal State Budgetary

	Scientific Institution North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture. – 2020. – С. 03001. 3. Степанов И.В., Супрун И.И., Анатов Д.М., Лободина Е.В., Володина Е.А. Разработка мультиплексных наборов SSR-маркеров для генотипирования сортов абрикоса обыкновенного (<i>Prunus Armeniaca</i> L.) // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2018. – № 144. – С. 32-43. 4. Suprun I.I., Ushakova Ya.V., Tokmakov S.V., Durel Ch.E., Denans C., Ul'yanovskaya E.V. Genetic diversity study of modern Russian Apple (<i>Malus * Domestica</i> Borkh.) cultivars by the SSR loci analysis // Agricultural Biology. – 2015. – Т. 50. (1). – С. 37-45. 5. Супрун И.И., Ковалев В.С. Методическая схема мультиплексной ДНК-маркерной идентификации генов устойчивости риса к пирикулярриозу PI-40, PI-B и PI-TA // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2015. – № 3. – С. 16-18. 6. Степанов И.В., Супрун И.И. Использование SSR маркеров в генетических исследованиях рода <i>Prunus</i> // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2013. – № 90. – С. 191-204. Накопленный комплекс экспериментальных данных позволил эффективно осуществить разработку представленного метода.
Сведения об эффективности и конкурентоспособности технологии	Эффективность и конкурентность технологии подтверждается следующими параметрами: – возможность определения устойчивости к парше без выполнения фитопатологического тестирования исследуемых селекционных образцов яблони; – возможность отбора образцов, обладающих повышенными характеристиками качества плодов для сеянцев в возрасте одного года (в год получения сеянцев). Оценка же по фенотипу возможна в возрасте от 4-5 лет – после вступления в плодоношение; – возможность детекции одновременно трех генов при проведении одной реакции. Результаты исследования аллельных комбинаций генов Rvi6, Md-Exp7 и Md-PG1 с использованием разработанного метода (технологии) на основе мультиплексной ПЦР, выполненные в ходе проекта для ряда сортов яблони, продемонстрировали ее высокую эффективность.
Сведения о результатах интеллектуальной деятельности, в том числе селекционных достижениях, использованных в технологии	При разработке технологии были использованы полученные ранее результаты интеллектуальной деятельности: «Способ генетической идентификации подвоев яблони на основе анализа микросателлитных маркеров генома» (Патент № 2728588 от 30 июля 2020 г; заявка № 2019108350 от 20.07.2019 г.) Авторы Супрун И.И., Лободина А.В., Токмаков С.В., Степанов И.В. Патентообладатель: ФГБНУ СКФНЦСВВ).

Руководитель

