

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

УДК 631.52 630*165.3

Рег. № НИОКТР 121070200031-5

Рег. № ИКРБС

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ СКФНЦСВВ,
академик РАН

Е.А. Егоров

« 2 » 2023 г.

ОТЧЕТ

**О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
В РАМКАХ ВЫПОЛНЕНИЯ НИОКР, СООТВЕТСТВУЮЩЕЙ
ПРОГРАММЕ СОЗДАНИЯ И РАЗВИТИЯ СЕЛЕКЦИОННО-
ПИТОМНИКОВОДЧЕСКОГО ЦЕНТРА ФГБНУ СКФНЦСВВ
НА ЭТАПЕ 2 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
допсоглашение от 7.06.2022 г. № 075-15-2021-536/3
(внутренний номер № 09.ССЦ.21.0002)

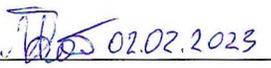
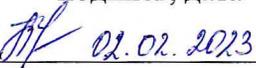
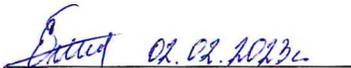
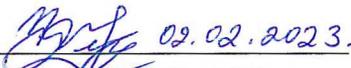
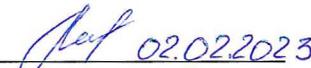
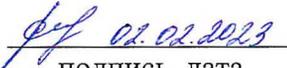
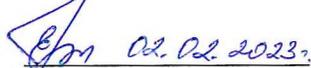
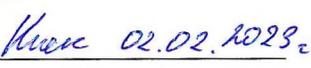
Федеральный проект «Развитие масштабных научных и научно-
технологических проектов по приоритетным исследовательским
направлениям» национального проекта «Наука и университеты»

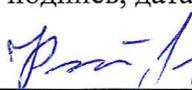
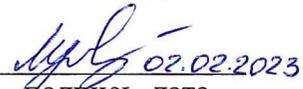
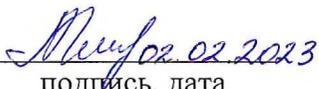
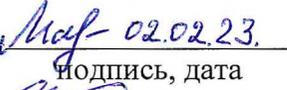
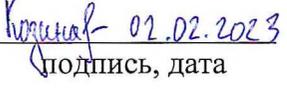
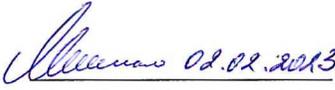
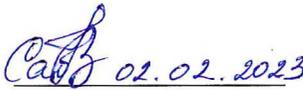
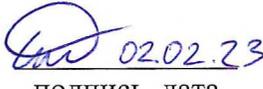
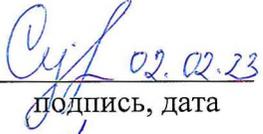
Научный руководитель,
заведующий ФНЦ
«Селекции и питомниководства»,
канд. биол. наук

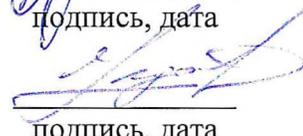
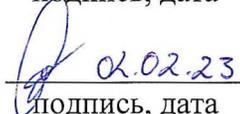
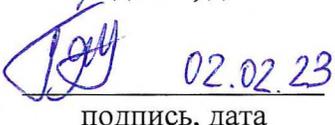
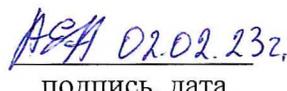
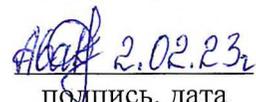
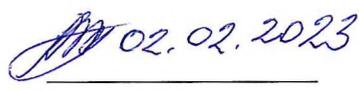
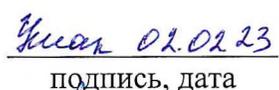
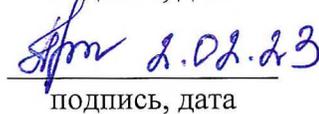
 02.02.2023 И.И. Супрун
подпись, дата

Краснодар 2023

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

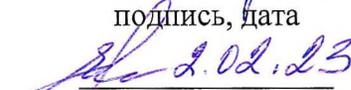
<p>Научный руководитель НИР, зав. ФНЦ «Селекции и питомниководства», канд. биол. наук Исполнители: Заместитель директора по науке, д-р техн. наук, проф.</p>	 <u>02.02.2023</u> подпись, дата	<p>И.И. Супрун (разделы 1, 2, 3)</p>
<p>Мл. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур</p>	 <u>02.02.2023</u> подпись, дата	<p>И.А. Ильина (разделы 1, 3, заклучение)</p>
<p>Науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур, канд. с.-х. наук</p>	 <u>02.02.2023</u> подпись, дата	<p>И.М. Балапанов (раздел 1)</p>
<p>Мл. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур, аспирант</p>	 <u>02.02.2023</u> подпись, дата	<p>Т. В. Богданович (раздел 1)</p>
<p>Зав.сектором бактериологии и вирусологии НЦ «Защиты и биотехнологии растений», канд. с.-х. наук</p>	 <u>02.02.2023</u> подпись, дата	<p>Е.А. Беленко (раздел 1)</p>
<p>Зав. лаб. вирусологии, канд. с.-х. наук</p>	 <u>02.02.2023</u> подпись, дата	<p>С.В. Виноградова (раздел 3)</p>
<p>Науч. сотр. лаб. виноградарства и виноделия АЗОСВиВ – филиала ФГБНУ СКФНЦСВВ, канд. биол. наук</p>	 <u>02.02.2023</u> подпись, дата	<p>М.А. Амосова (раздел 3)</p>
<p>Ст. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции косточковых культур, канд. с.-х. наук</p>	 <u>02.02.2023</u> подпись, дата	<p>И.В. Горбунов (разделы 1, 3)</p>
<p>Мл. науч. сотр. лаб. питомниководства, аспирант</p>	 <u>02.02.2023</u> подпись, дата	<p>Ю.А. Доля (раздел 1)</p>
<p>Зав. лаб. сортоизучения и селекции косточковых культур, д-р с.-х. наук, проф.</p>	 <u>02.02.2023</u> подпись, дата	<p>А.И. Дрыгина (разделы 1, 3)</p>
<p>Зав. лаб. сортоизучения и селекции винограда, канд. биол. наук</p>	 <u>02.02.23</u> подпись, дата	<p>Р.Ш. Заремук (разделы 1, 2)</p>
<p>Ст. науч. сотр. лаборатории питомниководства, канд. с.-х. наук</p>	 <u>02.02.2023</u> подпись, дата	<p>Е.Т. Ильницкая (разделы 1, 2)</p>
<p>Мл. науч. сотр. лаб. защиты и токсикологического мониторинга многолетних агроценозов</p>	 <u>02.02.23</u> подпись, дата	<p>М.В. Карпушина (раздел 3)</p>
<p>Науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции косточковых культур, канд. с.-х. наук</p>	 <u>02.02.2023</u> подпись, дата	<p>Д. А. Киек (раздел 3)</p>
<p>Науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции косточковых культур, канд. с.-х. наук</p>	 <u>02.02.23</u> подпись, дата	<p>Т.А. Копнина (раздел 1)</p>

Мл. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции винограда	 02.02.2023 подпись, дата	В.К. Котляр (разделы 2, 3)
Мл. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции косточковых культур, аспирант	 02.02.2023 подпись, дата	А.А. Кочубей (раздел 1)
Зав. лаб. питомниководства, канд. биол. наук	 02.02.2023 подпись, дата	А.П. Кузнецова (разделы 1, 3)
Мл. науч. сотр. селекционно-биотехнологической лаборатории, аспирант Директор АЗОСВиВ – филиала ФГБНУ СКФНЦСВВ, канд. с.-х. наук	 02.02.23 подпись, дата	Е.В. Лободина (разделы 2, 3)
Науч. сотр. лаб. виноградарства и виноделия АЗОСВиВ – филиала ФГБНУ СКФНЦСВВ, канд. биол. наук	 02.02.2023 подпись, дата	А.А. Лукьянов (разделы 1, 3)
Мл. науч. сотр. лаборатории сортоизучения и селекции винограда	 02.02.2023 подпись, дата	А.А. Лукьянова (разделы 1, 3)
Мл. науч. сотр. селекционно-биотехнологической лаборатории	 02.02.23 подпись, дата	М.В. Макаркина (разделы 1, 2)
Мл. науч. сотр. селекционно-биотехнологической лаборатории	 02.02.23 подпись, дата	Е.А. Кожевников (раздел 2)
Мл. науч. сотр. лаборатории сортоизучения и селекции винограда	 02.02.2023 подпись, дата	Т.А. Козина (раздел 2)
Мл. науч. сотр. лаборатории физиологии и биохимии растений	 02.02.2023 подпись, дата	А.Е. Мишко (раздел 3)
Зав. лаб. биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов, канд. биол. наук	 02.02.2023 подпись, дата	А.И. Насонов (раздел 1)
Зав. лаб. переработки и хранения плодов, д-р с.-х. наук, проф.	<hr/> подпись, дата	Т.Г. Причко (раздел 1)
Мл. науч. сотр. лаб. биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов	 02.02.2023 подпись, дата	Н.В. Савчук (раздел 1)
Мл. науч. сотр. селекционно-биотехнологической лаборатории	 02.02.23 подпись, дата	И.В. Степанов (разделы 2, 3)
Зав. лаб. физиологии и биохимии растений, канд. с.-х. наук	 02.02.23 подпись, дата	М.А. Сундырева (раздел 3)
Зав. лаб. селекционно-биотехнологической, канд. биол. наук	 02.02.23 подпись, дата	С.В. Токмаков (разделы 2, 3)

Ст. науч. сотр. НИЦ «Виноделие», канд. техн. наук	 02.02.23 подпись, дата	А.В. Прах (раздел 1)
Зам. директора по общим вопросам, канд. с.-х. наук	 подпись, дата	Д.Э. Руссо (разделы 1, 3)
Зав. лабораторией сортоизучения и селекции садовых культур, д-р с.-х. наук	 2.02.23 подпись, дата	Е.В. Ульяновская (разделы 1, 2)
Мл. науч. сотр. лаборатории вирусологии, аспирант	 02.02.23 подпись, дата	С.В. Федорович (разделы 2, 3)
Зав. научным центром «Защиты и биотехнологии растений», канд. с.-х. наук	 02.02.23 подпись, дата	Е.Г. Юрченко (раздел 1)
Ст. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур, канд. с.-х. наук	 02.02.23 подпись, дата	В.В. Яковенко (раздел 3)
Ст. науч. сотр. лаб. биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов, канд. биол. наук	 02.02.23 подпись, дата	Г.В. Якуба (раздел 1)
Мл. науч. сотр. селекционно-биотехнологической лаборатории	 02.02.23 подпись, дата	Е.А. Аль-Накиб (разделы 2, 3)
Мл. науч. сотр. селекционно-биотехнологической лаборатории	 2.02.23 подпись, дата	А.О. Авакимян (раздел 3)
Ст. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур, канд. с.-х. наук	 2.02.23 подпись, дата	Н.В. Можар (раздел 1)
Ст. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур, канд. биол. наук	 02.02.2023 подпись, дата	В.И. Лапшин (раздел 1)
Мл. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур	 02.02.23 подпись, дата	Л.С. Ушак (раздел 1)
Мл. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур	 2.02.23 подпись, дата	Л.В. Артюхова (раздел 1)
Мл. науч. сотр. лаб. селекции и сортоизучения винограда	 2.02.23 подпись, дата	Е.Г. Пята (раздел 1)
Науч. сотр. лаб. питомниководства	 2.02.23 подпись, дата	И.Л. Ефимова (разделы 1, 3)
Науч. сотр. лаборатории управления воспроизводством в ампелоценозах и экосистемах, канд. с.-х. наук	 2.02.23 подпись, дата	О.Л. Сегет (раздел 3)

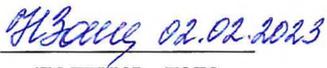
Зав. лаб. защиты и токсикологического мониторинга многолетних агроценозов, канд. биол. наук
Ст. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур, канд. с.-х. наук
Зав. ФНЦ «Садоводство», канд. с.-х. наук
Зав. НЦ «Виноделие», вед. науч. сотр, д-р техн. наук, доц.
Нормоконтроль


подпись, дата 02.02.2023 М.Е. Подгорная (раздел 1)


подпись, дата 02.02.23 Е.Л. Тыщенко (раздел 1)


подпись, дата 02.02.2023 Т.Г. Фоменко (разделы 1, 3)


подпись, дата 02.02.23 О.Н. Шелудько (раздел 1)


подпись, дата 02.02.2023 Н.М. Запорожец

РЕФЕРАТ

Отчет 261 с., 70 рис., 38 табл., 101 источн., 7 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, кроме этого научных данных о генетических взаимосвязях генофонда и наличии селекционно-ценных генов у образцов плодовых культур.

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, и исследования по разработке и усовершенствованию молекулярно-генетических методов для решения задач по селекции, изучению генофонда и получению оздоровленных растений, включая методы идентификации вирусных фитопатогенов;

- 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 3 донора, 8 источников хозяйственно ценных признаков, 6 элитных форм плодовых культур и винограда; создано и передано в государственное сортоиспытание 2 новых сорта.

Разработаны и усовершенствованы современные методы молекулярно-генетической идентификации генов хозяйственно-ценных признаков и паспортизации с использованием различных типов ДНК-маркерных систем, а также методы идентификации вирусных фитопатогенов (раздел 2). Разработан метод мультиплексной ДНК-паспортизации сортов черешни, а также метод

идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 (Grapevine leafroll-associated virus 1) и вируса бороздчатости древесины винограда (Grapevine rupestris stem pitting-associated virus) на основе использования метода ПЦР в реальном времени. Выполнена экспериментальная апробация и оценка полиморфизма локуспецифичных (8 SSR-маркеров) и мультилокусных (20 ISSR ДНК-маркеров) ДНК-маркеров применительно к семечковой культуре – груша, а также 14 SCoT ДНК-маркеров применительно к яблоне и 10 ISSR ДНК-маркеров применительно к землянике. Отобраны наиболее перспективные для генотипирования целевых культур ДНК-маркеры и получены ДНК-профили изучаемых генотипов. С использованием девяти микросателлитных ДНК-маркеров выполнено генотипирование 31 формы абрикоса из природных популяций, отобранных на территории Дагестана, а также культурных сортов из различных экологи-географических групп и установлена уникальность дагестанского автохтонного генофонда абрикоса, сформированного в условиях частичной изоляции горной местности. Выполнена молекулярно-генетическая паспортизация 32 ценных селекционных форм яблони, являющихся комплексными донорами, по трем аллелям локуса самонесовместимости (S3, S5 и S10), а также восьми микросателлитным ДНК-маркерам и получены генотипспецифичные ДНК-паспорта.

Установлены оптимальные экспериментальные параметры микроклонального размножения садовых культур и винограда по этапам от введения в культуру *in vitro* до адаптации *ex vitro* полученных микрорастений. Определены оптимальные условия стерилизации эксплантов, установлены оптимальные сроки отбора эксплантов для введения в культуру *in vitro* подвоев косточковых культур, а также установлено положительное влияние хелатной формы железа Fe-EDDHA и биопрепарата ФитАктив Экстра Плюс на укоренение подвоя косточковых АИ 11 в условиях *in vitro* и *ex vitro*. На основе полученного комплекса данных разработана модифицированная технология размножения растений косточковых культур *in vitro* (на примере

подвоя ПК СК 1), при которой можно получить из одного экспланта за 10 пассажей до 1 млн. адаптированных растений (при промышленном тиражировании) Определены сортоспецифические параметры по концентрациям фитогормонов для оптимизации регенерационных процессов при микроклонировании ряда сортов винограда отечественной селекции. Установлены оптимальные сроки введения эксплантов в культуру *in vitro* для различных сортов земляники. Определены оптимальные экспериментальные параметры, включая компонентный состав питательных сред для микроклонального размножения ежевики и установлено положительное влияние препарата Рибав Экстра при адаптации микроклонально размноженных растений и их росте в условиях *in vivo*. Разработана технология производства высококачественного посадочного материала яблони с использованием механизмов симбиотического взаимодействия грибов арбускулярной микоризы и корневой системы растений. Оптимизированы режимы минерального питания тиражированных маточных растений в ампелоценозе маточника. Разработана технология создания базисных маточников из оздоровленного *in vitro* посадочного материала винограда. (раздел 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

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА О НИР	16
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.....	16
1.1 Обоснование необходимости проведения НИР.....	16
1.2 Объекты, методы, методики и условия проведения исследований....	23
1.3 Результаты исследований.....	27
1.3.1 Селекция и сортоизучение семечковых культур.....	27
1.3.2 Селекция и сортоизучение косточковых культур.....	42
1.3.3 Селекция и сортоизучение винограда.....	64
1.3.4 Формирование базы данных фенотипических характеристик сортоформ и гибридов яблони, позволяющей оптимизировать алгоритм отбора форм, наиболее ценных для селекции.....	71
1.3.5 Разработка метода выделения генотипов рода <i>Prunus</i> L. с полигенным типом устойчивости к коккомикозу.....	77
1.4 Выводы.....	82
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.....	84
2.1 Обоснование необходимости проведения НИР.....	84
2.2 Объекты, методы, методики и условия проведения исследований....	87
2.3 Результаты исследований.....	91
2.3.1 Разработка метода мультиплексной молекулярно-генетической паспортизации сортов черешни на основе использования микросателлитных ДНК-маркеров.....	91
2.3.2 Апробация локуспецифичных (SSR) и мультилокусных ДНК-маркеров для генотипирования груши.....	95
2.3.3 Поиск информативных SCoT ДНК-маркеров для генотипирования яблони домашней и выполнение ДНК-паспортизации сортов на основе их использования.....	102

2.3.4 Генотипирование сортов и форм абрикоса из разных эколого-географических групп и природных популяций Дагестана и анализ их генетических взаимосвязей.....	107
2.3.5 Апробация и поиск информативных ISSR ДНК-маркеров для генотипирования и анализа генетической стабильности растений земляники садовой, получаемых при микроклональном размножении.....	113
2.3.6 Разработка методик идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 (Grapevine leafroll-associated virus 1) и вируса борозчатости древесины винограда (Grapevine rupestris stem pitting-associated virus) с помощью ПЦР в реальном времени.....	117
2.3.7 Разработка молекулярно-генетических паспортов генотипов рода <i>Malus</i> по аллелям локуса самонесовместимости и микросателлитным ДНК-маркерам.....	120
2.4 Выводы.....	127
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>	129
3.1 Обоснование необходимости проведения НИР.....	129
3.2 Объекты, методы, методики и условия проведения исследований....	133
3.3 Результаты исследований.....	136
3.3.1 Совершенствование протоколов введения в культуру <i>in vitro</i> , подвоев косточковых, ягодных культур и сортов винограда.....	136
3.3.2 Оптимизация этапов мультипликации, укоренения плодовых и ягодных культур, адаптации <i>ex vitro</i>	144
3.3.3 Модификация технологии размножения растений косточковых культур <i>in vitro</i> (на примере подвоя ПК СК 1).....	152
3.3.4 Оптимизация минерального питания тиражированных маточных растений в ампелоценозе маточника.....	155
3.3.5 Исследования по разработке технологии создания базисных маточников на основе применения оздоровленного <i>in vitro</i> посадочного материала винограда.....	160
3.3.6 Разработка технологии производства высококачественного посадочного материала с использованием механизма симбиоза растений и микроорганизмов.....	163
3.3.7 Разработка биотехнологического способа повышения устойчивости привитых саженцев винограда к биотическим стрессам	171

3.4 Выводы.....	174
Заключение.....	177
Список использованных источников.....	181
Приложение А – Оценка отличимости, однородности и стабильности при передаче в Государственное сортоиспытание сорта яблони Гайто Газданов и сортавишни Южанка, переданных в ГСИ в 2022 году.....	193
Приложение Б – Метод выделения образцов мелкоплодных косточковых культур с полигенным типом устойчивости к коккомикозу» (СТО 00668034-141-2022).....	202
Приложение В – Методика идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 (Grapevine leafroll-associated virus 1) с помощью ПЦР в реальном времени (СТО 00668034-142-2022).....	216
Приложение Г – Технологическая инструкция «Способ укоренения микрорастений подвоя сливы домашней» (ТИ 01.30.10.132 – 176 – 00668034-2022).....	229
Приложение Д – Технологическая инструкция «Технология оптимизации минерального питания тиражированных маточных растений в ампелоценозе маточника» (ТИ 01.60.10.290-181-00668034-2022).....	234
Приложение Е – Технологическая инструкция «Технология создания базисных маточников из оздоровленного in vitro посадочного материала винограда» (ТИ 01.61.10.290-179-00668034-2022).....	248
Приложение Ж – Технологическая инструкция «Технология производства высококачественного посадочного материала с использованием механизма симбиоза растений и микроорганизмов» (ТИ 01.30.10.131–180–00668034-2022).....	252
Приложение З – Паспорт технологии «Биотехнологический способ повышения устойчивости привитых саженцев винограда к биотическим стрессам».....	258

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие термины с соответствующими определениями:

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.ССЦ.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;

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);

Маркерная селекция - селекция, выполняемая с использованием ДНК-маркеров для идентификации генов целевых признаков.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция; позволяет проводить синтез целевых участков генома <i>in vitro</i> ;
SSR	(simple sequence repeats) микросателлитные последовательности генома;
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
В1	тиамин
В6	пиридоксин
РР	никотиновая кислота
мг/л	миллиграмм/литр

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА О НИР

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 аббиострессорам, соответствующих интенсивным ресурсосберегающим технологиям

1.1 Обоснование необходимости проведения НИР

Совершенствование 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. Немаловажным на этом этапе является использование комплекса методов, позволяющих эффективно характеризовать генетические ресурсы и селекционный материал и отбирать наиболее ценные генотипы.

Очевидно, что решение основных направлений и приоритетных задач отечественной и зарубежной селекции плодовых растений базируется на значительном биологическом разнообразии исходного материала, наличие которого необходимо для достижения селекционных целей [1, 2, 3].

Семечковые культуры. Яблоня – основная плодовая культура в мире и в России. Широкое распространение данной плодовой культуры стало возможно благодаря широкому потенциалу адаптивности в разных эколого-географических зонах, возможность применения разных типов технологий – как экстенсивные так интенсивные и суперинтенсивные, отличающиеся плотными схемами посадки, специфическими типами формирования кроны и др. Немаловажен факт высокого уровня транспортабельности плодов и

длительного периода их хранения, многообразием данной культуры по форме, размеру, окраске, вкусовым характеристика плодов, круглогодичным использованием и традиционной популярностью плодов у населения.

Мобилизация растительных ресурсов и активное вовлечение в селекцию наиболее ценных доноров и источников основных плодовых культур, в том числе яблони, необходимо для создания современных сортов с комплексом целевых признаков: скороплодность, продуктивность, устойчивость к абиотическим стрессорам региона и грибным патогенам, высокие качественные характеристики и ценный биохимический состав плодов [4-8].

Основные тренды в отрасли садоводства, направленные на экологизацию, биологизацию и ресурсосбережение выделяют одно из приоритетных селекционных направлений – создание и выделение иммунных и высокоустойчивых к парше сортов яблони. Одно из наиболее вредоносных заболеваний яблони на всей территории возделывания, в том числе и на юге России — парша; возбудитель которого гриб *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter). Бесконтрольное и усилившееся в последние годы применение средств химзащиты в садах против парши ведет к загрязнению окружающей среды, уничтожению полезной энтомофауны, нередко к ослаблению защитных свойств самого растения, 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*, который в настоящее время является одним из основных генов, определяющих устойчивость к парше у промышленно-возделываемых сортов во многих регионах садоводства [14-22]. В России селекционную работу по этому направлению ведут: ВНИИСПК, СКФНЦСВВ, ФНЦ им. И.В. Мичурина, СКНИИГиПГС, ФИЦ СЦ 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 усовершенствованного метода полиплоидии – одно из перспективных направлений в настоящее время. Для ускорения и оптимизации селекционного процесса в работе используются доноры, комплексных доноры и источники значимых признаков яблони, включающих сорта и формы разной ploidy, 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. Несмотря на значительные успехи в обновлении сортимента груши и айвы отмечается недостаток сортов, в генотипе которых бы сочетались зимостойкость и урожайность, устойчивость к болезням и высокое качество плодов. Спрос на грушу велик со стороны населения, курортов и перерабатывающей промышленности. Поэтому остаются актуальными вопросы поиска, изучения и отбора сортов груши с заданными качествами.

В связи с этим особую роль приобретает получение селекционным путем и выявление из имеющего генетического разнообразия культуры груши сортов, устойчивых к комплексу неблагоприятных факторов среды с повышенной зимо- и засухоустойчивостью, скороплодных, высокоурожайных и устойчивых к основным грибным заболеваниям, со сдержанным ростом дерева и высоким качеством плодов.

Айва — это одна из самых скороплодных, ежегодно и обильно плодоносящих культур. Деревья айвы начинают плодоносить со второго-третьего года после посадки в сад, полное плодоношение наступает через 10-12 лет.

Рост и плодоношение айвы в решающей степени определяются не только тепловым и водным режимом, но и ее способностью переносить низкие температуры зимой. Наибольшая опасность подстерегает айву в ювенильный период (период от посадки до плодоношения). В питомнике саженцы растут быстро, однолетки достигают 80180 сантиметров. У молодых деревьев однолетние побеги значительно отрастают до заморозков, в зиму уходят не одревесневшими и в результате подмерзают.

Основной целью селекционных исследований по айве является изучение по основным биологическим и хозяйственным признакам коллекционного и гибридного фонда айвы и получение на их основе новых высокоурожайных, зимостойких сортов айвы с плодами крупных размеров (300 г), консервного назначения, обладающих экологической пластичностью, устойчивостью к болезням и вредителям и другими потребительскими качествами для пополнения районированного сортимента края. Плоды айвы своеобразны и значительно отличаются от плодов других семечковых культур по химическому составу, вкусовым качествам, сильному очень приятному аромату и характеризуются своей ценностью для приготовления высококачественных разнообразных продуктов переработки.

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.

Косточковым культурам отводится особое место среди плодовых культур, поскольку благодаря им открывается сезон потребления плодовой продукции, наряду с ягодными.

Косточковые культуры (черешня, вишня, персик, нектарины, абрикос, слива домашняя, слива русская) являются более требовательными к условиям

произрастания и возделывания, ареал их распространения более узкий, в сравнении с яблоней. Они отличаются меньшей адаптивностью к абиотическим и биотическим стрессорам и чаще подвергаются их воздействию, более требовательны к почвенно-климатическим условиям.

Большинство косточковых – абрикос, персик, черешня в силу своих биологических особенностей могут в полном объеме реализовать свой потенциал в условиях только южного климата, что определяет необходимость постоянного совершенствования сортимента этих ценных южных плодовых культур.

Анализ структуры площадей, занятых плодовыми, показывает, что на сегодня косточковыми культурами на юге страны занято около 14,3 тыс/га или 18,7 %. При этом, для удовлетворения потребностей рынка в ценных плодах необходимо довести площадь садов до 25-30 %.

Основными возделываемыми косточковыми культурами являются слива домашняя (35%), черешня (30%). За последние 5 лет увеличились площади, занятые персиком и нектарином (15 %). Сокращаются площади занятые сливой русской и вишней. Абрикос на промышленной основе возделывается в Северо-Кавказских республиках – Дагестане, Кабардино-Балкарии, Чеченской республике и в Ставропольском крае. При высокой потенциальной продуктивности 15-20 т/га мелкокосточковых и 25-35 т/га – крупнокосточковых культур, статистическая урожайность в регионе не превышает 5,2 т/га, а в Краснодарском крае – 5,8 т/га. Основными причинами диспропорции площадей и низкой продуктивности насаждений ряда косточковых культур являются прежде всего, ежегодное воздействие абиотических и биотических стрессовых факторов в период дифференциации плодовых почек летом и весной во время цветения и формирования урожая; отсутствие в сортименте иммунных и высокоустойчивых сортов косточковых культур. Анализ экстремальных погодных факторов, имевших место за последние 20-30 лет показал, что в условиях Краснодарского края

косточковые культуры повреждались различными стрессами более 15 раз, то есть почти каждые 2 года.

В связи с вышеизложенным ключевым аспектом обеспечения промышленного производства плодов ценных косточковых культур является создание и внедрение новых более адаптивных и продуктивных сортов, позволяющих в целом повысить устойчивость и продуктивность насаждений.

На фоне участвовавших стрессов еще больше возрастает роль зональных адаптивных сортиментов включающих, в первую очередь, сорта, прошедшие государственное сортоиспытание в зонах предполагаемого возделывания.

Создание сортов косточковых культур нового поколения в СКФНЦСВВ осуществляется в соответствии с селекционными программами, направленными на совмещение комплекса ценных признаков в одном генотипе, что возможно при использовании современных методов селекции, генетики и ДНК – технологий, физиологии, биохимии, биотехнологии и др., реализация которых позволит получить новые сорта и клоновые подвои отечественной (местной) селекции, позволяющие в определенной степени снизить зависимость формирования урожая от абиотических и биотических стрессов и стабилизировать производство плодов косточковых культур.

Использование в селекции новых методических подходов, методов, методик и селекционных программ, позволили получить сорта и клоновые подвои отечественной (местной) селекции, биологические особенности которых наиболее полно соответствуют нестабильным погодноклиматическим условиям южного региона, использование которых в интенсивных технологиях значительно повышает урожайность садовых культур в Краснодарском крае.

Ссортимент большинства косточковых культур благодаря селекционной работе обновляется с учетом того, что они должны отвечать требованиям, интенсивных технологий. Это в первую, определяет основные направления в селекции косточковых культур:

– селекция на устойчивость к коккомикозу, кластероспориозу, монилиозу;

- селекция на зимостойкость и засухоустойчивость,
- селекция на крупноплодность,
- селекция на скороплодность,
- селекция на высокое качество плодов,
- селекция на технологичность,
- селекция на высокую урожайность (продуктивность).

Сортимент винограда Краснодарского края в настоящее время представлен техническими и столовыми сортами, которые, к сожалению, недостаточно соответствуют актуальным требованиям предъявляемых производством, а именно: стабильно высокое качество виноматериалов, устойчивость к стресс-факторам окружающей среды, крупноплодность и бессемянность у столовых сортов. Традиционно возделывают сорта и клоны европейских сортов винограда (Каберне Совиньон, Пино нуар, Шардоне, Рислинг и др.) для высококачественного виноделия, которые недостаточно адаптированы к местным условиям выращивания, в следствие чего зачастую проявляют себя малопродуктивно. Из всего вышеизложенного вытекает актуализация селекции технических и столовых сортов винограда, направленной на выведение сортов, обладающих высокой экологической пластичностью к местности возделывания – устойчивых к абиотическим и биотическим факторам, высококачественных, урожайных.

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 улучшенные потребительские характеристики плодов и получаемой из них продукции. Все это обуславливает актуальность поставленных задач:

- сохранить генофонд плодовых культур и винограда;
- 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 формы плодовых культур, винограда, совмещающие комплекс хозяйственно-ценных признаков, на основе применения методов фенотипической и генотипической оценки гибридного материала;
- создать сорта плодовых культур и винограда, сочетающих высокую потенциальную адаптивность, продуктивность и качество плодов, 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 – 7×4 м, 7×5 м, 6×4 м, 6×5 м.

Сад сортоизучения черешни и вишни – кв. 12; схемы посадки – 8×6 м, 8×5 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 3×1 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 — 2×1 м, отборных форм — 2×0,5 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 слабывщелоченные 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 семян 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 [23];

- Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве [24];

- Методическое и аналитическое обеспечение исследований по садоводству [25];

- «Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур» [26];

- «Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур» [27];

- Методика опытного дела и методические рекомендации Северо-Кавказского зонального НИИ садоводства и виноградарства [28];

- Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Яблоня. RTG/0014/2 [29];

- Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Айва. RTG/0100/2 [30];

- Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Груша. RTG/0015/2 [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

Возможности ускорения и увеличения эффективности длительной селекционной работы по плодовым культурам, в том числе и яблони, основаны на мобилизации, сборе, сохранении и изучении генетической коллекции, выделении доноров и источников ценных признаков и активном использовании их в дальнейших селекционных исследованиях. Вовлечение в селекционный процесс сортового и видового разнообразия, новых генетических источников биологически и хозяйственно значимых признаков позволяет значительно ускорить селекцию яблони. При подборе исходных форм для дальнейшей гибридизации большое значение имеет выбор генотипов, не только имеющих высокий уровень ценных признаков, но и успешно передающих значимые признаки большей части гибридного потомства.

По данным многолетних исследований выделен 1 источник ценных хозяйственных признаков яблони – элитная форма 12/3-21-28 (рис. 1).

Элитная форма 12/3-21-28 (из семьи Айдаред x Балсгард 0247E) выделена как источник ярко-красной окраски и крупноплодности плодов. Получена в СКФНЦСВВ совместно с ВНИИСПК на основе усовершенствованного метода полиплоидии.

Дерево среднерослое, крона округлая, густо облиственная. Тип плодоношения смешанный. Элитная форма имеет высокую полевую устойчивость к мучнистой росе, устойчивость к засухе, скороплодна (вступает в плодоношение на 2–3-й год после посадки), достаточно быстро наращивает урожайность в молодом возрасте, обладает высокой и

стабильной продуктивностью (30,8–41,5 т/га на подвое М9 при схеме 5×1,5).
Срок созревания позднеосенний.



Рисунок 1 – Источник ярко-красной окраски и крупноплодности плодов – элитная форма 12/3-21-28

Плоды крупные (средняя масса 210,4 г, диаметр плода 77,25 мм) (рис. 2), одномерные, округлые, эффектные, с темно-бордовой интенсивной, равномерной покровной окраской по всему или по большей части плода. Мякоть плода кремоватой окраски, сочная, кисло-сладкого гармоничного вкуса (4,5–4,6 балла), с нежным ароматом. Съемная зрелость плодов наступает в начале сентября. В холодильнике плоды сохраняются в течении 2–3 месяцев. Транспортабельность плодов хорошая.



Рисунок 2 – Средняя масса и диаметр плода элитных форм яблони селекции СКФНЦСВВ совместно с ВНИИСПК, среднее за 2020-2022 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, интенсивная темно-бордовая окраска и хорошие вкусовые качества плодов. Недостатки сорта: срок хранения свежих плодов до 2–3-х месяцев.

Значительное усиление в последнее время частоты и силы негативного воздействия на плодородное 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.

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: 12/3-21-23, полученная усовершенствованным методом полиплоидии (рис. 3).

Элитная форма 12/3-21-23 (Голден Делишес тетр. × 2034) зимнего срока созревания. Дерево сдержанного роста, крона округлая. Тип плодоношения смешанный.



Рисунок 3 – Элитная форма яблони 12/3-21-23 (Айдаред × Балсгард 0247Е)

Вступает в плодоношение на 2–3-й год после посадки (на М9), быстро наращивает урожайность в молодом возрасте. Цветение в среднепоздние сроки, обильное. Средняя урожайность 29,32 т/га, максимальная до 52,65 т/га (на подвое М9 при схеме посадки 5×1,5). Диплоид ($2n=2x$).

Плоды среднего и выше среднего размера (массой 150,4–197,5 г), округлой формы, с ярким розовым румянцем средней интенсивности по большей части плода, сочные, очень хорошего десертного вкуса (4,5–4,7 балла), с гармоничным сочетанием сахара и кислоты, с нежным ароматом. Съемная зрелость плодов наступает в начале сентября. В холодильнике плоды сохраняются до февраля месяца. Транспортабельность плодов хорошая.

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

Основные достоинства: иммунитет к парше, морозо- и засухоустойчивость, скороплодность, урожайность, десертный вкус плодов. Недостатки сорта: плоды при перегрузке мельчают.

В отчетном году подготовлены и переданы в ГСИ материалы на зимний иммунный к парше сорт яблони Гайто Газданов совместной селекции СКФНЦСВВ, Ставропольской ОСС и СПК «Де-Густо».

Сорт яблони Гайто Газданов зимнего срока созревания (рис. 4, 5, приложение А). Сорт получен методом направленной гибридизации сортов Голден Делишес × Либерти. Диплоид ($2n=2x=34$). Авторы сорта: Ермоленко В.Г., Ульяновская Е.В., Причко Т.Г., Заерко Т.А., Дзицоева Р.М.



Рисунок 4 – Новый зимний сорт яблони Гайто Газданов

Дерево слаборослое, крона вертикальная, удобная для уборки, средней густоты. Тип плодовых образований – простые и сложные кольчатки. Цветение обильное, в средние сроки.

Сорт Гайто Газданов 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 в условиях Ставропольского и Краснодарского края.



Рисунок 5 – Морфологические особенности сорта яблони Гайто Газданов (органы плодоношения, лист)

Сорт интенсивного типа, скороплоден, на подвое СК2 вступает в плодоношение на 3-й год после посадки, быстро наращивает урожайность в молодом возрасте. Средняя урожайность нового сорта на подвое СК2 при схеме 5x2 составляет – 27,6 т/га; максимальная – 66,1 т/га (что на 22,12 % выше в сравнении с контролем – высокоурожайным сортом Либерти) (табл. 1).

Таблица 1 – Средняя и суммарная урожайность иммунных к парше сортов яблони, т/га (подвой СК2, схема посадки 5×2 м; год посадки 2012)

Сорт	Урожайность, т/га									средня я
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	суммарна я	
Гайто Газданов	11,9	12,0	17,9	30,9	29,2	22,3	66,1	30,1	220,4	27,6
Георгия	4,8	13,6	19,5	27,8	44,7	15,2	55,2	36,5	217,3	27,2
Заря Ставрополья	9,1	18,0	24,5	18,3	30,9	22,2	56,7	27,0	206,7	25,8
Либерти (к)	8,0	18,0	15,0	25,0	25,0	15,0	36,4	38,4	180,8	22,6
НСР ₀₅	0,99	1,06	1,22	1,41	1,67	1,22	2,16	1,40	2,57	0,91

Плоды крупные (средняя масса плода 235 г, максимальная – 273 г (табл. 2, 3), округлой формы, одномерные, с малиновым румянцем по всему или по большей части плода (оценка внешнего вида плодов 4,7–4,8 балла), гармоничного кисло-сладкого вкуса (дегустационная оценка вкуса 4,7 балла).

Таблица 2 – Группировка сортов и элитных форм яблони по средней массе плода, среднее за 2020–2022 гг.

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

Таблица 3 – Характеристика основных показателей плодов нового сорта яблони Гайто Газданов, среднее за 2020–2022 гг.

Показатель	Единица измерения	Рекомендуемый сорт	Стандартный сорт
		Гайто Газданов	Либерти
Масса плода:	г	235	165
- средняя			
- максимальная	г	273	240
Привлекательность внешнего вида	балл	4,7-4,8	4,7-4,8
Сочность и консистенция мякоти плода	-	сочная, мелкозернистая	сочная, мелкозернистая
Содержание в плодах:	%	15,4	12,6
- сухого вещества			
- сахара	%	10,8	9,0
- кислоты	%	0,70	0,84
- витамина Р	мг/100 г	72,8	79,0
- витамина С	мг/100 г	10,6	4,9
Дегустационная оценка свежих плодов	балл	4,7	4,7
Назначение сорта	-	универсальный	универсальный
Для каких видов переработки пригоден сорт	-	пюре, цукаты	пюре, цукаты
Транспортабельность плодов	-	хорошая	хорошая

Календарные сроки съема плодов: 3-я декада сентября. Календарные сроки потребления плодов (от даты наступления потребительской зрелости до конца лежкости): 1-я декада октября – 3-я декада февраля. Транспортабельность плодов высокая.

Химический состав плодов: сухих веществ – 15,4 %, сахаров – 10,8 %, тирюемых кислот – 0,70 %, сахаро-кислотный индекс – 15,43, витамина С – 10,6 мг/100 г, витамина Р – 72,8 мг/100 г.

Рекомендуемые расстояния при посадке 5(4,5) × 1,5 м. Особенности формирования и обрезки – желательна короновидная формировка.

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: крупноплодность, малиновую окраску по большей части плода, длительный срок хранения свежих плодов, повышенное содержание сухих веществ, сахаров, витамина С).

Новый отечественный сорт яблони Гайто Газданов предназначен для получения стабильных урожаев яблони с хорошими качественными показателями плодов для товаропроизводителей Северо-Кавказского региона России – предприятий различной формы собственности отрасли садоводства.

Конкурентные преимущества полученного нового сорта (как основного элемента интенсивной технологии возделывания яблони) обусловлены наличием у него комплекса значимых хозяйственных признаков: высокая скороплодность, урожайность, иммунитет к парше, адаптивность к абиотическим стрессорам, высокое качество и товарность плодов, а также максимальной степенью реализации биопотенциала в почвенно-климатических условиях Северо-Кавказского региона.

Скороплодность, стабильное плодоношение, урожайность (27,6-66,1 т/га), иммунитет к парше и устойчивость к мучнистой росе предполагают значительное снижение себестоимости производства плодов за счет сокращения обработок средствами химической защиты, увеличение выхода доли высокотоварных плодов (до 90 %).

Новый сорт яблони региональной селекции Гайто Газданов перспективен для создания малозатратных интенсивных садов короткого

цикла безопорной конструкции. Культивирование нового зимнего сорта Гайто Газданов, обладающего иммунитетом к парше позволит:

- снизить пестицидную нагрузку на окружающую среду;
- получать продукцию с повышенными показателями экологической чистоты и качества.

Груша.

Учитывая значимость культур груши и айвы в регионе, нами проводятся исследования по выявлению более устойчивых к болезням, высокоурожайных сортов с высоким качеством плодов и продуктов переработки и их длительным хранением. Получены перспективные сорта селекции СКФНЦСВВ по скороплодности и продуктивности, которые рано вступают в плодоношение, быстро наращивают урожай, более адаптированы к местным условиям (табл. 4).

Таблица 4 – Цветение, урожай и состояние сортов груши, 2022 год

Сорт	состояние	цветение		
		начало	конец	балл
Аббат Фетель	4,0	17.04	21.04	2,0
Августовская роса	4,0	17.04	20.04	2,0
Александра	5,0	18.04	22.04	1,0
Александрин Дульяр	3,0	15.04	20.04	1,0
Бере Клержо	3,0	18.04	22.04	1,0
Бере краснокутская	5,0	18.04	23.04	ед.
Вильямс (к)	4,0	19.04	24.04	2,0
Дево	4,0	18.04	23.04	3,0
Джанкойская поздняя	3,5	19.04	23.04	5,0
Зимняя млиевская	3,5	19.04	23.04	4,0
Люберская	4,0	21.04	25.04	1,0
Молдавская ранняя	4,0	19.04	23.04	3,5
Перлына	2,0	-	-	0
Скромница	4,0	18.04	23.04	5,0

В последние годы современное плодоводство стремится к интенсификации, размещению на единице площади как можно большего количества урожайных деревьев. В связи с этим перед селекционерами стоит задача по поиску новых сортов, пригодных для интенсивных садов.

Одним из путей является выращивание груши на карликовых подвоях. Однако это связано с определенными трудностями: отсутствием надежных и хорошо совместимых подвоев груши, поэтому нами предлагается другой путь, который основывается на поиске и подборе слаборослых сортов груши.

Изучение сортового фонда груши в СКФНЦСВВ показало, что в качестве **источника силы роста и компактности кроны** может быть использован в селекции сорт Вильямс в качестве родительской формы, что позволило на его основе в селекции создать несколько скороплодных сортов и элитных форм с компактной кроной дерева.

Эту классическую позднелетнюю грушу вывел в 18 веке. в Беркшире (Англия) Вилер; распространил ее Р. Вильямс, присвоив сорту свое имя. Он районирован в Северо-Кавказском регионе и широко распространен в южных районах России: Дагестане, Кабардино-Балкарии, Северной Осетии, Ставропольском и Краснодарском краях, Ростовской и Калининградской областях, а также в Украине, Узбекистане, Туркменистане, Таджикистане, Киргизии, Азербайджане, Латвии, Грузии, Молдавии.

Летний сорт Вильямс заслуженно считается источником сдержанной силы роста дерева и высокого качества плодов и передает эти качества потомству до 60 % (рис.6).



Рисунок 6 – Сорт груши Вильямс

Один из лучших десертных сортов для промышленного, любительского и приусадебного садоводства.

Дерево слабо- или среднерослое, с широкопирамидальной, широко облиственной кроной; кора на штамбе и основных скелетных ветвях серая, гладкая.

Побеги толстые, слегка дугообразные или прямые, голые, с немногочисленными чечевичками, средней величины, светло-желтые. Листья крупные, яйцевидные, короткозаостренные, гладкие, блестящие, слегка сложенные "лодочкой". Боковые жилки светлые, характерные для этого сорта, выступающие. Край листа мелкогородчатый, кончик короткий. Листовые почки короткие, заостренные, слегка отделяющиеся от побега, сидят на вздутых подушечках. Цветки средней величины, по 6-7 в соцветиях. Цветение позднее и довольно длительное; цветки не особенно чувствительны к неблагоприятным погодным условиям.

Плоды от средней до крупной величины со средней массой 160-170 г, на молодых деревьях до 180 г, грушевидной формы, со слегка бугристой поверхностью. Кожица душистая, тонкая, блестящая, ко времени съема плодов светло-зеленая, при созревании – восково-желтая с мелкими серыми точками. Иногда на плодах отмечены ржавого цвета пятнышки, которые расходятся к полюсам; на солнечном боку бывает слабый румянец. Плодоножка средней длины, толстая, слегка изогнутая, иногда с раструбом у верхнего конца. Чашечка открытая или полуоткрытая, мелкая. Сердечко маленькое, эллиптическое, слабо очерчено. Семенные камеры средних размеров, продолговато-овальной формы, заостренные к основанию плода, ось полая. Семена мелкие, яйцевидные, темно-коричневые. Мякоть желтовато-белая, нежная, тающая, сочная, винно-сладкая со своеобразным мускатным ароматом, прекрасного десертного вкуса (4,3-4,5 балла). Плоды завязываются парами или тройками, на дереве держатся прочно, хорошо прикрепляются к плодоножке. Съемная спелость в зависимости от погодных условий (в южных областях — в 1-2 декаде августа). Снятые заблаговременно плоды (до

появления желтизны на кожице) хранятся до 15 дней и в это время хорошо переносят транспортировку. В холодильнике хранятся до 45 дней. Сорт универсального назначения. В консервировании (компоты) и в сушке получается продукция отличного качества. Сорт самобесплодный. Хорошо удается на груше и айве. В пору плодоношения вступает очень рано: деревья, привитые на груше – на 5-6 год, привитые на айве – на 3-4 год. Урожайность сильно колеблется в зависимости от условий произрастания. Зимостойкость и засухоустойчивость сорта невысокая, особенно в молодом возрасте; к почвенным условиям малотребователен, но лучше удается на плодородных, хорошо обеспеченных водой почвах. Сорт чувствителен к воздушной засухе. Паршой поражается в средней степени.

Сорт Вильямс, как источник сдержанной силы роста дерева и высокого качества плодов, широко используется в селекции, на его основе нами получена **элитная форма 4-8-69** (Вильямс х Бере Арданпон). Элитная форма имеет красивые вкусные плоды, которые не перезревают на дереве, ежегодную урожайность и повышенную устойчивость цветков к весенним заморозкам. Срок созревания – летний. Дерево со сдержанной силой роста, крона в молодом возрасте пирамидальная. Плоды средние и крупные, (масса до 220 г), на молодых деревьях до 300 г, широко-грушевидной вытянутой формы, кожица гладкая, блестящая, нежная, желтого цвета с ярко-красным румянцем на большей части плода. Мякоть белая, нежная, сочная, хорошего кисло-сладкого вкуса, без грануляций. Дегустационная оценка – 4,6 балла (рис. 7).



Рисунок 7 – Элитная форма груши 4-8-69 (Вильямс х Бере Арданпон)

В результате проведенных научно-исследовательских работ выделен **источник высокого качества продуктов переработки сорт айвы Кубанская** (рис. 8). Гибридное потомство этого сорта наследует высокое качество плодов и продуктов переработки (ОКС 44%).

Сорт Кубанская выделен Крымской опытно-селекционной станцией ВИР из местных сортов. Распространён в Краснодарском и Ставропольском краях, произрастает на Украине, в Молдове, республиках Северного Кавказа.

Дерево среднерослое, крона плоскоокруглая, раскидистая, чуть пониклая, редкая, облиственность средняя. Угол отхождения скелетных ветвей около 45°, ветви изогнутые, средней толщины и тонкие, тёмно-коричневого цвета. Штамб средней толщины, тёмно-коричневый, кора шероховатая отслаивающаяся.

Побеги средней толщины, прямые, зеленовато-бурые, со слабым опушением; чечевичек много, очень мелкие, красноватого цвета, междуузлия короткие. Почки светло-зелёные, прижатые, средней величины.

Лист равнобокий, средней величины, яйцевидной формы, со слабо заострённым кончиком, темно-зелёный. Опушение с нижней стороны листа густое, войлочное. Верхушка листа заострённая, кончик короткий, основание

листа округлое, чуть вытянутое к черешку, края листовой пластинки ровные; черешок короткий, тонкий, со сильной антоциановой окраской; прилистники крупные, клиновидные.

Цветки одиночные, крупные, слабо-розоватые; цветонос тонкий, опушение слабое. Лепестки крупные, округло-овальные, розоватого цвета, пыльники жёлтые, крупные, пестики расположены чуть ниже тычинок.

Плоды среднего размера (170-250 г), равномерные, округло-цилиндрической формы, поверхность слаборебристая, опушение сильное, серое, войлочное, сплошное, при созревании исчезает. Основная окраска оранжево-зеленоватая, чашечка полузакрытая, чашелистики средние. Блюдце средней ширины и глубины, мелкоскладчатое, воронка узкая, средней глубины, чистая. Сердечко среднего размера, яйцевидное, семенные камеры закрытые, серповидные, стенки мелкоскладчатые. Семена среднего размера, плосковатые, коричневые с тёмным ободком. Мякоть кремовая, с каменистыми клетками у семенной камеры, сочная, средней плотности, сладкая, со слабой кислотностью. Съёмная зрелость наступает в 1-2-й декаде октября, хранятся плоды до декабря. Сорт технологичен— в переработке дает соки высокого качества (4,5 балла). Транспортабельность плодов высокая. Плоды среднеустойчивы к подкожной пятнистости. В пору плодоношения деревья вступают с 4-5 лет после посадки в сад однолетками. Урожайность средняя – 70-90 ц/га. Зимостойкость и засухоустойчивость средняя.

Сорт широко используется в селекции. На основе гибридологического анализа с участием сорта Кубанская выделена элитная форма 3-17-49 - (Кубанская св. оп.) для дальнейшего углубленного изучения по основным хозяйственно-ценным признакам: продуктивности, технологическим и товарным качествам плодов и устойчивости к монилиозу.



Рисунок 8 – Сорт айвы Кубанская

Все многообразие внешнего вида, вкусовых особенностей и биохимические свойства плодов, обуславливают потребительскую ценность и составляют их товарное качество. Чрезвычайно важные показатели качества плодов - их лежкость и пригодность к различным видам переработки. Качество плодов определяет возможности их дальнейшего использования, для выработки каких продуктов они предназначены. Ряд важнейших показателей качества продуктов переработки из плодов айвы определяли при помощи дегустационной оценки. При определенных условиях сумма субъективных оценок дегустаторов дает объективное представление о вкусе, аромате, консистенции продукта.

Оценка проводилась методом дегустации по пятибалльной шкале, учитывался внешний вид плодов, сиропа и вкусовые достоинства варенья и компотов (таблица 5).

Таблица 5 - Средние показатели технологических качеств продуктов переработки из плодов айвы

Сорт	Внешний вид	Окраска сиропа	Средняя оценка	
			компот	варенье
Аврора	4,5	4,4	4,5	4,7
Ароматная	4,4	4,5	4,3	4,3
Благодатная	4,3	4,3	4,1	4,1
Десертная	4,4	4,5	4,4	4,5
Золотистая (к)	4,3	4,4	4,3	4,5
Кубанская	4,5	4,6	4,5	4,7

Среди сортов по продуктам переработки с высокой оценкой выделились сорт селекции СКЗНИИСиВ Аврора и сорт Кубанская. Данные по вкусовым достоинствам компотов и варенья между собой у большинства сортов отличаются мало, стало быть, выделенные сорта айвы одинаково пригодны на эти виды переработки.

1.3.2 Селекция и сортоизучение косточковых культур

Создание новых сортов в СКФНЦСВВ ведется по трем основным косточковым культурам – черешня, вишня и слива домашняя.

Черешня – плодовая культура, характеризующаяся высоким биологическим и продуктивным потенциалом, который полно реализуется в условиях южного региона России. Полностью реализовать его позволит обоснованный подбор сортов и современные интенсивные технологии возделывания. В связи с этим, требования к сортам черешни существенно меняются. Так несколько лет назад основными направлениями в селекции были создание зимостойких и с высоким качеством плодов сортов черешни.

В настоящее время, глобальное изменение климата требует наличия таких признаков как пластичность сорта к резко изменяющимся условиям среды, адаптивность к продолжительной засухе, устойчивость к доминирующим болезням и ценный биохимический состав плодов. В этой связи очевидна необходимость разработка новых селекционных направлений для своевременного совершенствования южного сортимента черешни.

Качество плодов – один из основных показателей товарности, которое определяет востребованность сорта потребителями и производителями. Биохимический состав плодов, также определяет вкусовые качества и пищевую ценность. Плоды черешни содержат сахара, клетчатку, различные органические кислоты, пектин, витамины групп В, РР, С, биотин, соли железа, эфирные масла, кумарины, амигдалин. Наибольшую ценность черешни составляют антиоксиданты, с помощью которых происходит защита от ультрафиолетового излучения.

Одной из задач, обозначенных в 2022 году, было выделение сорта черешни по высокому содержанию биологических веществ в плодах. В изучении находились разные по происхождению сорта черешни.

Биохимический состав плодов составляет не только пищевую ценность плодов, но также определяет вкусовые качества, а некоторые – растворимые сухие вещества (РСВ) определяют внешний вид готовой плодовой продукции. Содержание РСВ по изученным сортам черешни значительно колебалось от 14,2 % (Дар изобилия) до 21,1 % (Кавказская), средний показатель по всем сортам составил 16,6 %.

Сладкий вкус черешни объясняется наличием сахаров нескольких видов, её плоды содержат глюкозу, фруктозу и сахарозу. У изученных сортов данный показатель варьировал от 9,7 % (Дар изобилия) до 14,3 % (Кавказская), среднее накопление составило 11,3 %.

По накоплению аскорбиновой кислоты плоды черешни уступают некоторым плодовым культурам. В среднем накопление витамина С у изученных сортов составило 9,5 мг/100 г. Минимальное – составило 7,1 мг/100 г (Аэлита), высокое содержание было на уровне 11,0 мг/100 г (Кавказская).

Р-активные вещества по своему биологическому действию близки к аскорбиновой кислоте. По накоплению витамина Р черешня также не является лидером, однако 100 г плодов способно восполнить суточную потребность человека в витамине Р, которая составляет 50 мг, средний показатель по всем сортам составил 64,8 мг/100 г. У изученных в отчётном году сортов варьирование составило от 48,6 мг/100 г (Дар изобилия) до 95,4 мг/100 г (Крупноплодная).

Антоцианы отвечают за привлекательный цвет плодов черешни и разнообразие окраски плодов от желтых до красного, бордового, рубинового. Высоким накоплением антоцианов в 2022 г. отличался тёмный сорт черешни Чёрные глаза – 494,9 мг/100 г, минимальное значение составило 44,8 мг/100 г. было у жёлтоплодного сорта Аэлита (табл. 6).

Таблица 6 – Биохимический состав плодов черешни разных сортов в условиях Прикубанской зоны садоводства Краснодарского края, 2022 г.

Сорт	РСВ, %	Сумма сахаров, %	Витамин С, мг/100 г	Витамин Р, мг/100 г	Антоцианы, мг/100 г
Кавказская (к)	21,1	14,3	10,8	59,3	397,0
Алая	14,3	9,8	9,7	93,2	173,9
Аэлига	16,2	11,0	7,1	50,8	44,8
Дар изобилия	14,2	9,7	11,0	48,6	177,9
Крупноплодная	17,4	11,8	8,8	95,4	445,4
Спутник	14,6	9,9	8,8	72,2	368,8
Сашенька	17,6	12,0	9,4	64,3	245,6
Чёрные глаза	18,6	12,6	9,3	51,6	494,9
Францис	15,3	10,4	10,6	57,4	–
Среднее:	16,6	11,3	9,5	64,8	293,5

Проведенный анализ биохимических показателей, изучавшихся сортов черешни позволил выделить **источник высокого качества плодов, и ценного биохимического состава (сорт Чёрные глаза)**, который по показателям РСВ, сумма сахаров, по количеству антоцианов превысили показатели контрольного сорта Кавказская.

Сорт *Чёрные глаза* (рис. 9) получен в СКФНЦСВВ от посева семян от свободного опыления сорта Алая. Дерево сильнорослое, быстрорастущее, с шаровидной, средней густоты кроной. Лист крупный, широко-яйцевидный, тёмно-зеленый.

Сорт среднего срока созревания – середина июня. Транспортабельность плодов хорошая.

Плоды красивые, привлекательные, товарные, крупные – средняя масса составляет 8,5 г, максимальная может достигать – 10,0 г, почковидные, тёмно-красные, при полном созревании почти чёрные. Мякоть тёмно-красная, средней плотности, высоких вкусовых качеств, дегустационная оценка 4,8 балла. Сок тёмно-красный.

Биохимический состав плодов: 18,6 % растворимых сухих веществ, 12,6 сахаров, 9,3 мг/100 г витамина С, 51,6 мг/100 г витамина Р, антоцианы 494,9 мг/100 г.

Сорт отличается высокой устойчивостью плодовых почек к морозам, а также устойчивостью к грибным болезням.

Хорошими опылителями для сорта являются: Контрастная, Дайбера чёрная, Мелитопольская чёрная. Урожайность высокая, в интенсивных насаждениях может достигать 20 т/га.

Сорт универсального использования. В технической переработке плоды используются для приготовления компота, сухофруктов, заморозки и других видов переработки.

Достоинства: крупный размер плодов высокого качества.

Недостатки: сильнорослость дерева, не устойчив к весенним заморозкам



Рисунок 9 – Сорт черешни Чёрные глаза - источник ценного биохимического состава плодов

Для улучшения сортимента черешни ведется непрерывная работа по выделению новых элитных форм – кандидатов в будущие сорта, полученных путем направленной гибридизации по комплексу положительных показателей. Проводимые ежегодно полевые и лабораторные изучения сортов и новых генотипов позволяют выделять лучшие формы, превосходящие по некоторым показателям сорта в сортименте культуры.

Оценку элитных форм в 2022 г. проводили по комплексу показателей продуктивности, устойчивости к болезням и качеству плодов (табл. 7).

Таблица 7 – Характеристика сортов и элитных форм черешни по основным хозяйственно-биологическим показателям в условиях Прикубанской зоны садоводства Краснодарского края, 2022 г.

Сорт/Форма	Устойчивость к болезням, балл		Урожай, кг/дер	Масса плода, г	Устойчивость к растрескиванию
	коккомикоз	клястероспориоз			
Кавказская (к)	2	1	20	4,3	средняя
Алая	2	2	50	8,3	устойчив
Дар изобилия	4	1	45	6,5	средняя
Волшебница	1	1	55	7,2	устойчив
Мадонна	1	2	15	5,7	устойчив
Сашенька	3	0	50	7,0	устойчив
Чёрные глаза	1	1	20	8,1	устойчив
12-14-23	1	1	40	7,5	устойчив
12-13-19	2	2	35	6,0	средняя
12-13-5	3	2	25	6,2	устойчив
12-14-10	2	1	20	5,9	средняя
12-14-7	1	2	35	6,7	устойчив
Среднее:	2	1	34,2	6,6	–

В результате проведенной комплексной оценки элитных форм в 2022 г. выделена одна элитная форма черешни – **12-14-23**, характеризующаяся рядом положительных, хозяйственно-ценных признаков и биологических показателей. По устойчивости к коккомикозу и клястероспориозу она превосходит районированные сорта, а по массе плода и урожайности контрольный сорт Кавказская.

Элитная форма черешни 12-14-23 получена в результате межсортовой гибридизации лучших сортов черешни (Мелитопльская черная х Валерий Чкалов).

Дерево средней силы роста, с шаровидной кроной, средней густоты. Лист выше среднего размера, зеленый, эллиптической формы, черешок средний.

Созревание в условиях Краснодарского края – позднее (после сорта Алая), третья декада июня-первая декада июля. Средний размер плодов составляет – 7,0–7,5 г, максимальный размер может достигать 8,0 г, светло-

жёлтые с ярко красным покровным румянцем, занимающим основную поверхность. Плоды плотные, эффектные, одномерные. Форма плода – овально-сердцевидная, форма верхушки плода – слабовдавленная, 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: 16,0 % сухих веществ, 10,9 % сахаров, 0,9 % кислот, 9,5 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 35,0-40,0 кг с дерева или 14,5-16,6 т/га (рис. 10).



Рисунок 10 – Элитная форма черешни 12-14-23

Достоинства: крупноплодность, высокие вкусовые качества.
Недостатки: активный рост дерева.

Выделение засухоустойчивых форм черешни, как источников данного селекционно-ценного признака

Исследования проводились в Усть-Лабинском районе (Прикубанская зона, ОПХ «им. К.А. Тимирязева», ФГБНУ СКФНЦСВВ, метеостанция Усть-Лабинск), где отмечаются высокие летние температуры и длительные засухи особенно в июле-августе (рисунки 11, 12). Наблюдаются частое повышение температур до категории опасного явления (39 °С - 40 °С).

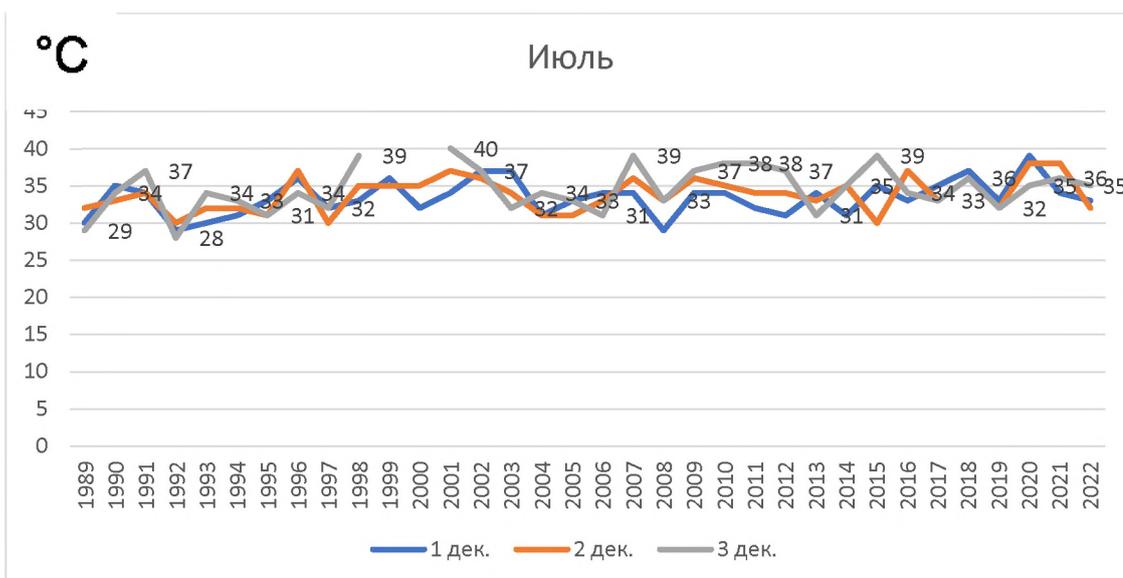


Рисунок 11 - Высокие летние температуры в июле условиях ОПХ «им. К.А.Тимирязева», ФГБНУ СКФНЦСВВ, метеостанция Усть-Лабинск

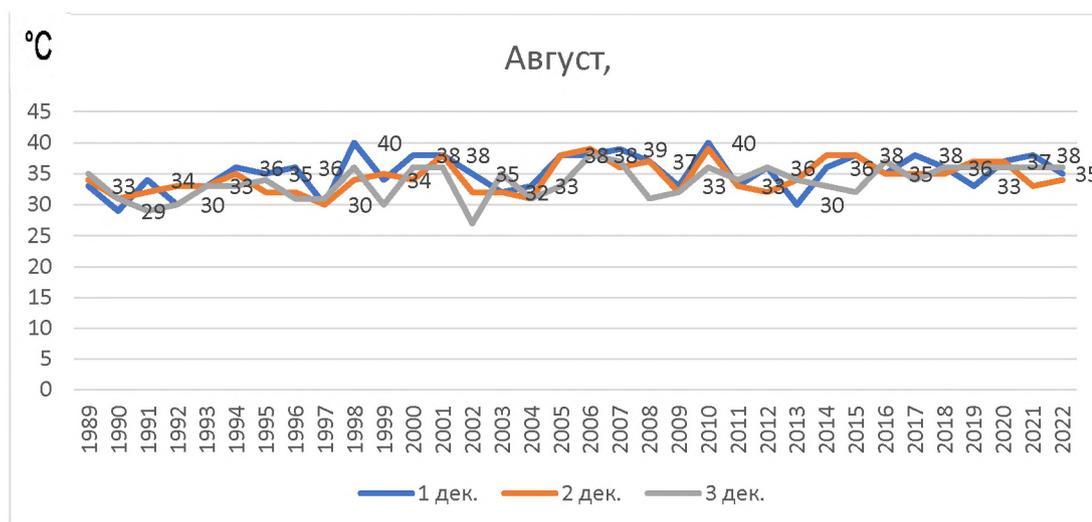


Рисунок 12 – Высокие летние температуры в августе условиях ОПХ «им. К.А.Тимирязева», ФГБНУ СКФНЦСВВ, метеостанция Усть-Лабинск

Количество выпадающих осадков Усть-Лабинского снижается по данным за период 2011-2022 гг. и значительно ниже в летний период, чем в условиях города Краснодара (рис. 13).

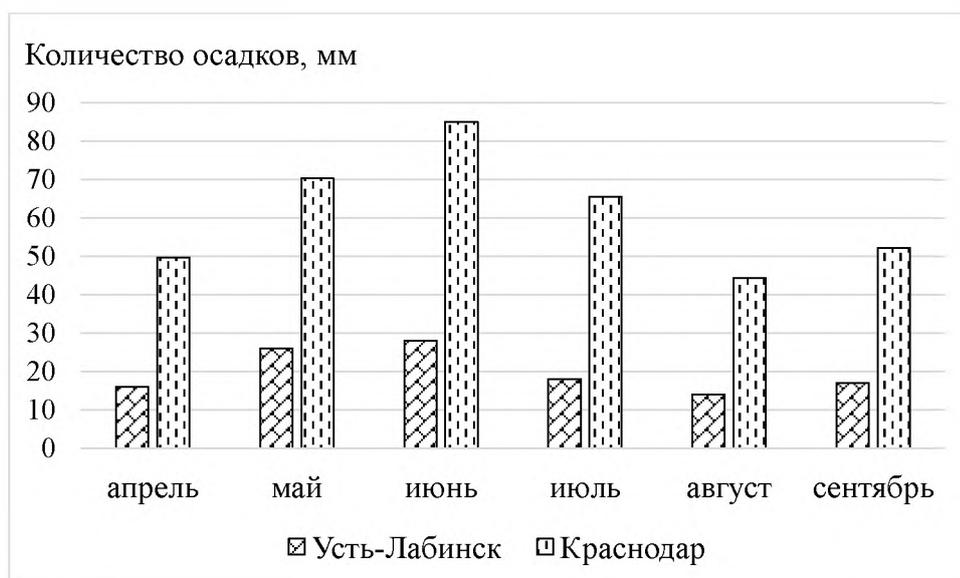


Рисунок 13 –Показатели среднего количества осадков (мм) за период 2011-2022 гг. в Усть-Лабинском районе и Краснодаре

2022 год отличался самыми высокими температурами в весенний период по сравнению с предыдущими годами. Максимальная температура в апреле этого года достигала 30 °С (третья декада), и он оказался наиболее засушливым в августе за весь период исследований. Количество выпавших осадков в этот период – 8 мм. за месяц при температурах, превышающими норму на 9 °С.

В этих условиях проведен заключительный этап исследования по засухоустойчивости привойно-подвойных комбинаций на подвоях ВСЛ-2 и сеянцы антипка. Проведенный кластерный анализ данных по водоудерживающей способности по данным за 2, 4 и 24 часа выделил сорт Космическая, он попал в группу к наиболее толерантным к обезвоживанию сортам. Это же подтвердили данные по оводненности листьев, изученными во время длительных засух (рисунок 14).

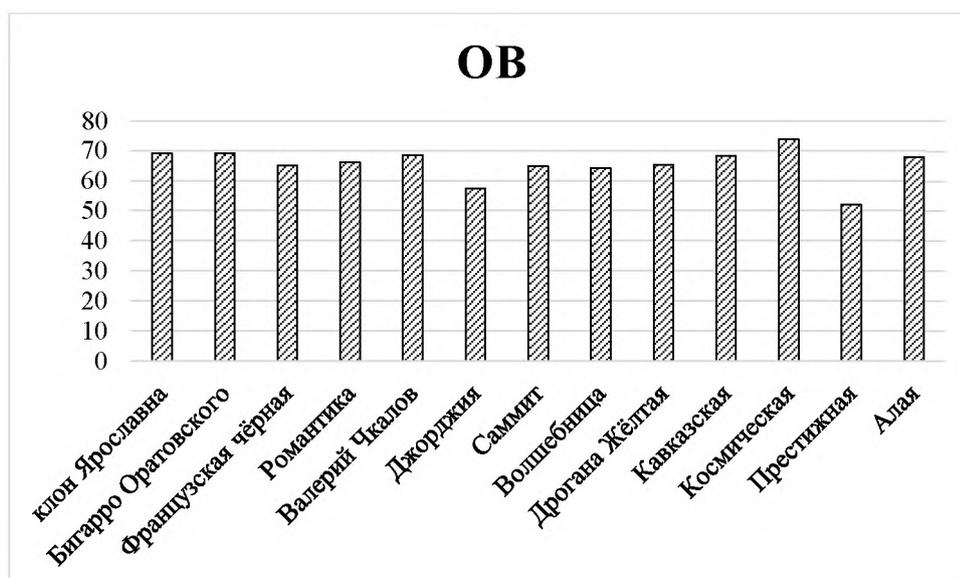


Рисунок 14 – Оводненность тканей листьев сортов черешни по данным за 2018-2022гг.

Необходимо отметить, что и урожайность деревьев сорта Космическая на подвоях ВСЛ-2 и антипка была стабильно высокой, даже в годы, когда практически по другим сортам она не наблюдалась. Сорт Космическая показал способность не приостанавливать дифференциацию цветковых почек даже при температурном стрессе более 38 °С, в то время как другие сорта прекращают развитие цветковых почек в счет будущего урожая уже при температуре 30 °С, что и обеспечивает её продуктивность в стрессовых ситуациях.

Сорт Космическая средне-позднего срока созревания, происходит из гибридной комбинации Приусадебная х Скороспелка. Плоды черешни Космическая округло-сердцевидной формы, красного цвета, средней массой 9-10 г (рис. 15). Мякоть кремовая, сочная, хрящеватая, отличного винно-сладкого вкуса (4,8-5 баллов). Сок бесцветен. Кожица тонкая, прочная, тёмно-оранжевая с ярко-красным румянцем. Дерево отличается высокой зимостойкостью, засухоустойчивостью, устойчивостью к монилиозу, средней устойчивостью к коккомикозу, дает стабильно высокий урожай в условиях недостаточной влажности и высоких летних температур, значительно превышающих нормы. Лучшие опылители: Бигарро Оратовского, Изюмная,

Крупноплодная, Радужная, Сюрприз, Францис. Отличается высоким процентом выхода саженцев в условиях юга России (рис. 16).



Рисунок 15 - Плоды сорта черешни Космическая



Рисунок 16 - Саженцы сорта черешни Космическая в условиях выращивания на богаре

В результате исследований сорт черешни Космическая выделен как источник высокой засухоустойчивости.

Вишня обыкновенная. В России вишня является одной из самых распространенных плодовых косточковых культур, возделываемая во всех регионах страны. Вишня скороплодна, неприхотлива к условиям произрастания, практически ежегодно плодоносит и большинство сортов являются высокоурожайными. Эта плодовая культура характеризуется высокой зимостойкостью, увеличивающей ареал ее распространения по разным регионам, а также отличается засухоустойчивостью, жаростойкостью. Плоды вишни обладают высоким качеством плодов и ценностью.

В плодах вишни содержатся сахара, сухие вещества, витамины Р и С, различные биологически активные вещества. По содержанию кумаринов плоды вишни стоят на четвертом месте после черной малины, красной смородины и граната, часто используются в народной медицине, обладают кровоостанавливающим и антисептическими свойствами.

Плоды вишни потребляются в свежем виде и для различных видов переработки – компоты, соки, настойки, вина, варенье, джемы, цукаты,

начинки для конфет и др. Их также используют для заморозки, после которой они сохраняют хороший вкус и ценность по биохимическому составу.

В России и мире многие виды вишни используются в декоративном садоводстве для озеленения и ландшафтного строительства. Ценность сорта, любой плодовой культуры определяется вкусовыми достоинствами плодов, которые обуславливаются содержанием различных химических веществ. Анализ полученных данных позволил установить содержания разных веществ в плодах вишни в зависимости от сортовых особенностей и складывающихся погодных условий в период вегетации.

Основными направлениями в селекции вишни в России на современном этапе являются: селекция на устойчивость к основным болезням – коккомикозу и монилиозу, на сдержанность роста дерева, на высокую урожайность, на крупноплодность, скороплодность и другие.

В результате выполненных в отчетный период исследований установлено, что высокое содержание растворимых сухих веществ 18,4-24,0 % отмечено у сортов Эффектная, Элегия, Ассоль и Застенчивая. Высокое содержание сахаров в пределах 8,1-11,4 % отмечено у сортов: Призвание, Памяти Евстратова, Тамарис, Эффектная, Элегия, Ассоль и Застенчивая. Низкую кислотность (1,15-1,95 %) имели сорта Светлая, Тимати, Памяти Евстратова, Элегия, Застенчивая, Эффектная, Ассоль, Призвание, Ровесница. Высоким содержанием витамина С (13,0-16,3 мг/100 г) отличались сорта Тамарис, Ровесница, Тимати, Ассоль и Застенчивая. Высоким содержанием витамина Р богаты сорта Ровесница, Эффектная, Светлая, Тамарис и Застенчивая. Высокое содержание антоцианов отмечено во всех изученных сортах за исключением сортов Светлая и Призвание (табл. 8).

Таблица 8 – Биохимический состав плодов сортов вишни обыкновенной, в условиях Прикубанской зоны садоводства Краснодарского края, 2022 г.

Сорт	Раств. сухие в-ва, %	Сумма сахаров %	Кислотность, %	с/к инд	Витамин С, мг/100г	Витамин Р, мг/100г	Антоцианы, мг/100г
Светлая	16,3	7,7	1,15	6,7	6,9	139,2	51,6
Эффектная	18,4	8,7	1,60	5,5	9,8	126,4	281,6
Элегия	20,0	9,5	1,57	6,0	5,6	109,8	272,5
Призвание	17,1	8,1	1,87	4,3	10,5	90,6	149,3
Дюк Ивановна	13,9	6,6	2,29	2,9	8,8	109,8	191,4
Застенчивая	24,0	11,4	1,60	7,1	16,3	161,0	300,2
Ровесница	15,0	7,1	1,95	3,6	13,2	126,0	191,4
Памяти Евстратова	17,0	8,1	1,23	6,6	8,0	107,8	281,4
Тамарис	17,0	8,1	2,55	3,2	13,0	178,0	494,8
Тимати	16,2	7,7	1,16	6,6	14,4	90,6	200,4
Ассоль	21,8	10,3	1,69	6,1	15,8	136,2	279,9

На основании полученных результатов в качестве источника ценного биохимического состава плодов выделен сорт вишни *Застенчивая*.

Сорт получен в ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» Авторы: Зуева Л.И., Каньшина М.В., Астахов А.А. Включен в Госреестр по Центральному (3) региону.

Сорт *Застенчивая*, позднего срока созревания, десертного и универсального назначения. Дерево среднего размера, со слегка раскидистой и шаровидной кроной средней густоты. Преимущественное размещение плодовых образований на букетных веточках. В соцветии цветки тройные, среднего размера, белые. Плоды крупные, одномерные, средней массой 4,5 г, округлой тупосердцевидной формы. Плодоножка короткая, толстая, от ветки отделяется хорошо, прикрепление к косточке непрочное.

Основная окраска плода темно-красная, почти черная, покровная – черная (рис. 17). Подкожных точек нет. Кожица нежная, голая. Мякоть темно-красная, нежная, сочная, хрящеватая. Сок темно-красный, вкус кисло-сладкий. Общая дегустационная оценка плодов 5 баллов. Косточка свободная, от мякоти отделяется хорошо, среднего размера. Сорт частично

самоплодный. Зимостойкий. Относительно устойчив к грибным заболеваниям.



Рисунок 17 – Сорт вишни Застенчивая – источник ценного биохимического состава плодов

В результате проведенных исследований в отчетном году выделена элитная форма вишни 17-3-29.

Элита 17-3-29 (рис. 18). Дерево слаборослое – высота не более 2-х метров, скороплодное – на 3-й год после посадки. Тип плодоношения – преимущественно на букетных веточках.

Среднего срока созревания (вторая декада июня). За годы наблюдений урожайность в среднем составила 10,0-13 кг с дерева или 4,1-5,4 т/га.

Плоды – среднего размера 3,6-4,5 г, широкоокруглые, темно-красные. Сок и мякоть плода светло-красные, вкус кисло-сладкий. Плодоножка средней длины, отрыв от плода сухой. Плоды универсального назначения используются как в свежем, так и переработанном виде (варенье, компоты). Биохимический состав плодов: содержание сухих веществ 14,8 %, сахаров 8,9 %, кислот 2,32 %, сахарокислотный индекс 3,8, содержание витамина С 9,7 мг/100 г, витамина Р 126,0 мг/100 г, антоцианов 227,4 мг/100 г.

Проявляет полевую устойчивость к коккомикозу (в эпифитотийные годы поражается на 2,0 балла). Засухоустойчивость достаточно высокая.

Достоинства: скороплодность, сдержанность роста, устойчивость к болезням.

Недостатки: средний размер плодов.



Рисунок 18 – Элитная форма вишни 17-3-29

Сорт вишни Южанка с полигенным типом устойчивости к коккомикозу

Сорт вишни Южанка, получен в СКФНЦСВВ в результате использования методов отдаленной гибридизации и метода биотехнологии (выращивания 19-дневных зародышей *in vitro*) по программе создания устойчивых к коккомикозу генотипов.

Сорт выделен в устойчивые сорта при заражении его различными клонами гриба, вызывающими коккомикоз (в том числе наиболее вирулентными штаммами), полученными из разных эколого-географических районов.

В условиях Краснодарского края вишня Южанка проявляет высокую устойчивость к коккомикозу в различных эколого-географических зонах. Исследования проводились в условиях Усть-Лабинского района (ООО «ОПХ им. К.А. Тимирязева» Прикубанская зона плодоводства, центральная подзона), в условиях ст. Старотитаровская (Темрюкский р-н, Черноморская плодовая зона, Анапо-Таманская подзона), в условиях Горячеключевского района (Предгорная зона плодоводства, центральная подзона).

Установлено, что в условиях Горячеключевского р-на и Усть-Лабинского р-на в популяциях имеются наиболее вирулентные биотипы

коккомикоза, которые поразили многие формы, ранее выделяемые как устойчивые. В этих условиях Южанка показывает высокую устойчивость к болезни (табл. 9-11). Проведенные лабораторные исследования по комплексу показателей (по количеству пустул, спор на 1 см²; продуктивности спорообразования и индексу устойчивости) подтвердили высокую устойчивость деревьев сорта Южанка.

Таблица 9 – Выделение горизонтально устойчивых к коккомикозу генотипов рода *Prunus* L. в насаждениях «ООО ОПХ им. К.А. Тимирязева» (Прикубанская зона плодоводства, центральная подзона), 2018 года посадки

Сорт	% поражения		Среднее количество спор с 1 см ²	Среднее количество пустул на 1 см ²	Индекс устойчивости	Генеративная активность гриба (среднее число спор в 1 пустуле)
	максимальная	средняя				
Южанка	0	0	0	0	0	0
Краснодарская сладкая (контроль)	25	6	7,5x10 ⁴	0,6	7,5x10 ⁴	125000

Таблица 10 – Выделение горизонтально устойчивых к коккомикозу генотипов рода *Prunus* L. в насаждениях КФХ «Маджар», Горячеключевской р-н (Предгорная зона плодоводства, центральная подзона), 2012 год посадки

Сорт	% поражения		Среднее количество спор с 1 см ²	Среднее количество пустул на 1 см ²	Индекс устойчивости	Генеративная активность гриба (среднее число спор в 1 пустуле)
	максимальная	средняя				
Южанка	0	0	0	0	0	0
Краснодарская сладкая (контр)	45	11	9,5x10 ⁴	1,2	7,5x10 ⁴	120000

Поражение на фоне биологической защиты у сорта Южанка не выше 1 балла (табл. 9, 10). Остальные формы и сорта черешни и вишни в Горячеключевском и Усть-Лабинском р-нах поражаются на 3-4 балла (по пятибалльной системе оценки 0-4) (табл. 11). Хотя в других зонах отмечено по многим сортам поражение не такое значительное, что не является определяющим показателем степени поражения, и выводы по их устойчивости

можно делать, только после многолетнего изучения состава популяций коккомикоза и по ранее перечисленным показателям – количеству пустул, спор на 1см²; продуктивности спорообразования и индексу устойчивости.

Таблица 11 – Полевая оценка устойчивости сортов вишни и черешни в различных зонах произрастания

Образец	Место проведения исследований	% поражения листьев	Максимальный балл поражения 2016 - 2022 г.
Мак	Усть-Лабинск	73	4
Алая	Усть-Лабинск	85	4
Мадонна	Усть-Лабинск	90	4
Краса Кубани	Усть-Лабинск	68	4
Мелитопольская Черная	Усть-Лабинск	70	4
Кавказская	Усть-Лабинск	50	4
Лучистая	Усть-Лабинск	70	4
Краснодарская сладкая	Усть-Лабинск	70	4
Чудо вишня	Усть-Лабинск	30	3
Молодежная	Усть-Лабинск	30	3
Алая	Горячий Ключ	55	4
Мак	Горячий Ключ	40	3
Кавказская	Горячий Ключ	48	3
Сюрприз	Горячий Ключ	27	3
Мак	Горячий Ключ	27	3
Чудо вишня	Горячий Ключ	50	4
Опус	Горячий Ключ	50	4
Франц Иосиф	Горячий Ключ	45	3
Регина	Горячий Ключ	46	3
3-33-34	Горячий ключ	9	1
Крупноплодная.	Горячий Ключ	36	3
Французская Черная	Горячий Ключ	70	4
Ярославна	Горячий Ключ	46	3
Чудо вишня	Горячий Ключ	50	4
Южанка	Горячий Ключ	7,5	1
Краснодарская сладкая	Горячий Ключ	60	4
Свит Харт	Горячий Ключ	70	4
Валерий Чкалов	Горячий Ключ	80	4
Свит Харт	ОПХ Центральное	90	4
Мелитопольская черная	ОПХ Центральное	40	3
Вишня декор. Сосн.к.	ОПХ Центральное	5	1
Краснодарская сладкая	ОПХ Центральное	47	3
Ярославна	Темрюкский р-н	20	2
Кавказская	Темрюкский р-н	39	3
Бигарро Оратовского	Темрюкский р-н	20	2
Мелитопольская черная	Темрюкский р-н	37	3
Сестренка	Темрюкский р-н	30	3
Южанка	Темрюкский р-н	2	1
3-33-34	Темрюкский р-н	1	1

В полевых условиях даже во времена эпифитотийного развития болезни на листьях сорта Южанка поражений практически не наблюдается (рис. 19).



Рисунок 19 – Плодовая ветвь вишни сорта Южанка

Сорт отличается скороплодностью и урожайностью. Плоды сорта достигают массы 6,1 г (средняя масса 4,8 г), округлой формы, темно-бордового, почти черного цвета, кисло-сладкого вкуса. Сухой отрыв от плодоножки делает сорт пригодным для механизированной уборки.

В насаждениях 2012 г. посадки в условиях Горячеключевского р-на, при использовании только пестицидов не химического класса, схеме посадки 3 x 2 м урожайность сорта Южанка в среднем по годам составляет 183 ц/га. Растения привиты на низкорослые подвои 11-15, 11-4, 3-21, 3-106 селекции

ФГБНУ СКФНЦСВВ. В условиях ООО «Садко» (Черноморской зона, Анапо-Таманская подзона Темрюкского р-на) урожайность с дерева составляет в среднем 21,1 кг, схема посадки 3x5, (140,5 ц/га) (табл. 11, рис. 20).



Рисунок 20 – Урожайность вишни сорта Южанка в ООО «Садко»

Плоды сорта отличаются не только высокими вкусовыми, но и биохимическими показателями, имеют универсальное назначение (табл. 12).

Таблица 12 – Химический анализ плодов вишни сорта Южанка

Сорт	растворимые сухие в-ва, %	сумма сахаров %	кислотность, %	Сах./кисл. индекс	вит. С, мг/100г	вит. Р, мг/100г	антоцианы, мг/100г
Южанка	19,6	8,6	1,26	6,8	8,8	109,8	148,5
Краснодарская Сладкая	17,4	9,4	1,5	6,3	11,0	95,3	159

Благодаря скороплодности, устойчивости к болезням, стабильному плодоношению, повышению урожайности при выращивании в условиях без использования пестицидов химического класса в 2,6 раз (в период хозяйственного плодоношения), и в 2,7 раз (в период полного плодоношения),

высоким товарным качествам плодов, технолого-экономические эффекты и эффективность при выращивании сорта Южанка составляют:

- снижение издержек производства на 10,8 п.п.
- дополнительный доход от реализации – 240,9 тыс.руб./га
- дополнительная прибыль – 124,1 тыс. руб./га.
- увеличение рентабельности – на 25,9 п.п.

Слива домашняя – одна из основных возделываемых в промышленных насаждениях плодовых косточковых культур, обладающая достаточно высокой устойчивостью к абиотическим и биотическим стрессам, продуктивностью и качеством плодов. Продуктивный период сортов сливы в среднем составляет 15-20 лет. Скороплодные сорта вступают в плодоношение на 3-4 год после посадки, поздние – на 6 год.

Слива домашняя культивируется в зоне умеренного климата, практически во всех странах мира. Высокий уровень производства плодов сливы в мире и в России связан прежде всего, с ее биологическими особенностями (адаптивность, продуктивность, ценность и качество плодов и т.д.), а также высокой технологичностью используемых современных сортов что отвечает требованиям интенсификации промышленного садоводства. В структуре косточковых культур на юге страны доля сливы на сегодня превышает 30 %.

Плоды сливы разнообразны по форме, массе, окраске и вкусу. Они ценятся за длительность потребления в свежем виде и возможность использования для переработки. Они богаты питательными веществами. Сорта южных районов страны могут накапливать до 20-25% сухих веществ, 20 % сахаров, 2,0 % кислот, 0,6-0,7 % пектина, 15 мг/100 г витамина С и до 200 мг/100 г витамина Р, отличаются содержанием минеральных веществ и микроэлементов: кобальт, железо, калий, кальций, магний и др. Содержание комплекса веществ повышает ценность и востребованность культуры.

Важным направлением в селекции сливы является выделение источников ценных признаков для дальнейшего их включения в направленные скрещивания.

В отчетном 2022 году выделен один **источник зимостойкости** – сорт Август Делайт.

Август Делайт. Дерево среднерослое, с раскидистой кроной. Штамб серого цвета, прямой. Побеги неколюченные, неопушенные, коричневого цвета; междоузлия средней длины. Вегетативные почки средние, слегка отклоненные, конусовидной формы, с заостренной верхушкой.

Листья среднего размера, темно-зеленого цвета, яйцевидной формы, с заостренной верхушкой и тупым основанием; край листа городчатый, глубина надреза – средняя. Листовая пластинка с глянцевой поверхностью, с верхней стороны опушение отсутствует, нижняя сторона слабоопушенная, преимущественно у черешка. Черешки средней длины, зеленые. Железки среднего размера, зеленого цвета. Прилистники зеленые, средней длины, ланцетовидной формы.

Цветки средние, блюдцевидной формы. Лепестки средние, яйцевидной формы, с округлой верхушкой и волнистыми краями, белой окраски, слегка сомкнутые. Бутоны белые. Цветение проходит в средние сроки (2 декада апреля). Созревание плодов среднее – 3 декада августа. В плодоношение сорт вступает на 3-4 год после посадки в сад. Сорт зимостойкий. Устойчивость к засухе средняя. Устойчивость к монилиозу и клостероспориозу высокая.

Плоды крупные (50-60 г), неравнобокие, эллипсоидной формы, с округлой верхушкой и слегка вытянутым основанием, сине-фиолетового цвета и сильным восковым налетом (рис.21). Опушение и штрихи отсутствуют. Воронка неглубокая. Брюшной шов средний, выражен хорошо, не растрескивается. Плодоножки толщиной 0,25 см, длиной 1,5 см. Косточки крупные (4-5 % от общего веса плода), овальной формы, с округлой верхушкой и вытянутым основанием, светло-коричневой окраски, поверхность бугорчатая. Отделяемость от мякоти хорошая. Спинной шов среднеоткрытый.

Центральное ребро выражено средне, боковые ребра хорошо заметны. Киль острый, размер – средний. Мякоть желтого цвета, плотная, ароматная, на вкус сладкая, сочная. Дегустационная оценка вкусовых качеств сливы в свежем виде 4,7-4,8 балла. Биохимический состав плодов: сухие вещества – 16,3 %, сахара – 11,0 %, кислоты – 0,7 %. Урожайность высокая (25-30 т/га).



Рисунок 21 – Сорт сливы домашней Август Делайт - источник зимостойкости

Из отборов выделена элитная форма сливы домашней 17-1-52, с целью дальнейшей комплексной оценки в производственных условиях.

Элитная форма сливы домашней 17-1-52. Дерево среднерослое (4,0 м), с редкой кроной округлой формы. Штамб светло-серого цвета, прямой. Побеги неколюченные, неопушенные, со средней интенсивностью антоциановой окраски; междуузлия короткие (2,0-2,3 см). Вегетативные почки мелкие, слегка отклоненные, конусовидной формы, с острой верхушкой.

Листья среднего размера, светло-зеленого цвета, округлой формы, угол вершины тупой, основание – выемчатое; надрезанность края листа и гороздчатая и зубчатая, глубина надрезанности – мелкая. Листовая пластинка с верхней и нижней стороны без опушения. Черешки средней длины со слабой

антоциановой окраской. Железки мелкие, желто-зеленого цвета. Прилистники короткие, шиловидные.

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 – 2 декада августа. В плодоношение сорт вступает, на 6 год после посадки в сад. Зимостойкость средняя, засухоустойчивость высокая. Устойчивость к монилиозу и класпероспориозу средняя.

Плоды средние (30-32 г), равнобокие, удлинено-овальной формы, с вытянутой верхушкой и округлым основанием, темно-фиолетового цвета со средним количеством подкожных точек бурого окраса и слабым восковым налетом (рис. 22,23). Опушение отсутствует. Воронка неглубокая, брюшной выражен хорошо, не растрескивается. Плодоножки толщиной 0,3 см, длиной 2 см. Косточка крупная (масса 1,3 г; 4,2% от общего веса мякоти), удлинено-овальной формы, с заостренной верхушкой и округлым основанием, светло-коричневая, поверхность бугорчатая. Отделяемость от мякоти хорошая. Мякоть темно-оранжевая, сочная. Плоды универсального назначения, транспортабельность средняя. Урожайность средняя (15 т/га при схеме посадки 4 x 2 м).



Рисунок 22 – Элитная форма сливы 17-1-52



Рисунок 23 – Плоды элитной формы сливы 17-1-52

1.3.3 Селекция и сортоизучение винограда

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 **выделены 3 донора ценных признаков:** гена устойчивости к милдью *Rpv3* – Мускат летний, гена устойчивости к милдью *Rpv12* – Восторг идеальный, генов устойчивости к оидиуму *Ren3* и *Ren9* – Памяти Смирнова.

Мускат летний (Пьеррелль (Сейв Виллар 20-366) x Королева виноградников) – столовый сорт винограда молдавской селекции (рис. 24). Сильнорослый. Грозди крупные (600-1000 г), цилиндроконические, средней плотности. Ягоды крупные (28,8 x 22,9 мм), овально-удлиненные, средней массой 7-8 г, янтарно-белые, на солнце янтарные, с мускатным ароматом. Мякоть мясисто-сочная. Кожица съедая. Сахаристость 17-20 %, кислотность 6-8 г/л. Среднеустойчив к морозу (до минус 23 °С), возделывается в укрывной культуре. Средняя устойчивость к оидиуму, не поражается серой гнилью. Мускат летний устойчив к милдью (3-3,5 балла), что подтвердилось данными ДНК-анализа (определен ген *Rpv3*). Согласно родословной источником устойчивости в данном сорте является межвидовой гибрид Пьеррелль (Мускат гамбургский (*V. vinifera*) на Виллар блан (56,19 % *V. vinifera* + 3,13 % *V. labrusca* + 29,16 % *V. rupestris* + 6,25 % *V. berlandieri* + 5,28 % *V. lincecumii*)), устойчивость которому в свою очередь передалась от Виллар блана – одного из самых известных доноров гена *Rpv3*. Урожайность высокая. Транспортабельный. Толерантен к корневой форме филлоксере.



Рисунок 24 – Грозди сорта винограда Мускат летний на кусте

Сорт Мускат летний может быть использован в селекции столовых сортов винограда как донор гена устойчивости к милдью *Rpv3*, согласно данным выполненного ДНК-маркерного анализа, так как в генотипе выявлен локус *Rpv3*.

Восторг идеальный (Виллар блан х Восторг) – столовый сорт селекции ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко (рис. 25). Сорт обладает повышенной устойчивостью к болезням и морозу. Срок созревания – раннесредний. Сила роста кустов высокая. Грозди очень крупные, конические, иногда с крылом, средней плотности, до 1 кг и более. Ягоды крупные (25x20 мм), массой 5-6,5 г, овальные, белые, мясисто-сочные, вкус приятный. Сахаристость 16-19 %, кислотность 5-7 г/л. Хорошо вызревает лоза. Достаточно устойчив к милдью (подтверждается данными ДНК-анализа – идентифицирован ген *Rpv12*) – устойчивость передалась от сорта Восторг [(Заря севера х Долорес) х Русский ранний (Шасла северная х Мичуринец)], имеющего в родословной ген плазму *V. amurensis*. Сорта *V. amurensis* Заря севера и Мичуринец являющиеся предками Восторга – известные доноры гена *Rpv12* – от какого именно сорта передался ген вопрос остается открытым. Сорт среднеустойчив к оидиуму, толерантен к филлоксере. Морозоустойчивость до -26 °С. Транспортабельный,

долго сохраняет товарный вид. Высокая урожайность, при правильной нормировке нагрузки на куст.



Рисунок 25 – Гроздь сорта винограда Восторг идеальный

Сорт винограда Восторг идеальный по данным проведенного нами ДНК-маркерного анализа может быть использован в селекции столовых сортов винограда как донор гена устойчивости к милдью *Rpv12*.

Памяти Смирнова (Ассоль) (Виллар блан х Кишмиш таировский розовый) – бессемянный сорт винограда селекции ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко (рис. 26). Среднего срока созревания. Кусты сильнорослые. Грозди крупные (400-700 г), цилиндроконические, удлиненные, умеренной плотности. Ягоды мелкие (17,0x14,4 мм), массой 2,5-3,0 г, удлиненные с заостренным кончиком, ярко-розовые, гармоничного вкуса. Мякоть сочная. Категория бессемянности - 2. Дегустационная оценка свежего винограда 8,2, сушеной продукции – 7,8-8,0 баллов. Побеги вызревают очень хорошо. Морозостойкость до –26 °С, устойчивость к милдью 2,0-2,5, к оидиуму – 2,0 балла. Толерантен к филлоксеру. По данным проведенного ДНК-анализа является носителем двух генов устойчивости к оидиуму – *Ren3* и *Ren9*,

которые передались напрямую от сорта-родителя Виллар блан, являющегося носителем данных генов.



Рисунок 26 – Гроздь сорта винограда Памяти Смирнова

Сорт винограда Памяти Смирнова выделен как донор генов устойчивости к оидиуму Ren3 и Ren9 по данным ДНК-маркерного анализа с использованием ДНК-маркеров GF15-42, ScORGF15-02 и CenGen6.

В столовом виноградарстве одним из приоритетных признаков является признак бессемянности ягод. В 2023 году выделен **источник** признака **бессемянности** – сорт Кишмиш Согдиана (рис. 27).

Кишмиш Согдиана (Победа x Кишмиш чёрный). Период созревания средний. Сила роста большая. Гроздь крупная (длина 25—28 см), ветвистая, рыхлая. Средний вес 450 г. Отдельные грозди достигают длины 40—50 см, весом более 1 кг. Ягода крупная, яйцевидная, черная, вкус приятный. Требуется крупная формировка и длинная обрезка (10—12 глазков). Средняя урожайность свыше 20 т/га.



Рисунок 27 – Гроздь сорта Кишмиш Согдиана

В настоящее время бессемянные сорта в зависимости от массы рудиментов подразделяют на 4 категории (класса) бессемянности: первая категория – масса рудиментов семян от 0 до 6 мг; вторая категория – от 6,1 до 10 мг; третья категория – 10,1–14 мг; четвертая – 14,1 мг и более. От климатических условий класс бессемянности у некоторых сортов может варьировать. Сорт Кишмиш Согдиана стабильно проявляет 1 класс бессемянности (табл. 13). При этом сорт имеет достаточно крупную ягоду, что особо значимо для сортов с высоким классом бессемянности. Средняя масса одного рудимента за 4 года наблюдений составила 1,9 мг. Оценка массы рудиментов проведена после дегидратации зачатков семян в сушильном шкафу до неизменяемой массы.

Таблица 13 – Характеристика ягод сорта Кишмиш Согдиана (Анапская ампелографическая коллекция, 2019-2022 гг.)

Сорт	Средняя масса ягоды, г.					Средняя масса рудиментов в ягоде (сухой остаток), мг.				
	2019	2020	2021	2022	Среднее	2019	2020	2021	2022	Среднее
Кишмиш Согдиана	3,1	2,6	1,7	4,0	2,9	0,0	1,9	0,1	4,9	1,7

В 2022 году **выделена в элиту** гибридная форма винограда Тана 31, полученная от скрещивания сортов Сацимлер x Луминица.

Срок созревания урожая Тана 31 – средний. Средняя масса грозди 200-300 г и более. Гроздь крылатая, средней плотности, без горошения. Ягоды средней величины, округлые, черные или темно-синие. Рост кустов сильный. Урожай с куста в среднем 7,2 кг в условиях Анапского района. Сахаристость сока ягод 21,4 г/100 см³ при титруемой кислотности 6,8 г/дм³. Листья средние, округлые, пятилопастные. Черешковая выемка открытая. Опушение на нижней части листа очень густое, щетинисто-паутинистое (рис. 28). Форма выделяется повышенной устойчивостью к болезням и морозу, дегустационная оценка вин из урожая формы – 7,6 – 8,0 баллов (табл. 14).



Рисунок 28 – Урожай элитной формы Тана 31

Таблица 14 – Результаты органолептического анализа виноматериала из гибридной формы Тана 31 (среднее 2016-2019 гг.)

Образец	Органолептическая характеристика	Средний балл
Тана 31	Цвет красный или рубиновый с малиновым оттенком, прозрачный. Аромат ягодный, с оттенками вишни, с цветочными оттенками. Вкус полный, умеренно свежий, гармоничный, танинный.	7,7

В условиях 2022 года на вегетационном участке проведена оценка полевой устойчивости при полном отсутствии системы защиты растений (табл. 15). Эпифитотийного развития болезней не наблюдалось. 1 балл поражения (по пятибалльной шкале) соответствует очень высокой степени устойчивости.

Таблица 15 – Оценка полевой устойчивости сортов винограда селекции СКФНЦСВВ к болезням, вегетационная площадка, Краснодар, 26.07.2022 г.

Заболевание	Возбудитель	Оценка поражаемости		
		P, %	R, %	в баллах
Тана 31				
Краснуха	<i>Pseudopeziza tracheiphila</i>	0	0	1
Милдью	<i>Plasmopara viticola</i>	1,0	0,2	1
Оидиум	<i>Erysiphe necator</i>	0	0	1
Эриноз	<i>Colomerus vitis</i>	2,0	0,4	1
Примечание: P – распространение болезни; R – развитие болезни				

Высокий уровень устойчивости к основным патогенам, выявленный по результатам в 2022 году на естественном инфекционном фоне свидетельствует о перспективности данной элитной формы как устойчивой к биотическим стресс-факторам среды и повышает ее ценность для дальнейшего селекционного использования.

1.3.4 Формирование базы данных фенотипических характеристик сортоформ и гибридов яблони, позволяющей оптимизировать алгоритм отбора форм, наиболее ценных для селекции

В настоящее время в связи с необходимостью решения проблемы снижения зависимости российских сельхозпроизводителей от поставок импортного посадочного материала плодовых культур и увеличения доли отечественного высококачественного посадочного материала в целях импортозамещения необходимо ускорение процесса селекции с использованием информационных технологий.

Возможность получения высококачественной плодовой продукции обусловлена оптимизацией существующего сортимента на основе подбора ограниченного числа высокоценных сортов яблони с коммерчески привлекательными плодами, улучшенных вкусовых достоинств. К важной составляющей показателей качества плодов яблони следует отнести и ценный биохимический состав. Для ускоренного отбора наиболее перспективного селекционного материала сформирована «База данных фенотипических характеристик гибридов яблони, позволяющих оптимизировать алгоритм отбора форм, наиболее ценных для селекции».

Разработанная база данных (далее БД) гибридных форм яблони включает два раздела:

- 1) общие данные: семейство, род, вид;
- 2) комплекс биохимических и морфологических признаков, характеризующих показатели качества и коммерческой привлекательности плодов.

В разработанную в ходе выполнения проекта БД вошли признаки, характеризующие:

– биохимический состав плодов: содержание растворимых сухих веществ (%), сумма сахаров (%), кислотность (%), сахаро-кислотный индекс, витамин С (мг/100 г) и витамин Р (мг/100 г);

– морфологическую оценку плодов: размер (очень мелкий, от очень мелкого до мелкого, мелкий, от мелкого до среднего, среднего размера, от среднего до крупного, крупный, от крупного до очень крупного, очень крупный), высота (низкий, средней высоты, высокий), диаметр (маленький, среднего диаметра, большой), форма (цилиндрический с перехватом, конический, яйцевидный, цилиндрический, эллипсоидный, шаровидный, приплюснутый шаровидный), окраска.

В разработанную БД нами включены 26 гибридных форм, обладающих иммунитетом или высокой полевой устойчивостью к парше, полученных методами отдаленной гибридизации и усовершенствованным методом полиплоидии.

Биохимические показатели качества плодов яблони представлены в таблице 16.

Содержание растворимых сухих веществ в плодах варьировало в пределах от 11,6 % (Союз – контроль) до 17,0 % (44-30-50). Выделены формы яблони с высоким содержанием в плодах растворимых сухих веществ: раннего срока созревания – 44-24-39-С и 44-24-25-В (14,0-15,6 %) и позднего срока созревания – 12/1-21-7, 44-30-50, 44-24-48-Ю и 44-24-48-С (15,0–17,0 %).

Содержание сумма сахаров в плодах варьировало в пределах 8,1–10,9 % среди сортов и форм летнего срока созревания и 8,8–11,9 % среди осеннего и зимнего сроков созревания. Высокие показатели отмечены у летних форм: 12/3-21-8 (9,7 %), 44-24-39-С (9,8 %), осенних и зимних – 12/1-21-48 (10,4 %), 12/1-21-7 (10,5 %), 44-24-25-В (10,9 %), 44-30-50 (11,9 %) и др.

Содержания витамина С в плодах сортов и форм яблони отмечено в пределах от 3,2 мг/100 г (12/2-21-4) до 13,2 мг/100 г (44-24-20-В).

Наименьшее количество витамина Р отмечено у форм 12/2-20-75 (23,0 мг/100 г), 12/2-20-19 и 12/1-21-7 (35,4 мг/100 г); наибольшее количество – у 12/1-21-79, 44-24-37-В, 44-24-25-В, 12/2-21-72, 44-24-20-В, 44-29-35 и др. (94,8-136,2 мг/100 г).

Таблица 16 – Биохимические показатели качества плодов яблони, среднее за 2020–2022 гг.

Сорта	раств. сухие в-ва, %	сумма сахаров %	кислотность, %	с/к инд	вит. С, мг/100г	вит. Р, мг/100г
Летнего срока созревания						
12/2-20-54	12,3	8,6	0,40	21,5	9,7	57,1
12/1-21-79	12,8	9,0	0,53	16,9	7,0	94,8
12/2-21-4	11,8	8,3	0,73	11,3	3,2	57,1
12/2-21-76	13,0	9,1	0,27	33,7	3,5	79,0
12/3-21-8	13,9	9,7	0,31	31,4	3,6	56,0
44-24-39-С	14,0	9,8	0,59	16,6	5,4	88,6
44-24-33-ЮЗ	12,5	8,8	0,33	26,5	7,9	88,8
44-24-37-В	13,3	9,3	0,59	15,8	5,3	106,0
44-24-25-В	15,6	10,9	0,55	19,9	7,9	103,0
Союз (к)	11,6	8,1	0,46	17,7	4,8	84,4
НСР 05	0,65	0,53	0,31	2,18	1,00	3,22
Осеннего и зимнего сроков созревания						
12/2-20-26	14,6	10,2	0,42	24,3	6,0	79,0
12/2-20-75	13,3	9,3	0,71	13,1	6,1	23,0
12/1-21-7	15,0	10,5	0,36	29,2	4,0	35,4
12/1-21-48	14,9	10,4	0,27	38,6	4,4	90,6
12/2-21-72	14,3	10,0	0,23	43,5	6,0	100,8
12/3-21-28	14,0	9,8	0,68	14,4	4,4	48,0
44-24-49-Ю	14,3	10,0	0,63	15,9	5,7	40,2
44-24-20-В	13,8	9,7	0,69	14,0	13,2	136,2
44-24-21-Ю	14,0	9,8	0,71	13,8	8,8	132,4
44-24-42-В	14,8	10,4	1,13	9,2	10,5	54,0
44-29-35	13,4	9,8	0,55	17,0	5,5	126,4
44-30-50	17,0	11,9	0,75	15,9	9,6	127,0
44-24-48-Ю	15,0	10,5	0,73	14,3	12,3	86,0
44-24-48-С	16,2	11,3	0,53	21,4	11,4	41,2
44-24-21-С	14,5	10,2	0,62	16,4	7,0	41,9
44-24-48-В	14,2	9,9	0,63	15,8	12,3	41,8
12/2-20-19	14,4	10,1	0,58	17,4	10,6	35,4
Ренет кубанский (к)	12,5	8,8	0,72	12,2	6,3	60,4
НСР 05	0,51	0,41	0,22	1,51	0,87	3,11

Выделены формы раннего срока созревания: 12/2-20-54 с высоким содержанием витамина С (9,7 мг/100 г), 12/1-21-79 с высоким содержанием витамина Р (94,8 мг/100 г), 12/3-21-8, 12/2-21-76 по сахаро-кислотному индексу (31,4-33,7) (рис. 29).



Рисунок 29 – Гибридная форма 12/2-20-54 (Айдаред × Балсгард 0247Е)

Выделены формы позднего срока созревания: 12/1-21-7 и 12/1-21-48 с высоким содержанием суммы сухих веществ, суммы сахаров, 12/2-20-19 с высоким содержанием витамина С (10,6 мг/100 г) (рис. 30).



Рисунок 30 – Гибридная форма 12/2-20-19 (Корей × Прима)

По комплексу биохимических показателей выделены формы, созданные усовершенствованным методом полиплоидии: позднего срока созревания – 44-24-48-с (Прима × Уэлси тетраплоидный) с высоким содержанием суммы сухих веществ, суммы сахаров, витамина С и по сахаро-кислотному индексу; раннего срока созревания – 12/3-21-8 (Айдаред × Балсгард 0247Е) с высоким содержанием суммы сухих веществ и суммы сахаров и по сахаро-кислотному индексу (рис. 31).



Рисунок 31 – Гибридная форма 12/3-21-8 (Айдаред × Балсгард 0247Е)

Оценка технических показателей плодов яблони позволила выделить наиболее крупноплодные формы: 12/2-20-54, 12/2-21-4, 12/1-21-48, 12/3-21-28 с массой плодов 209,8-280,7 г (рис. 32, 33, табл. 17).



Рисунок 32 – Гибридная форма 12/1-21-48 (Айдаред × Балсгард 0247Е)



Рисунок 33 – Гибридная форма 12/3-21-28 (Айдаред × Балсгард 0247Е)

Таблица 17 – Технические показатели плодов яблони, среднее за 2020–2022 гг.

Сорт	Масса, г	Высота, мм	Диаметр, мм	Индекс формы	Форма
Летнего срока созревания					
12/2-20-54	209,8	72,2	77,4	0,93	продолговатая
12/1-21-79	198,7	65,3	71,4	0,91	продолговатая
12/2-21-4	230,4	75,0	85,6	0,87	округлая
12/2-21-76	114,2	52,9	65,2	0,81	округлая
12/3-21-8	138,02	56,0	69,5	0,81	округлая
44-24-39-С	104,0	51,5	63,0	0,82	округлая
44-24-33-ЮЗ	96,0	49,9	64,2	0,78	плоскоокруглая
44-24-37-В	106,0	56,0	62,1	0,90	продолговатая
44-24-25-В	90,0	56,6	63,0	0,90	продолговатая
Союз (к)	246,2	71,5	83,2	0,86	округлая
НСР 05	5,64	2,24	2,19	0,14	-
Осеннего и зимнего сроков созревания					
12/2-20-19	181,9	67,0	73,3	0,91	продолговатая
12/2-20-26	162,3	67,7	70,6	0,96	продолговатая
12/2-20-75	168,5	68,8	70,1	0,98	продолговатая
12/1-21-7	100,7	46,2	64,6	0,72	плоскоокруглая
12/1-21-48	280,7	77,5	88,8	0,87	округлая
12/2-21-72	126,4	59,0	65,8	0,89	округлая
12/3-21-28	210,4	68,8	77,3	0,89	округлая
44-24-20-В	154,0	57,2	76,3	0,75	плоскоокруглая
44-24-21-Ю	145,0	60,0	72,1	0,83	округлая
44-24-42-В	175,0	63,4	78,0	0,81	округлая
44-29-35	154,0	65,0	78,4	0,83	округлая
44-30-50	130,0	59,1	70,2	0,84	округлая
44-24-48-Ю	190,0	63,1	76,3	0,83	округлая
44-24-49-Ю	134,0	61,0	68,3	0,89	округлая
44-24-48-С	152,0	58,3	73,1	0,80	плоскоокруглая
44-24-21-С	150,0	58,2	71,0	0,82	округлая
44-24-48-В	183,0	61,4	78,0	0,79	плоскоокруглая
Ренет кубанский (к)	183,7	69,5	81,5	0,85	округлая
НСР 05	3,31	1,36	1,30	1,13	-

Таким образом, выполненная в ходе исследований оценка по комплексу фенотипических признаков качественных показателей плодов устойчивого и иммунного к парше селекционного материала и формирование на ее основе БД позволит оптимизировать важнейшие этапы селекционного процесса. Выделенные наиболее перспективные гибридные формы: 12/1-21-48, 12/3-21-8, 12/3-21-28 и др., вошедшие в БД, могут быть использованы в дальнейшем в различных селекционных программах для создания современных отечественных сортов яблони, позволяющих получать продукцию:

- с уникальными и высокоценными качествами для усиления коммерческой привлекательности на потребительском рынке (удлиненная или кандилевидная форма; темная, интенсивная окраска; особенный аромат и вкус; длительная лежкость; пригодность для переработки и т.д.);
- с сочетанием повышенных параметров экологической безопасности, чистоты и качества;
- способствующую увеличению рентабельности отрасли за счет сокращения затрат на проведение защитных мероприятий и увеличения выхода высокотоварных плодов.

1.3.5 Разработка метода выделения генотипов рода *Prunus* L. с полигенным типом устойчивости к коккомикозу

Несмотря на значимость вишни и черешни в современном плодоводстве, площадей под ними в России недостаточно для полномасштабного обеспечения населения этими фруктами. К тому же имеющиеся насаждения подвергаются негативному воздействию биотических и абиотических факторов. Болезни и вредители наносят огромный ущерб садам, значительно уменьшая урожайность культур. Одной из причин снижения урожайности и гибели растений является развитие вредоносного грибного заболевания – коккомикоза (возбудитель – *Coccomyces hiemalis* Higgins, *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx). Болезнь поражает листья, плоды и побеги растений, вызывает преждевременный листопад, что ведет к ослаблению растений перед зимовкой и гибели при низких отрицательных температурах. В питомниководстве патоген поражает подвои, которые не вызревают для проведения прививок.

Наиболее экологичный путь борьбы с заболеванием – поиск, создание и расширение генетического разнообразия устойчивого к возбудителю сортимента черешни и вишни. Начальный этап создания устойчивых сортов – выявление источников устойчивости. Несмотря на обширную литературу, посвященную скринингу культур по устойчивости к болезни, актуальность поиска новых резистентных форм со временем все возрастает – прежде всего,

вследствие утраты эффективности выделенных ранее источников устойчивости. Выделение устойчивых образцов невозможно без знания биологии возбудителя болезни, постоянного мониторинга внутривидовой дифференциации патогена, разработки и совершенствования методов изучения устойчивости.

Многолетний анализ как литературных данных, так и собственных исследований показывает, что формы, выделяемые без учета вышеперечисленных исследований в Краснодарском крае и в других регионах показывают значительную восприимчивость к болезни при эпифитотийном развитии болезни. И такие проблемы существуют по всей стране, сводя на нет исследования большого количества научных коллективов, состоящих из 5-10 человек. Поэтому необходимы методы, которые работают более стабильно и точно определяют степень устойчивости генотипов к этой широко распространенной болезни.

На данный момент очень остро стоит вопрос по созданию устойчивых к коккомикозу сортов и гибридов вишни и черешни. При выделении форм черешни и вишни для использования их в производстве и для селекционных и генетических исследований по устойчивости к возбудителю коккомикоза следует учитывать все типы устойчивости культур к заболеванию для создания форм с длительной устойчивостью в пространстве и времени к патогену.

Проведенные многолетние исследования коллекции ФГБНУ СКФНЦСВВ, созданной в результате направленной селекции на иммунитет к коккомикозу, позволили выделить образцы рода *Prunus* L. с различными типами устойчивости к болезни (*Cylindrosporium hiemale* (Higg.)). Выявлены образцы не поражаемые болезнью и генотипы с высокой эффективностью устойчивости от 87,3 % до 98,5 %. Последние так же представляют большой интерес, так как, по многочисленным исследованиям горизонтальная (расонеспецифическая) устойчивость является наиболее

долговременной и нахождение параметров её определяющих одно из важных направлений при выделении хозяйственно-ценных генотипов растений.

Для более широкого охвата популяций коккомикоза и разработки более точных методов оценки были проведены многократные по времени и по местам сборы листьев, пораженных *C. hiemalis* в садах в опытных хозяйствах СКФНЦСВВ (Усть-Лабинский район; Краснодар; Горячий Ключ). Для получения клонов патогена при изучении эффективности устойчивости использовали изоляты, выращенные на листьях. С этой целью с зараженного листа вырезали участок с одной пустулой и помещали в чашку Петри на фильтровальную бумагу. Через 2 ч скальпелем снимали конидии, переносили в пробирку с водой и тщательно перемешивали. Полученной суспензией инокулировали листья восприимчивого сорта Любская, разложенные в чашки Петри на смоченную водой вату. Размноженными таким образом клонами заражали выделенные устойчивые формы при изучении эффективности устойчивости образцов. При заражении использовали диски-высечки листьев, которые раскладывали в чашки Петри на смоченную водой вату. Диски заражали суспензией спор гриба с помощью пульверизатора. Концентрацию спор подсчитывали в камере Горяева из расчета 10^4 спор в 1 мл. После инокуляции чашки Петри на 24 ч помещали в темноту при температуре 18 °С и затем переносили в камеру (14-16 ч фотопериод, температура 20-21 °С, освещенность 6-7 тыс. лк.). Развитие болезни наблюдали через 9-11 дней. Устойчивость оценивали по шкале: 0 – поражение отсутствует; 1 – поражено до 10 % поверхности высечки листа, пятна с едва заметным спороношением; 2 – поражено до 25 % поверхности высечки листа, пятна с более активным спороношением; 3 – поражено до 50 % поверхности высечки листа, пятна с активным спороношением, наблюдается единичное пожелтение; 4 – поражено более 50 % поверхности высечки листа, пятна сливающиеся, обильно спороносящие; лист желтеет. Поражение до 1 балла соответствует реакции устойчивости (R), 2-4 – восприимчивости (S).

Горизонтальную (расонеспецифическую) устойчивость образцов изучали по показателям: процент поражения листа, количество пустул на 1 см² листа. В анализ были взяты образцы с балом поражения до 1 балла. Была дана их характеристика по максимальному баллу поражения, среднему количеству пустул на 1 см² листа, по индексу устойчивости, и генеративной активности гриба.

Анализ образцов на горизонтальную (расонеспецифическую) устойчивость позволил выявить колебания в поражении и спорообразовании на различных сортах, что связано с погодными условиями и генетическими особенностями сортов. Но многочисленные исследования позволили провести классификацию по предложенным показателям – критериям полевой устойчивости (табл 18).

Таблица 18 – Разделение генотипов рода *Prunus* L. по уровню полигенной устойчивости к коккомикозу

Степень устойчивости сортов (СУС)	Индекс устойчивости (ИУ)	Генеративная активность гриба (ГАГ)	Среднее количество пустул на 1 см ² листа (СКП)
Восприимчивый сорт (ВС)	более 10 ⁵	1+10 ⁴ -10 ⁵	более 17
Слабая неспецифическая устойчивость (СНУ)	1+10 ⁴ -10 ⁵	1+10 ³ -10 ⁴	более 10
Умеренная неспецифическая устойчивость (УНУ)	1+10 ³ -10 ⁴	1+10 ² -10 ³	5-10
Высокая неспецифическая устойчивость (ВНУ)	1+10 ² -10 ³	1+10 ²	1+5
Очень высокая неспецифическая устойчивость (ОВНУ)	0-10 ²	0-10	0-1

Выявленные критерии позволяют выделять устойчивые формы черешни, вишни, подвоев и сакур рода *Prunus L.* В результате исследований выделены формы вишня Южанка и ряд гибридов (6/4 К, БИ 43 П, 6/8К, БИ 43 I и др.), которые представляют интерес для использования их как и подвоев, а так же как доноров и источников устойчивости к коккомикозу.

По результатам выполненных исследований разработан метод выделения генотипов рода *Prunus L.* с полигенным типом устойчивости к коккомикозу, позволяющий эффективно и при минимизации финансовых издержек на отбор образцов, обладающих высоким уровнем устойчивости к данному патогену (СТО 00668034-141-2022).

При использовании разработанной методики:

- значительно повышается точность выполнения исследований по выделению устойчивых к коккомикозу форм на 30-100% (улучшение качества продукции);

- отмечается сокращение времени на оценку устойчивости образцов к коккомикозу в среднем на 3 года (ресурсоэнергосбережение);

- идет сокращение трудовых затрат в 3 раза (ресурсоэнергосбережение);

- сокращение материальных и трудовых затрат в среднем на 620 руб./образец или в 4,2 раза (технологическо-экономические эффекты и эффективность).

При использовании устойчивых к коккомикозу форм наблюдается:

- повышение продуктивного потенциала агроценоза и уровня его реализации за счет биологической эффективности фунгицидов нехимического класса для контроля коккомикоза, которая составляет 40-100 % и увеличение урожайности черешни и вишни на 30 %.

- улучшение качества продукции за счет повышения стандартности саженцев вишни, черешни до 95 %, повышения стандартности плодов до 90 %.

- ресурсоэнергосбережение за счет снижения издержек на защитные мероприятия на 15 %.

– природоохранность и экологическая безопасность (экологическая эффективность) на основе снижения токсичной нагрузки на 15 %, за счет использования пестицидов нехимического класса.

– технолого-экономические эффекты и эффективность: дополнительная прибыль от продаж – 329,6 тыс. руб./га, увеличение рентабельности производства – на 23,1 п.п.

1.4 Выводы

В результате выполненных исследований:

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

– сформирована база данных признаков качественных показателей плодов устойчивого и иммунного к парше селекционного материала, которая позволит оптимизировать важнейшие этапы селекционного процесса за счет ускорения отбора наиболее ценных форм;

– переданы на государственное сортоиспытание 2 сорта плодовых культур: 1 – иммунный к парше (ген *Rvib*) сорт яблони Гайто Газданов зимнего срока созревания; 2 – скороплодный, устойчивый к коккомикозу сорт вишни Южанка, обладающий высоким потенциалом продуктивности. Полученные отечественные сорта 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;

– шесть элитных форм, в том числе элитная форма яблони 12/3-21-23 (из гибридной семьи Айдаред × Балсгард 0247E), обладающая иммунитетом к парше; элитная форма груши 4-8-69 (Вильямс х Бере Арданпон), выделенная по комплексу хозяйственно-ценных признаков; элитная форма черешни –

12-14-23; вишни – 17-3-29 и сливы 17-1-52, а также элитная форма винограда Тана 31. Выделенные элитные формы являются кандидатами в будущие сорта отечественной селекции, совмещающие в своем генотипе комплекс хозяйственно-ценных признаков и не уступающие по ряду признаков зарубежным аналогам;

– выделено три донора хозяйственно-ценных признаков винограда, в том числе донор гена устойчивости к милдью *Rpv3* – Мускат летний, гена устойчивости к милдью *Rpv12* – Восторг идеальный, генов устойчивости к оидиуму *Ren3*, *Ren9* – Памяти Смирнова;

– выделено восемь источников хозяйственно ценных признаков, в том числе: яблони – 12/3-21-28 (источник ярко-красной окраски и крупноплодности плодов); груши – Вильямс (по признаку компактности кроны и силы роста); черешни – сорт Черные глаза (источник ценного биохимического состава плодов), а также высокоустойчивый к засухоустойчивости сорт Космическая (источник данного признака), имеющий также высокий уровень продуктивности в условиях дефицита влаги и высоких летних температур; вишни – сорт Застенчивая (источник ценного биохимического состава плодов); сливы домашней – сорт Август Делайт (источник зимостойкости); айвы – сорт Кубанская (источник высокого качества продуктов переработки); винограда – сорт Кишмиш Согдиана (источник признака бессемянности). Выделенные источники и доноры ценных признаков рекомендуются для включения в дальнейший селекционный процесс по созданию сортов нового поколения с заданными признаками;

– разработан метод выделения генотипов рода *Prunus* L. с полигенным типом устойчивости к коккомикозу, позволяющий эффективно и при минимизации финансовых издержек обирать образцы, обладающие высоким уровнем устойчивости к данному патогену (Приложение Б).

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

В современных селекционно-генетических исследованиях важное одна из ключевых ролей принадлежит методам ускоренной оценки и идентификации наиболее ценных образцов, обладающих комплексом хозяйственно-ценных признаков. Развитие молекулярно-генетики обусловило появление технологии ДНК-маркерного анализа, позволяющего напрямую оценивать геномный полиморфизм, а не через его фенотипические проявления.

ДНК-маркерные методы востребованы как для решения селекционных задач – использование технологии маркер-опосредованного отбора (MAS-marker-assisted selection), где они наиболее ценны в селекции по признакам, фенотипическая оценка которых является сложной процедурой, и при создании сортов, несущих одновременно несколько целевых селекционно-ценных генов [32], так и изучения генетического разнообразия генофонда растений.

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

- выявление нового генетического разнообразия для последующего пополнения коллекций;
- анализ степени генетического родства образцов коллекции, выявление генетических дистанций между изучаемыми генотипами;

- формирование коллекций, включая создание так называемых стержневых коллекций (кор-коллекций) контроль генетической стабильности растений, размножаемых *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 можно выделить локуспецифичные и мультилокусные ДНК-маркеры. Из локуспецифичных одними из наиболее востребованных являются микросателлитные ДНК-маркеры, которые кодоминантны, распределены по всему геному, обладают значительной аллельной изменчивостью. Микросателлитные генотипирование может быть автоматизировано, при использовании соответствующего лабораторного оборудования (генетические анализаторы типа ABIprism3130, Нанофор 05). Данный тип ДНК-маркеров является одним из наиболее используемых в исследованиях генетического разнообразия генофонда и паспортизации сортов плодовых культур и винограда [33,34]. Из мультилокусных можно выделить ISSR-маркеры, основанные на использовании праймеров, комплементарных непосредственно к микросателлитной последовательности, IRAP-маркеры, позволяющие анализировать участками генома между LTR-последовательностями ретротранспозонов [35, 36]. Перспективными мультилокусными ДНК-маркерами также являются относительно недавно разработанный тип маркеров - SCoT (Start Codon Targeted), основанный использовании праймера имеющего комплементарность к короткому консервативному региону, фланкирующему 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. Указанные типы мультилокусных ДНК-маркеров обладают высоким уровнем воспроизводимости и позволяют получать достоверные данные о степени генетического родства изученных образцов и проводить их пааспортизацию, а также осуществлять идентификацию генотипов (сортов, гибридов и т.д). 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. Основная функция в регуляции процесса опыления у яблони принадлежит гену самонесовместимости (S-ген). Наличие у двух разных сортов одинаковых наборов аллелей S-гена обуславливает их несовместимость при опылении. [39].

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 аллельных комбинаций S-гена у образцов генресурсов яблони в странах с развитым возделыванием данной культуры. 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.

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 для ДНК-паспортизации и идентификации сортов, а также анализ генетического сходства генотипов (сортов, элитных форм, гибридов) и молекулярно-генетическую идентификацию генов хозяйственно-ценных признаков. В связи с этим, в отчетном 2022 году нами были поставлены следующие задачи:

- выполнить апробацию локуспецифичных и мультилокусных ДНК-маркеров и определить наиболее перспективные для выполнения генотипирования плодовых культур;
- разработать и усовершенствовать методы ДНК-маркерной паспортизации образцов плодовых культур;
- с использованием ДНК-маркерного анализа выполнить генотипирование сортов и сортообразцов плодовых культур и винограда и установить генетические взаимосвязи между изученными генотипами, а также получить ДНК-фингерпринты изученных генотипов;
- 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 НTR-220-Е, мешалка магнитная С-MAG HS 7, ламинарные боксы С-1,2 (код 110.120), рН-метры рН-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 2023 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×ЦТАБ буфером, содержащим 2 % ЦТАБ (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-НСI, 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-НСI, 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 S-гена яблони, SSR-маркеры яблони, груши, черешни, абрикоса, а также мультилокусные ДНК маркеры ScOT, CDDP, ISSR [33, 35, 37, 38, 40-46].

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 M. Nei и W. Li (1979) [47]. Кластерный анализ выполнен невзвешенным попарно-групповым методом на основе арифметических средних (UPGMA) с использованием программ PAST version 2.17c, 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 сортов черешни на основе использования микросателлитных ДНК-маркеров

В рамках выполнения работ, направленных на разработку методов ДНК-паспортизации сортов плодовых культур в отчетный период были выполнены исследования по разработке метода мультиплексной ДНК-паспортизации сортов черешни на основе использования микросателлитных ДНК-маркеров. Для этих целей, на основе данных, представленных в научной литературе, были отобраны полиморфные микросателлитные ДНК-маркеры, которые ранее использовались для генотипирования генофонда черешни. В связи с тем,

что задачей исследования являлась разработка мультиплексного метода микросателлитной ДНК-паспортизации, предполагающая постановку анализа одновременно по нескольким ДНК-маркерам, наряду с уровнем полиморфизма ДНК-маркеров, учитывались такие параметры, как температура отжига праймеров и диапазон размеров амплифицируемых фрагментов. Учитывая уровень полиморфизма отобранных SSR-маркеров, а также тот факт, что в научных работах, направленных на изучение генетического разнообразия и ДНК-паспортизацию коллекций сортов, небольших по объему, число используемых ДНК-маркеров варьирует от шести до 10-12 была поставлена задача разработать мультиплексный ДНК-маркерный набор, в который входит шесть микросателлитных маркеров.

В результате были отобраны шесть SSR-маркеров, которые представлены в таблице 19. Известно, что для анализа размеров продуктов амплификации по SSR-маркерам наиболее перспективным является использование генетических анализаторов типа ABIprism 3130 или Нанофор 05, позволяющих определять размер амплифицированных последовательностей с точностью до одной пары нуклеотидов. Данные приборы имеют 5 оптических каналов детекции, что дает возможность использовать одновременно четыре разных типа флуоресцентных метки для праймерных пар + 1 канал для маркера молекулярной массы ДНК. С данного факта, а также того, что в разрабатываемый мультиплексный набор включено шесть SSR-маркеров, часть маркеров могут должны иметь одинаковую флуоресцентную метку. Как видно из таблицы 19, для ДНК-маркеров EMPas12 и UCPCN12 использовали одинаковый флуорохром R6G, а для маркеров EMPa018 и UCPCN17 – FAM. С учетом того, что диапазоны размеров амплифицируемых продуктов в данным парам ДНК-маркеров не перекрываются, это позволяет использовать их в мультиплексном наборе в такой конфигурации.

Таблица 19 – Мультиплексный набор SSR-маркеров для генотипирования черешни

SSR-маркер	Флюорофор	Диапазон амплифицируемых фрагментов
EMPa004	ROX	182-192
EMPas12	R6G	139-149
EMPa017	TAMRA	243-245
EMPa018	FAM	106-108
UCPCH12	R6G	175-197
UCPCH17	FAM	188-190

На следующем этапе были определены оптимальные условия ПЦР (в части температурно-временного режима амплификации), при которых для всех ДНК-маркеров можно было получить приемлемый уровень амплификации. На основании экспериментальной апробации была рекомендована следующая программ ПЦР: первичная денатурация - 94 °C – 5 мин, 34 цикла (94 °C – 30 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 30 с), 72 °C – 10 мин. На данном этапе постановку ПЦР проводили по отдельным ДНК-маркерам – не в мультиплексном наборе.

На следующем этапе задачей являлся поиск оптимальных концентраций компонентов реакционной смеси для проведения ПЦР анализа в мультиплексном формате. На первом этапе использовали следующие параметры: общий объеме 25 мкл, состав ПЦР-смеси следующий: 2,5 мкл 10x ПЦР-буфер, каждого праймера по 0,58 пкмоль/мкл реакционной смеси, dNTP – по 100 mM каждого, Taq ДНК-полимераза – 1 е.а, ДНК – около 2 нг.

При равной концентрации праймерных пар (0,58 пкмоль/мкл) результаты амплификации мультиплексной ПЦР не позволили достаточно четко различить использованные маркеры из-за слишком большой разницы в интенсивности пиков, а также по причине затруднительной визуализации пиков по маркерам EMPa018 и UCPCH17 на электрофореграмме (рис. 34).

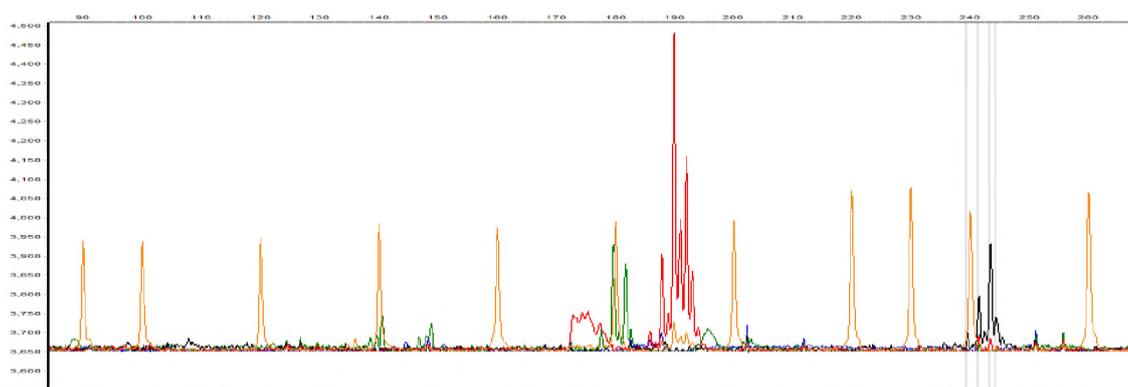


Рисунок 34 – Предварительная оценка информативности результатов мультиплексного анализа

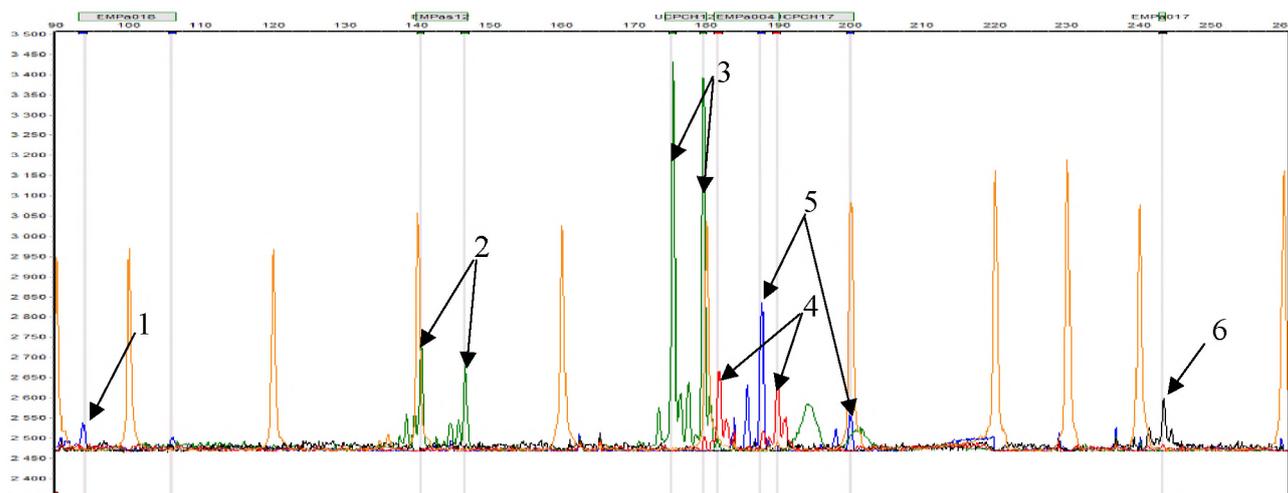
Как видно из рисунка 34 визуализируется 4 пика на электрофореграмме (два зеленых пика, один красный и черный). Желтым цветом окрашены фрагменты маркера молекулярной массы ДНК.

Для выравнивания высот пиков и интенсивности визуализации отдельных продуктов ПЦР, были апробированы различные концентрации праймеров целевых ДНК-маркеров в реакционной смеси (табл. 20).

Таблица 20 – Варианты концентраций праймеров

Локус	Флюорофор	Концентрация праймерных пар (пкмоль/мкл) и интенсивность		
		Исходная*	Вариант 1	Вариант 2
EMPa004	ROX	0,58	0,58	0,58
EMPas12	R6G	0,58	0,25	0,25
EMPa017	TAMRA	0,58	2,32	2
EMPa018	FAM	0,58	1,74	1,74
UCPCH12	R6G	0,58	0,2	0,15
UCPCH17	FAM	0,58	0,58	0,58

В варианте №2 удалось получить сопоставимые высоты пиков всех амплифицированных в мультиплексном наборе фрагментов. Результаты фрагментного анализа продуктов реакции приведены на рисунке 35.



Примечания: 1 - EMPa018, 2 - EMPas12, 3 - UCPCH12, 4 - EMPa004, 5 - UCPCH17, 6 - EMPa017

Рисунок 35 – Результаты электрофореза продуктов реакции, полученных с использованием оптимизированных соотношений концентраций праймеров

Как видно из рисунка 35, визуализируются продукты реакции по всем микросателлитным ДНК-маркерам, входящим в мультиплексный набор. Таким образом возможно выполнение ДНК-паспортизации одновременно по шести микросателлитным ДНК-маркерам. При этом наличие гетерозиготности по исследуемым маркерам также возможно. Она выражена в наличии двух пиков на электрофореграмме (SSR-маркеры №2, №3, №4 и №5). Разработанный метод мультиплексной ДНК-паспортизации может быть в дальнейшем эффективно использован для ДНК-паспортизации сортов черешни, а также изучения генетического разнообразия генофонда данной культуры.

2.3.2 Апробация локуспецифичных (SSR) и мультилокусных ДНК-маркеров для генотипирования груши

Яблоня и груша, ценные семечковые плодовые культуры, являются близкородственными видами плодовых растений, входящих в семейство *Rosaceae*. Микросателлитные ДНК-маркеры, обладают кросс воспроизводимостью на разных видах в пределах одного семейства. Поэтому одна из стратегий поиска SSR-маркеров, является апробация 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, применительно к груше в целях отбора новых, перспективных для использования при генотипировании данной культуры.

Для поиска подходящих информативных SSR-маркеров для генотипирования образцов груши, были отобраны восемь нейтральных микросателлитных маркеров, разработанных для генотипирования образцов яблони, которые давали четко различимые продукты амплификации без артефактов и побочных пиков. По результатам выполненных нами ранее исследований, маркеры обладают высоким уровнем полиморфизма по данным генотипирования сортов яблони. Маркеры были объединены в мультиплексы по 4 в соответствии с красителем и ожидаемым размером ампликонов (табл. 21).

Таблица 21 – Отобранные для работы SSR-маркеры

Маркер	Мультиплекс	Флюорофор	Ожидаемые длины фрагментов
CH04e05	I	FAM	176-230
GD100		R6G	223-243
GD96		TAMRA	153-203
CH01h10		ROX	95-119
CH04c07	II	FAM	96-136
CH03d07		R6G	190-231
GD12		TAMRA	157-200
CH02C09		ROX	238-262

Для анализа взяли ДНК 4 сортов груши отечественной селекции – Мальвина, Сувенир, Рассвет и Миф, ранее успешно генотипированные маркерами для груши.

Аmplification проводилась по следующей схеме: 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 °С – начальная денатурация, затем 34 цикла при следующих параметрах: 20 с при 95 °С денатурация, 20 с при 60 °С – отжиг, 30 с при 72 °С – элонгация; этап финальной элонгации – 5 мин при 72 °С.

На начальном этапе апробации ПЦР ставили с каждым праймером отдельно. Было выявлено, что маркеры GD100, GD96 и GD12 – не дают продуктов амплификации на генетическом материале груши – не было выявлено целевых пиков, только димеры праймеров, меченные соответствующими красителями. Остальные маркеры – CH04e05 и CH01h10 из первого мультиплекса и CH04c07, CH03d07 и CH02C09 из второго – давали четко различимые целевые пики без лишних артефактов. Таким образом, амплифицируемые маркеры были объединены в мультиплексы и была проведена мультиплексная ПЦР.

На рисунках 36 и 37 приведены выборочные примеры визуализации пиков мультиплексных наборов на электрофореграмме при проведении фрагментного анализа на генетическом анализаторе Нанофор 05 (результаты приведены в программе GeneMarker V3.0.1).

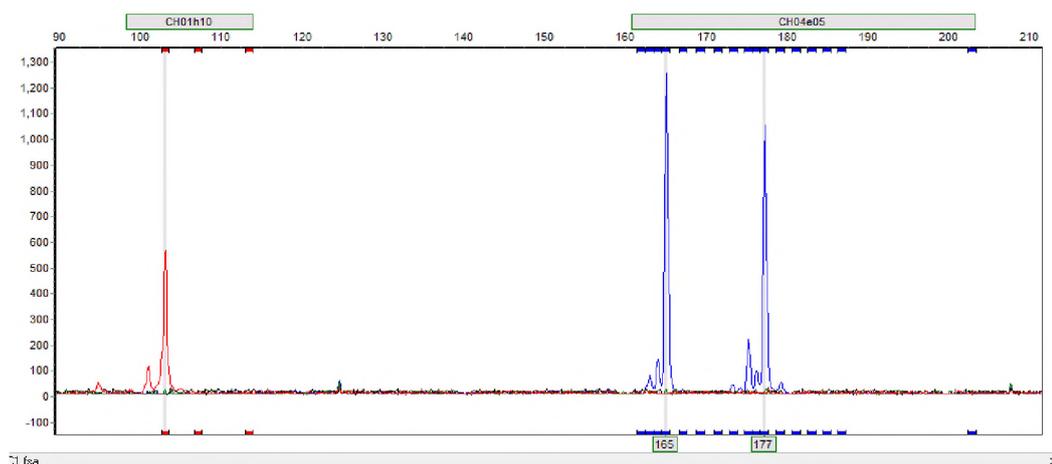


Рисунок 36 – Продукты мультиплексной амплификации маркеров CH01h10 и CH04e05 на ДНК группы

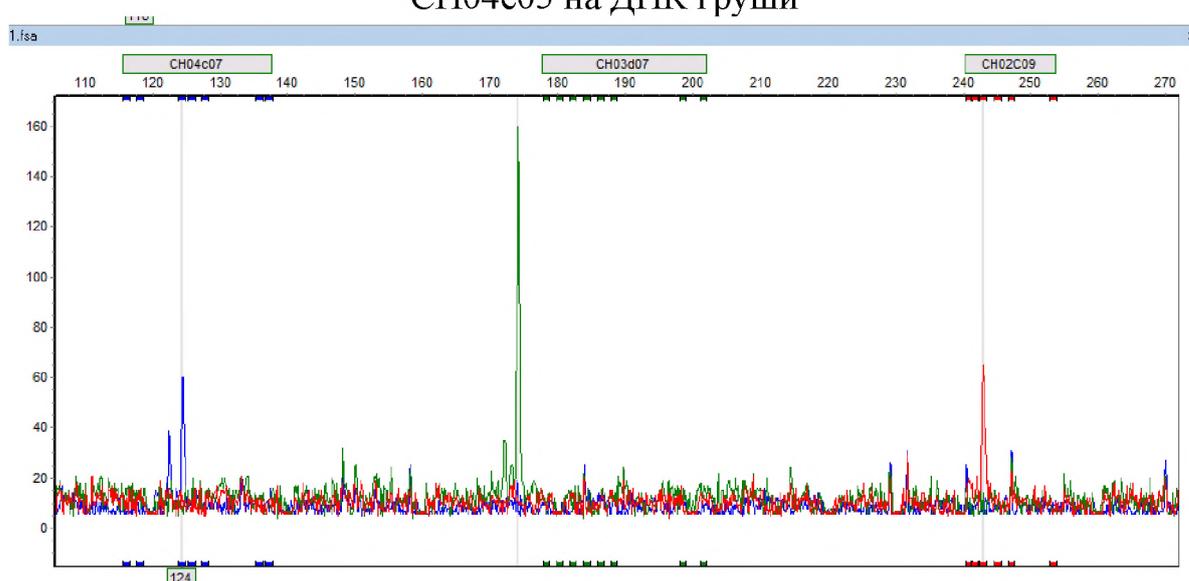


Рисунок 37 – Продукты мультиплексной амплификации маркеров CH04c07, CH03d07 и CH02C09 на ДНК группы

Как видно из полученных фореграмм, маркеры дают легко различимые и сопоставимые по интенсивности пики свечения.

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 22.

Таблица 22 – Интенсивность флуоресценции фрагментов апробированных ДНК-маркеров при разведении продуктов амплификации в 100 раз перед нанесением на генетический анализатор

Маркер	Интенсивность свечения в ОФЕ (относительные единицы флуоресценции)
CH04e05	200
CH01h10	150
CH04c07	60
CH03d07	150
CH02C09	60

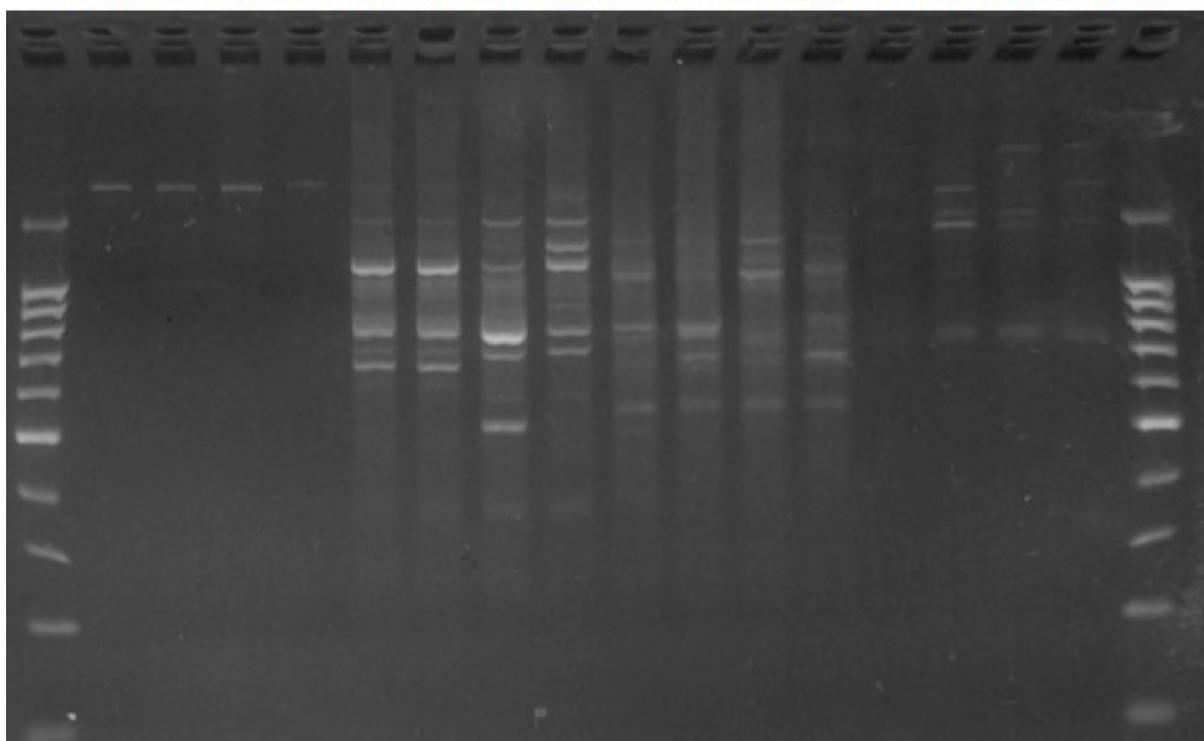
Величина ОФЕ соответствует высоте пика на электрофореграмме и отражает эффективность протекания амплификации с искомыми ДНК-маркерами и зависит от разведения продуктов реакции перед нанесением на анализатор. Значение ОФЕ может быть увеличено путем уменьшения разведения, но основным показателем того, что маркеры могут быть успешно использованы в мультиплексах, является сопоставимость значений.

Как видно из проделанной работы, маркеры, изначально разработанные для типирования генопитов яблони CH04e05, CH01h10, CH04c07, CH03d07 и CH02C09 являются трансферабельными для генотипов груши и могут успешно применяться в паспортизации образцов груши. Маркеры группы GD (GD100, GD12 и GD96) не дают продуктов амплификации на генотипах груши, как в мультиплексной ПЦР, так и при постановке реакции отдельно.

Наряду с апробацией SSR-маркеров для генотипирования груши 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 груши (Люберская, Александр Дульяр, Запорожская, Большая летняя). В апробации генотипов груши были использованы следующие ISSR-маркеры: UBC 807, UBC 808, UBC 810, UBC 811, UBC 813, UBC 815, UBC 817, UBC 818, UBC

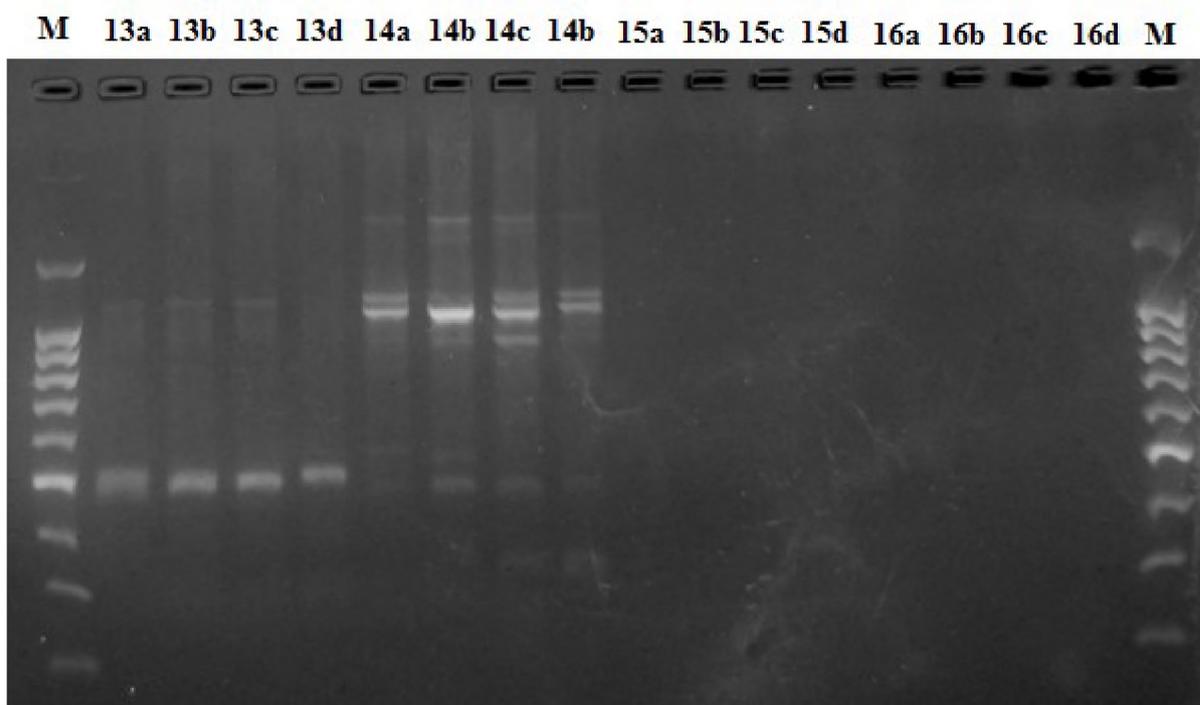
824, UBC 825, UBC 826, UBC 827, UBC 843, UBC 844, UBC 845, UBC 853, UBC 864, UBC 873, ASSR 02, ASSR 15. Результаты представлены на рисунках 38 и 39. Для отбора перспективных маркеров были обозначены следующие требования к ДНК-фингерпринтам (специфического ДНК-профиля характерного для генотипа): Количество амплифицированных ДНК-фрагментов, диапазон выявленных ДНК-фрагментов, качество амплификации ДНК-фрагментов и их полиморфность между сортами. Характеристики использованных в работе маркеров представлены в таблице 23.

М 9a 9b 9c 9d 10a 10b 10c 10d 11a 11b 11c 11d 12a 12b 12c 12d М



Примечания: a - Люберская, b - Александр Дульяр, c - Заторожская, d - Большая летняя

Рисунок 38 – Апробация ISSR маркеров UBC 824 (9), UBC 825 (10), UBC 826 (11), UBC 827 (12) на генотипах груши обыкновенной.



Примечания: *a* - Люберская, *b* - Александр Дульяр, *c* - Запорожская,
d - Большая летняя

Рисунок 39 – Апробация ISSR маркеров UBC 843 (13), UBC 844(14), UBC 845 (15), UBC 853 (16) на генотипах груши обыкновенной

Таблица 23 – Характеристики ISSR-маркеров

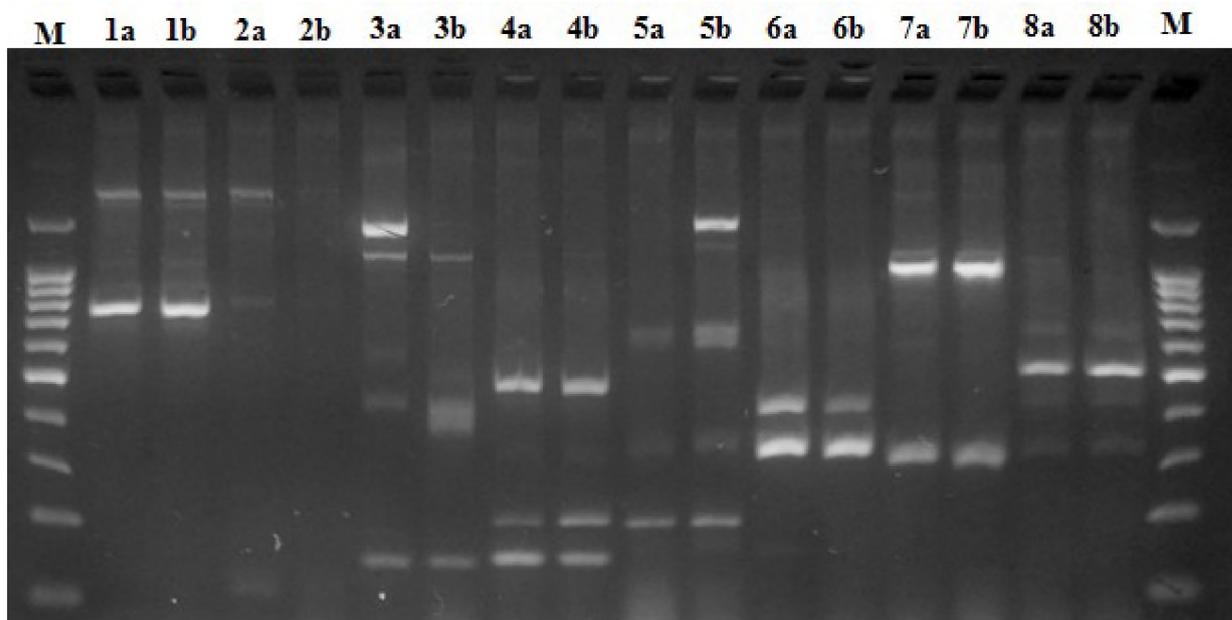
№	ISSR	Количество ДНК-фрагментов	Диапазон распределения ДНК-фрагментов (п.н.)
1	UBC 807	-	-
2	UBC 808	-	-
3	UBC 810	-	-
4	UBC 811	5	1000-500
5	UBC 813	6	1500-450
6	UBC 815	-	-
7	UBC 817	4	1000-850
8	UBC 818	-	-
9	UBC 824	1	2500
10	UBC 825	10	1200-300
11	UBC 826	7	1200-600
12	UBC 827	5	3000-700
13	UBC 843	3	1200-400
14	UBC 844	8	3000-400
15	UBC 845	-	-
16	UBC 853	-	-
17	UBC 864	7	1200-400
18	UBC 873	5	1000-400
19	ASSR 02	1	1200
20	ASSR 15	1	1200

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 маркеров нами были определены маркеры UBC 825, UBC 826, UBC 844. Полученные в работе результаты будут использованы в дальнейшем для проведения мультилокусного генотипирования сортов и селекционных форм груши обыкновенной. Данные, полученные с применением мультилокусных маркеров, будут сочетаться с результатами SSR-генотипирования.

2.3.3 Поиск информативных SCoT ДНК-маркеров для генотипирования яблони домашней и выполнение ДНК-паспортизации сортов на основе их использования

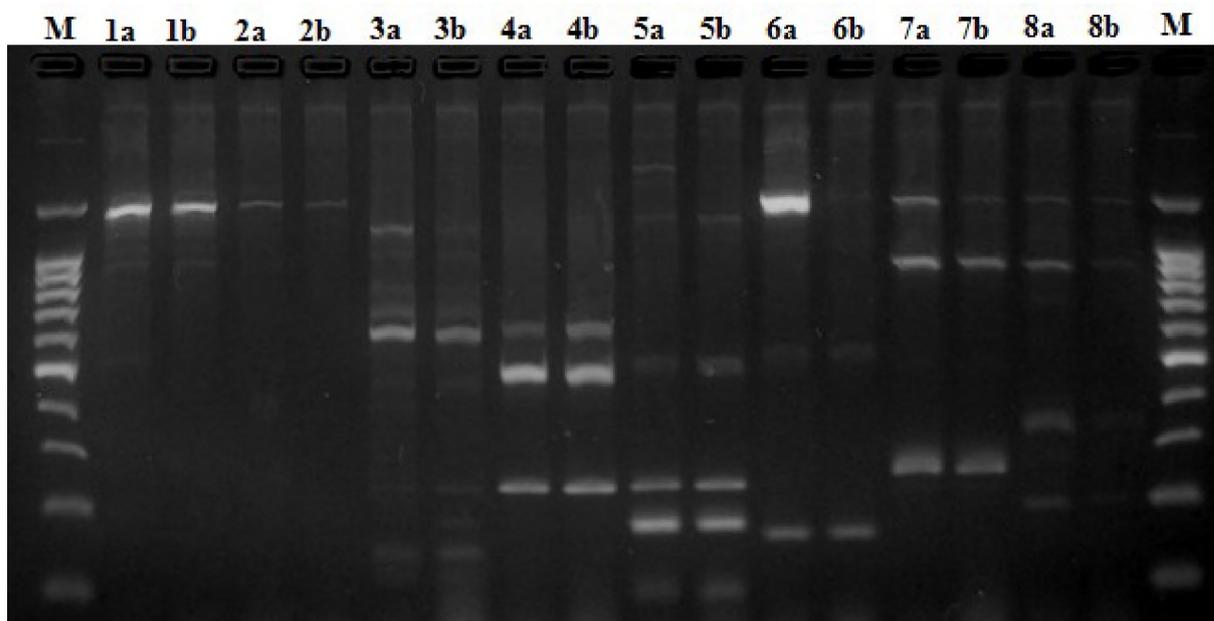
Помимо апробации ISSR и SSR-маркеров для генотипирования груши была выполнена апробация мультилокусных SCoT – маркеров применительно к яблоне. Было апробировано 14 ДНК-маркеров на основе SCoT – праймеров. Применили оригинальный подход, направленный, одновременно с апробацией ДНК-маркеров, на разработку нового типа ДНК-маркеров, основанного на амплификации фрагментов, локализованных между старто-кодом ATG в геноме растений и микросателлитной последовательностью. Для этого использовали комбинацию SCoT праймера и ISSR праймера в одной реакции. Суммарно апробировали 20 ДНК-маркеров. Экспериментальным путем определили оптимальные условия ПЦР. Реакционная смесь включала: 1х 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 °С – начальная денатурация, затем 42 цикла при следующих параметрах: 30 сек. при 95 °С - денатурация, 30 сек. При 48 °С – отжиг, 2 минуты при 72 °С – элонгация; этап финальной элонгации – 15 мин при 72 °С. На рисунках 40 и 41 приведены результаты электрофоретического анализа (2,5% агарозный гель) продуктов амплификации разработанных ДНК-маркеров, полученные при оптимизированных условиях ПЦР. Для сравнения

при постановке электрофореза в агарозном геле были задействованы маркеры SCoT19 и SCoT20 для сравнения с результатами генотипирования комбинированных пар с их участием.



Примечания: а - Грени Смит, б – Ренет Семеренко, 1 - SCoT19, 2 - SCoT19-UBC 810, 3 - SCoT19-UBC 873, 4 - SCoT19-3A37, 5- SCoT19-3A39, 6 - SCoT19-3A59, 7 - SCoT19-ASSR20, 8 - SCoT19-ASSR29

Рисунок 40 – Результаты апробации SCoT-STR ДНК маркеров на основе праймера SCoT19



Примечания: а –Грени Смит, б –Ренет Симиренко, 1 – ScoT20, 2 – ScoT20-UBC 810, 3 - SCoT19-UBC 873, 4 - SCoT19-3A37, 5- SCoT19-3A39, 6 - SCoT19-3A59, 7 - SCoT19-ASSR20, 8 - SCoT19-ASSR29

Рисунок 41 – Результаты апробации SCoT-STR ДНК маркеров на основе праймера SCoT20

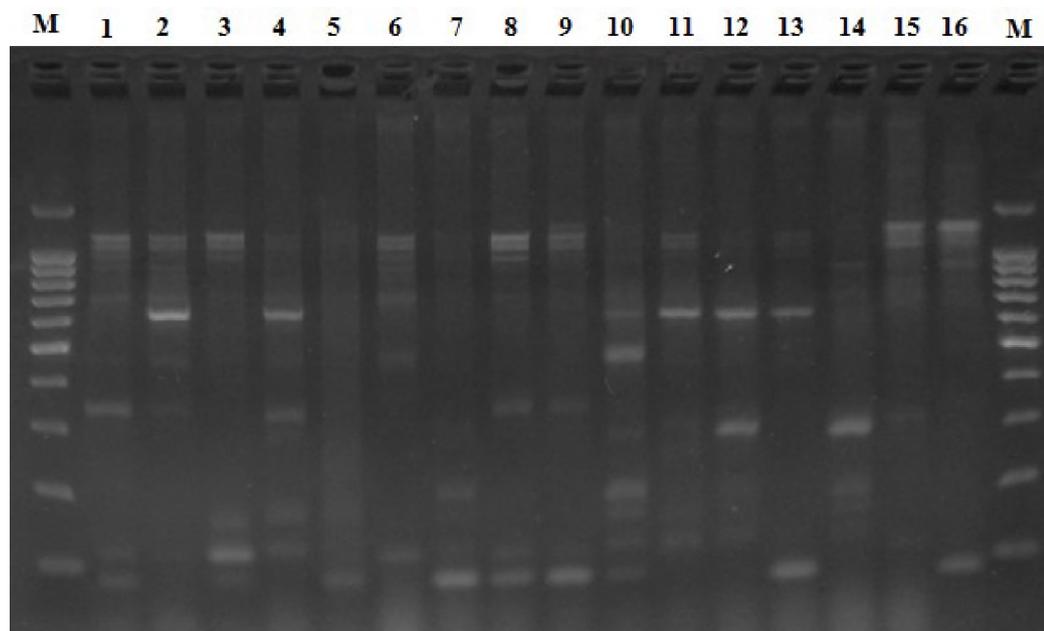
Результаты апробации выявили различные паттерны амплификации. В электрофоретических спектрах апробируемых маркеров было выявлено от одного фрагментов (маркеры SCoT20-UBC 810) до десяти фрагментов (маркер SCoT20-UBC 873). Характеристики маркеров представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Характеристики SCoT и SCoT-STR маркеров

№	Наименование маркера	Количество ДНК-фрагмент	Диапазон распределения ДНК-фрагментов (п.н.)
1	SCoT19	7	2500-750
2	SCoT19-UBC 810	3	2500-750
3	SCoT19-UBC 873	6	1200-150
4	SCoT19-3A37	4	500-150
5	SCoT19-3A39	7	1200-200
6	SCoT19-3A59	2	400-300
7	SCoT19-ASSR 20	4	1000-300
8	SCoT19-ASSR 29	6	1000-300
9	SCoT20	3	1500-950
10	SCoT20-UBC 810	1	1500
11	SCoT20-UBC 873	10	1200-150
12	SCoT20-3A37	6	700-200
13	SCoT20-3A39	6	2500-150
14	SCoT20-3A59	3	1500-150
15	SCoT20-ASSR 20	3	1500-250
16	SCoT20-ASSR 29	4	1500-200

На следующем этапе было выполнено генотипирование выборки из 32 сортов яблони, включая сорта отечественной и зарубежной селекции в целях оценки перспективности использования маркеров для ДНК-паспортизации. Для генотипирования были задействованы маркеры SCoT20-UBC 873 и SCoT20-3A37. Генотипирование было проведено на сортах Фридман, Интерпрайз, Молдавское красное, Либерти, Мантуанское, Прикубанское, Чемпион, Зимняя сказка, Кальвиль молдавский, Орловский пионер, 55-55-з, Ренет кубанский, Бужор, Синап Белый, Робертсон, Гала, Наследница Юга, Память Ульянищеву, Фокушор, Алые паруса, Славянин, Дейтон, Эрли Мак, Либерти 10, Малиновый Делишес, Либерти 20, Голден делишес клон В, Первинка, Ноктюрн, Лигол, Россошанское зимнее, Ред Чиф.

На рисунке 42, для примера, приведены результаты электрофоретического разделения продуктов амплификации по маркеру SCoT20-UBC 873.



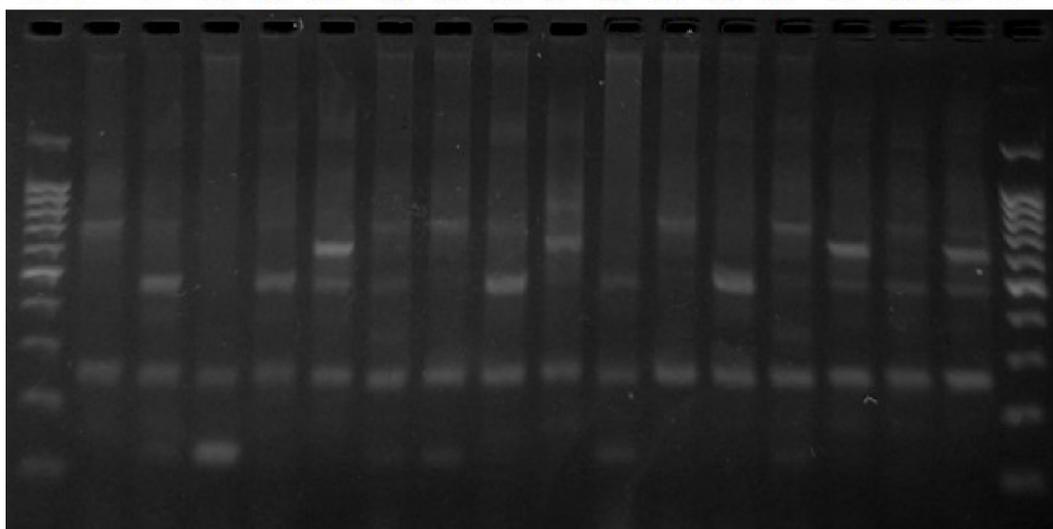
Примечания: 1 - Фридман, 2 - Интерпрайз, 3 - Молдавское красное, 4 - Либерти, 5 – Лигол, 6 - Мантуанское, 7 - Прикубанское, 8 - Чемпион, 9 - Зимняя сказка, 10 - Кальвиль молдавский, 11 - Орловский пионер, 12 - 55-55-з, 13 - Ренет кубанский, 14 - Бужор, 15 - Синап Белый, 16 – Роберсон

Рисунок 42 – Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с использованием ДНК-маркера SCoT20-UBC 873

На рисунке 43 представлены ДНК-фингерпринты 16 сортов яблони по маркеру SCoT20-3A37

По результатам анализа, было выявлено, что ДНК-профиль уже по двум маркерам обеспечивает уникальные, сортоспецифичные ДНК-паспорта в изученной выборке сортов. В таблице 25 приведены ДНК-паспорта изученных сортов яблони по двум ДНК-маркерам и 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.

М 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 М



Примечания: 17 – Гала, 18 - Наследница Юга, 19 - Память Ульянищеву, 20 - Фокушор, 21 - Алые паруса, 22 - Славянин, 23 - Дейтон, 24 - Эрли Мак, 25 – Россошанское зимнее, 26 – Ред Чиф, 27 - Либерти 10, 28 - Малиновый Делишес, 29 - Либерти 20, 30 - Голден делишес клон В, 31 - Первинка, 32 - Ноктюрн.

Рисунок 43 – Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с использованием ДНК-маркера SCoT20-3A37

Таблица 25 – ДНК-паспорта изученных сортов яблони

Сорт	Продукты реакции, п.н.	
	SCoT20-UBC 873	SCoT20-3A37
Фридман	350	500, 260
Интерпрайз	650	750, 260
Молдавское красное	150	750, 500, 260
Либерти	650, 300, 190	260, 130
Лигал	90	500, 260
Мантуанское	450, 120	650, 260
Прикубанское	200, 90	500, 260
Чемпион	350, 90	500, 260
Зимняя сказка	1200, 350, 90	500, 260
Кальвиль молдавский	450, 200	750, 500, 260
Орловский пионер	650	500, 260
11-55-55-з	650, 300	650, 500, 260, 130
Ренет кубанский	650, 90	650, 500, 260
Бужор	300, 200	650, 500, 260, 130
Синап Белый	1200	500, 260
Роберсон	1200, 90	650, 500, 260, 180
Гала	650, 200, 150, 120	750, 260
Наследница Юга	650, 300, 150	500, 260
Память Ульянищеву	350, 300, 200, 150, 90	260, 130
Фокушор	1200	500, 260
Алые паруса	1200, 650	650, 500, 260

Продолжение таблицы 25

Славянин	450, 150	750, 500, 300, 260
Дейтон	650, 300	750, 260
Эрли Мак	350, 300, 200	750, 500, 260
Россошанское зимнее	NA	800, 650, 260
Ред Чиф	350, 300, 200, 150	500, 260, 130
Либерти 10	650	750, 260
Малиновый Делишес	350, 300, 150, 90	500, 260
Либерти 20	650, 300, 200, 150, 90	750, 500, 300, 260
Голден делишес клон В	1200, 450, 200, 150, 90	650, 500, 260
Первинка	1200, 300, 200, 150, 90	750, 500, 260
Ноктюрн	1200, 90	650, 500, 260

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.

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

Для выполнения исследований был взят 31 образец абрикоса – 20 образцов были отобраны в экспедиционных выездах в районе села Салта (Дагестан, административный центр Гунибского района), 6 – в районе села Буртанимахи (Левашинский район Дагестана) и пять культурных сортов – Лескор, Шиндахлан, Хекобарш, Хонобах и Hong Yu из коллекции Дагестанской опытной станции (табл. 26).

Для генотипирования отобрали 9 SSR-маркеров, распределенных в два мультиплекса, в соответствии с ожидаемыми размерами амплифицируемых продуктов и флуоресцентными метками. Диапазоны амплифицированных фрагментов и количество аллелей приведены в таблице 27.

Таблица 26 – Отобранные для генотипирования образцы

№ п.п.	Происхождение, название, кол-во		Количество
1	Природная популяция, отборы	с. Гуниб	20
2		с. Бурганимахи	6
3	Культурный сорт, коллекция	Лескор	
4		Шиндахлан	
5		Хекобарш	
6		Хонобах	
7		Hong Yu	

Таблица 27 – Отобранные для генотипирования абрикоса микросателлитные маркеры

SSR маркер	№ мультиплекса	Краситель	Количество аллелей	Диапазон размеров продуктов ПЦР
UDP98-022	I	FAM	6	86-146
EMPaS06	I	R6G	5	203-220
BPPCT025	I	TAMRA	6	149-162
Ps12a02a	I	ROX	5	153-170
UDP98-410	I	FAM	3	132-135
BPPCT002	II	FAM	7	181-204
UDP98-409	II	R6G	10	122-164
UDP98-407	II	TAMRA	5	182-198
BPPTC017	II	ROX	10	184-217

Маркеры проявили различный уровень полиморфизма, выявив от 3 (UDP98-410) до 10 (UDP98-409 и BPPTC017) аллелей на локус. Частоты аллелей для различных маркеров представлены на рисунке 44.

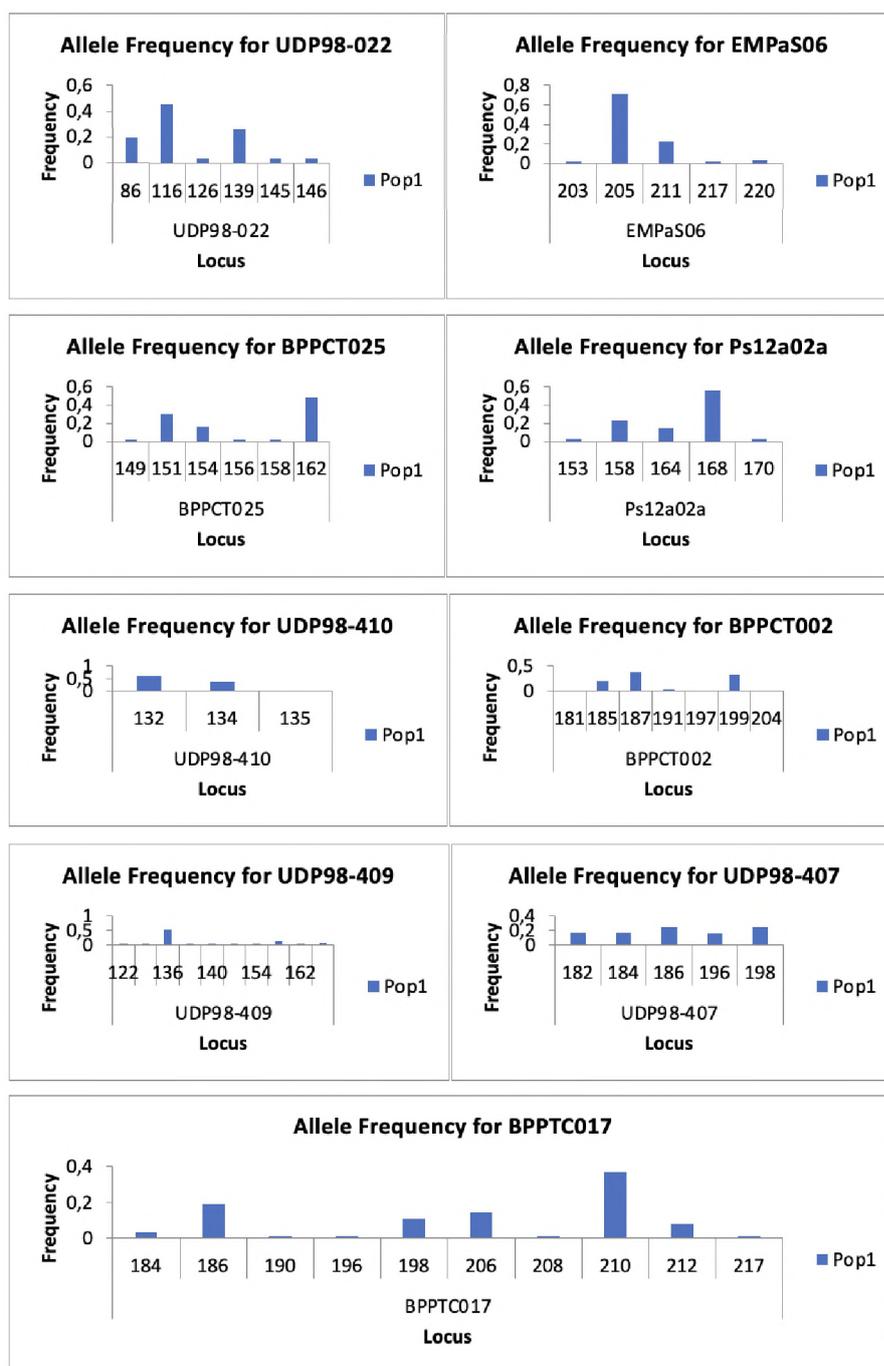


Рисунок 44 – Частоты аллелей использованных в работе маркеров

Статистические характеристики использованных маркеров на исследованной выборке приведены в таблице 28.

Характеристики SSR маркеров позволяют оценить перспективность дальнейшего применения маркеров на исследуемом генофонде. Исходя из значений количества эффективных аллелей и индекса Шенона, наибольший интерес для дальнейшего использования в генотипировании автохтонного

генофонда абрикоса Дагестана представляют маркеры UDP98-409, UDP98-407 и ВРРТС017.

Таблица 28 – Статистические характеристики использованных маркеров

Локус	Na ¹ *	Ne ²	I ³	Ho ⁴	He ⁵	F ⁶
UDP98-022	6	3,214	1,359	0,452	0,689	0,344
EMPaS06	5	1,798	0,823	0,323	0,444	0,273
ВРРТС025	6	2,818	1,208	0,613	0,645	0,050
Ps12a02a	5	2,546	1,160	0,484	0,607	0,203
UDP98-410	3	1,947	0,734	0,774	0,486	-0,591
ВРРТС002	7	3,337	1,370	0,516	0,700	0,263
UDP98-409	10	3,115	1,608	0,710	0,679	-0,045
UDP98-407	5	4,854	1,595	0,774	0,794	0,025
ВРРТС017	10	4,598	1,792	0,581	0,783	0,258
Примечания: * - ¹ - количество аллелей, ² - количество эффективных аллелей, ³ - индекс Шенона, ⁴ - наблюдаемая гетерозиготность, ⁵ - ожидаемая гетерозиготность и ⁶ - индекс фиксации						

Для большинства маркеров характерны близкие значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, что отражается на индексе фиксации стремящимся к нулю, данный факт свидетельствует о панмиктичности исследованной выборки генотипов.

На основании полученных данных был проведен кластерный анализ данных и построена дендрограмма, отображающая генетическое родство изученных образцов абрикоса (рис. 45).

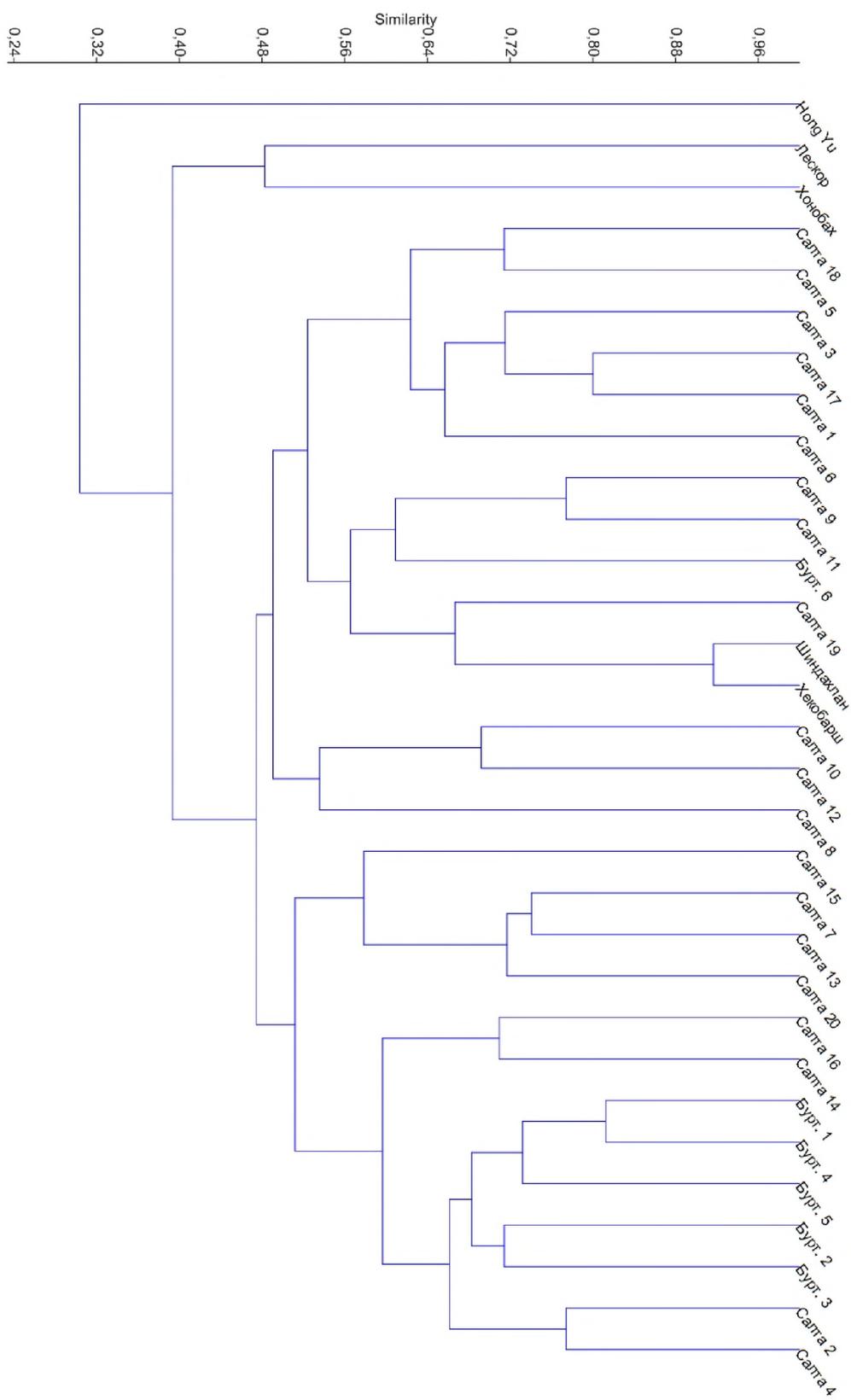


Рисунок 45 – Дендрограмма генетического сходства образцов абрикоса

Проведенная кластеризация позволила выявить основные закономерности распределения сортов и генотипов из популяционных

отборов абрикоса обыкновенного. Сорт китайского происхождения Hong Yu в процессе кластеризации был определен как наиболее генетически удаленный генотип, задействованный в выборке. В свою очередь европейский сорт Лескор занимает внешнее положение относительно кластера, сформированного образцами из популяций дикого абрикоса Дагестана. Так же в работу были задействованы три дагестанских сорта абрикоса: Хекобарш, Хонобах и Шиндахлан. Два сорта дагестанского происхождения Хекобарш и Шиндахлан были включены в общий кластер с популяционными образцами. Данный факт служит доказательством их автохтонного происхождения от форм из популяций абрикоса Дагестана. Исходя из того, что сорта Хекобарш и Шиндахлан генетически близки популяционным образцам абрикоса из экспедиционных отборов близ селенья Салта, можно сделать предположение о происхождении данных сортов от абрикосов из указанной области горного Дагестана. Сорт Хонобах не был отнесен к общему для всех образцов дикого абрикоса кластеру, что может свидетельствовать о вкладе в формирование сорта генплазмы из отдаленных от Дагестана регионов. Пять образцов дикого абрикоса отобранные в районе с. Бурганимахи на дендрограмме образуют субкластер, включенный в кластер сформированный образцами из отборов близ с. Салта. Таким образом, можно предположить о происхождении популяции в окрестностях селенья Бурганимахи от диких абрикосов, произрастающих около селения Салта.

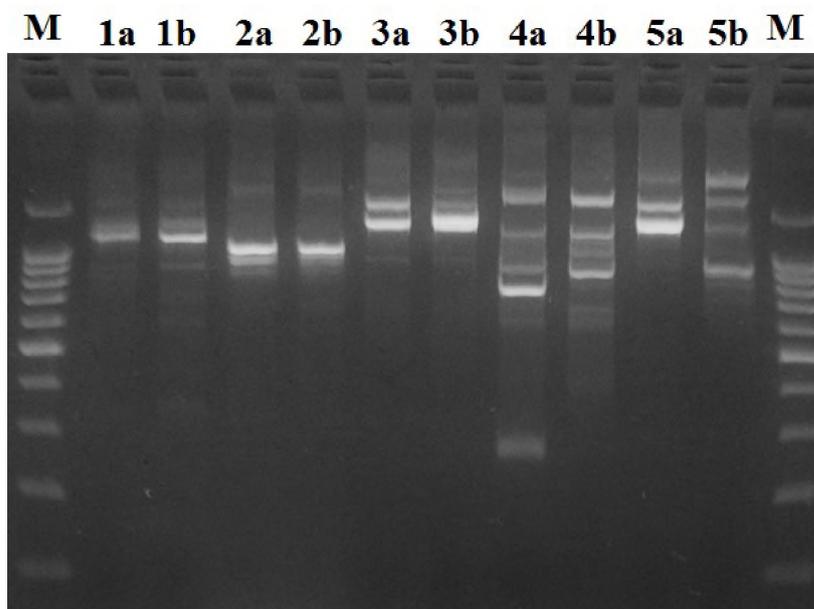
Проведенная работа по оценке генетического разнообразия и родства популяций дикого абрикоса относительно местных автохтонных сортов и сортов мировой селекции позволяет утверждать об уникальности дагестанского генофонда абрикоса сформированного в условиях частичной изоляции в горной местности и представляющего интерес для дальнейшего изучения.

2.3.5 Апробация и поиск информативных ISSR ДНК-маркеров для генотипирования и анализа генетической стабильности растений земляники садовой, получаемых при микроклональном размножении

В целях определения перспективных для анализа генетической стабильности размножаемой *in vitro* садовой культуры земляники садовой нами были апробированы 10 ISSR маркеров. В качестве растительного материала были отобраны маточные растения и микроклонально размноженные регенеранты относящиеся к двум сортам земляники Таира и Квики.

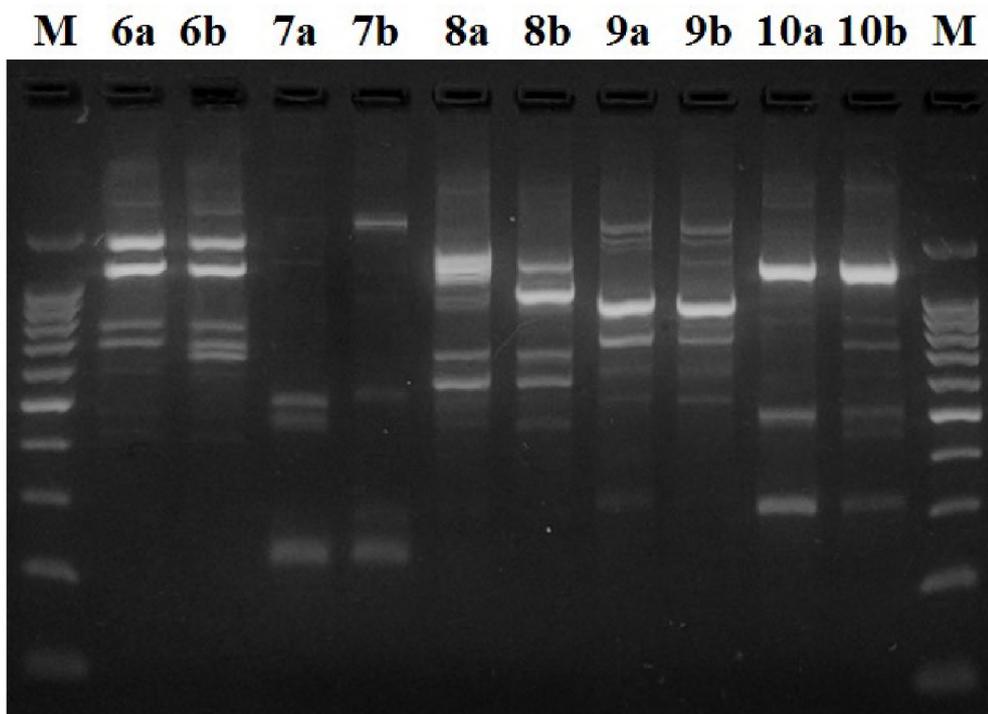
Были использованы следующие концентрации реагентов в ПЦР смеси: 2,5 мкл 10-кратного буфера для Taq ДНК-полимеразы, 0,5 или 2,5 мкл dNTP (2,5 мМ), 1 единица активности Taq ДНК-полимеразы, 2 мкл праймера (3,75 мМ) и 40-50 нг тотальной ДНК в общем объеме 25 мкл. За основу температурного режима и продолжительности этапов ПЦР, необходимых для проведения ISSR маркирования, были взяты стандартные для мультилокусных маркеров параметры. Однако, учитывая особенности ISSR маркеров, был осуществлен подбор наиболее оптимальных для большинства апробируемых ISSR температуры и времени этапа отжига праймеров. ПЦР была проведена согласно следующей программе: 3 минуты предварительной денатурации при температуре 95 °С; последующие 35 циклов: денатурация 35 секунд при 95 °С, отжиг праймеров 1 минута при 50 °С, элонгация 1,5 минуты при 72 °С, и финальный цикл синтеза при температуре 72 °С в течение 5 минут. Отбор информативных ISSR маркеров. ISSR анализ стабильности генетического материала в череде поколений микроклонально размноженных растений зависит от высокого качества ДНК-фингерпринтов оцениваемых образцов. Качество ДНК-фингерпринта по отдельно взятому маркеру определяется легкостью его интерпретации, выраженностью ДНК-фрагментов на электрофореграмме и отсутствию фонового свечения на дорожке нанесения ДНК-образца. Данными критерии мы руководствовались при отборе наиболее эффективных ISSR-маркеров. Всего в работе на культуре земляника садовая

было апробировано 10 ISSR маркера. Сводные результаты апробации 10 ISSR маркеров отображены на рисунках 46 и 47 и в таблице 29.



Примечания: а – Таира, b - Квики

Рисунок 46 – Апробация ISSR маркеров UBC 810 (1), UBC 873 (2), 3A37 (3), 3A39 (4), 3A59 (5) на сортах земляники садовой



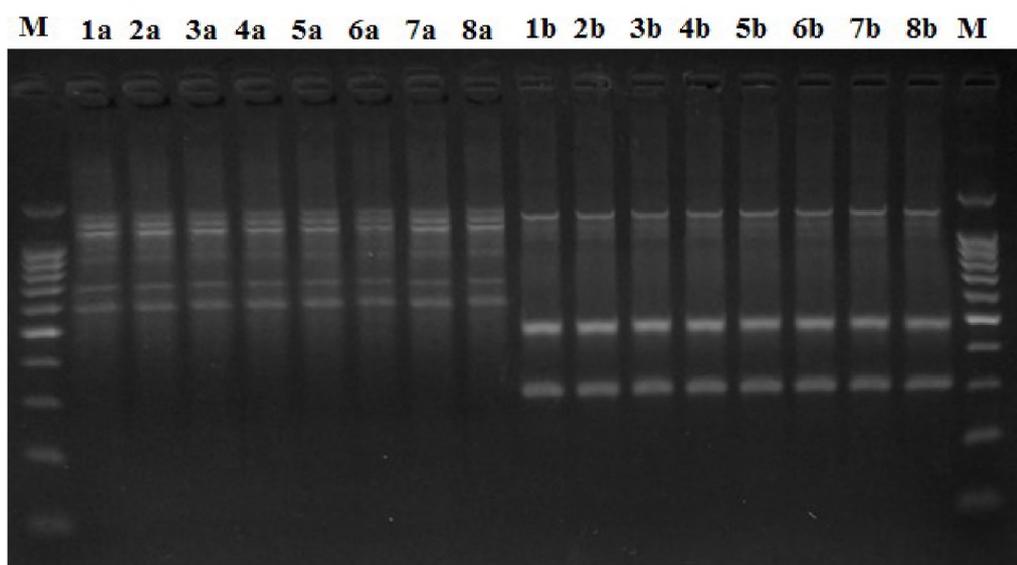
Примечания: а – Таира, b - Квики

Рисунок 47 – Апробация ISSR маркеров ASSR 20 (6), ASSR (7), UBC 849 (8), ISSR2 (9), ISSR6 (10) на сортах земляники садовой

Таблица 29 – Характеристики ISSR маркеров апробированных на сортах земляники садовой

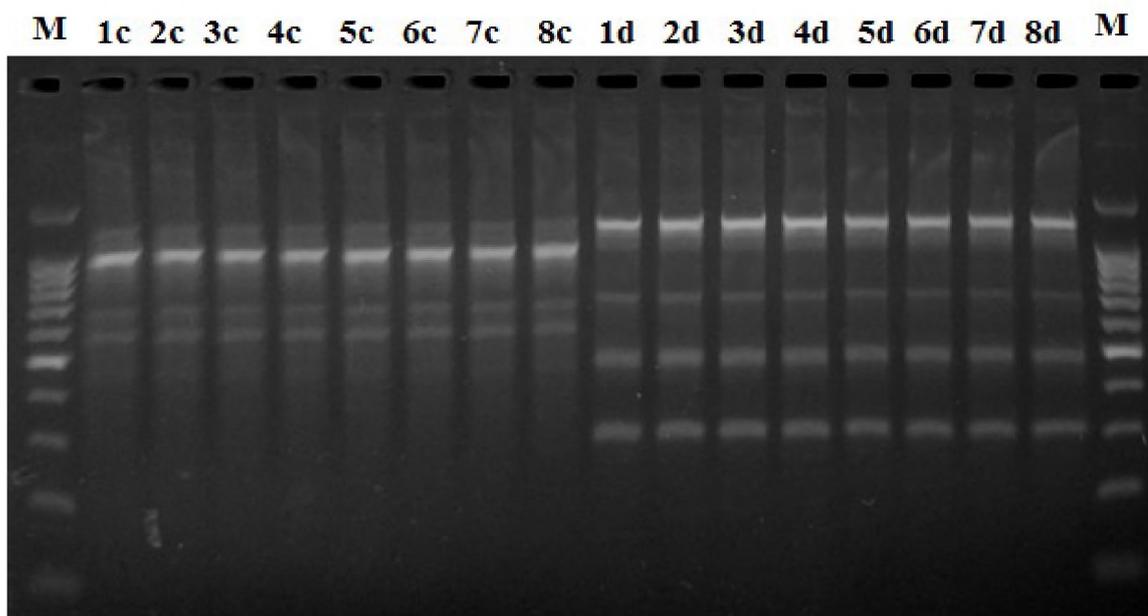
№	Маркер	Количество ДНК-фрагментов	Диапазоны (п. н.)
1	UBC 810	8	1200-600
2	UBC 873	4	1000-500
3	3A37	3	1800-800
4	3A39	10	2000-200
5	3A59	5	2500-800
6	ASSR 20	6	2000-800
7	ASSR 29	5	2000-200
8	UBC 849	7	2000-500
9	ISSR2	9	2000-600
10	ISSR6	6	2500-300

Для апробации при использовании в целях анализа генетической стабильности микроклонально размножаемых растений двух сортов земляники из 10 апробированных маркеров были использованы 2: UBC 849 и ISSR6. Осуществлен анализ семи растений, полученных в культуре *in vitro* и маточного растения, из которого они были получены. По всем маркерам наблюдались идентичные фингерпринты, как между регенерантами, так и у маточного растения. На рисунках 48 и 49 отображены фингерпринты по двум ISSR маркерам маточного растения и части регенерантов.



Примечания: a - UBC 849, b - ISSR6, 1 – маточное растение, 2-8 – регенеранты

Рисунок 48 – Оценка генетической стабильности регенерантов сорта Таира с использованием ISSR маркеров



Примечания: а - UBC 849, b - ISSR6, 1 – маточное растение, 2-8 – регенеранты

Рисунок 49 – Оценка генетической стабильности регенерантов сорта Квики с использованием ISSR маркеров

Таким образом, нами была осуществлена апробация ISSR-маркеров с целью установления наиболее эффективных маркеров для определения генетической стабильности регенерантов земляники садовой. Из отобранных ДНК-маркеров два маркера были задействованы в определении генетической стабильности микроклонально размноженных регенерантов относящихся к двум сортам: Таира и Квики. В проведенном анализе генетических отклонений не выявлено. Данный факт может свидетельствовать о надежности выбранной методики размножения культуры *in vitro*, для которой не характерно возникновение генетических отклонений в череде поколений вегетативно размноженных растений.

2.3.6 Разработка методик идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 (Grapevine leafroll-associated virus 1) и вируса бороздчатости древесины винограда (Grapevine rupestris stem pitting-associated virus) с помощью ПЦР в реальном времени

Актуальность и значимость разработки методик идентификации вирусных фитопатогенов винограда определяется в первую очередь тем, что их диагностика без применения инструментальных методов (иммунологических или молекулярно-биологических) затруднена, что может приводить к составлению некорректной схемы защиты виноградных насаждений, неточной оценке распространения фитопатогенов в конкретном регионе и их молекулярно-генетического разнообразия.

Методики идентификации, основанные на молекулярно-генетических методах, в частности на использовании полимеразной цепной реакции, являются одними из наиболее эффективных.

Для разработки использованы ранее полученные многолетние данные, дополненные результатами мониторинга в 2022 году виноградников Республики Крым, Республики Дагестан, Краснодарского и Ставропольского края, Ростовской области виноградных насаждений на наличие вирусной инфекции. Методом ОТ-ПЦР обнаружены вредоносные вирусы GLRaV-1, GRSPaV.

Материалом для исследования служили листья виноградных растений, собранные с 10.06 по 25.08.2022 г. Выделение РНК осуществляли методом прямой экстракции с использованием частиц диоксида кремния. Для идентификации использовали метод ОТ-ПЦР-РВ. Синтез кДНК на матрице РНК осуществляется с помощью набора реактивов MMLV RT kit по протоколу производителя ЗАО «Евроген».

Проведение ПЦР в реальном времени для идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 осуществляется по протоколу производителя реактивов HS-qPCR SYBR Blue (ООО «Биолабмикс»). Для идентификации вируса использовали праймерные пары специфичные к

фрагменту белка оболочки. В качестве внутреннего контроля качества ОТ-ПЦР использовали праймерные пары специфичные к фрагменту гена актина. Режимы амплификации целевых фрагментов: начальная денатурация – 5 мин. при 95 °С; следующие 40 циклов: денатурация – 10 сек. при 95 °С, отжиг праймеров – 15 сек. при 55 °С, элонгация – 20 сек. при 72 °С; плавление – 55–97 °С. Детекцию целевых продуктов производили в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I. Для верификации продуктов амплификации осуществляли анализ кривых плавления. Для валидации праймерных пар использовали метод разведения матрицы кДНК.

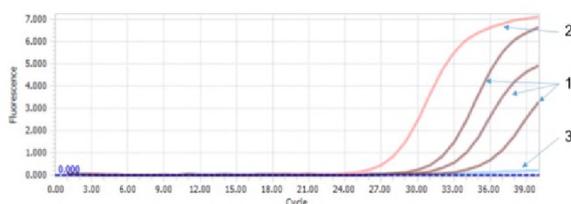
На основании полученных результатов разработаны методики идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 (Grapevine leafroll-associated virus 1) и вируса бороздчатости древесины винограда (Grapevine rupestris stem pitting-associated virus) СТО 00668034-142-2022 (Приложение В).

Эффективность методик была показана при анализе образцов винограда на наличие вирусов. В результате вирус скручивания листьев виноградной лозы 1 и вирус бороздчатости древесины винограда были обнаружены в анализируемых образцах, что подтверждено с помощью иных методов детекции (рис. 50, табл.30).

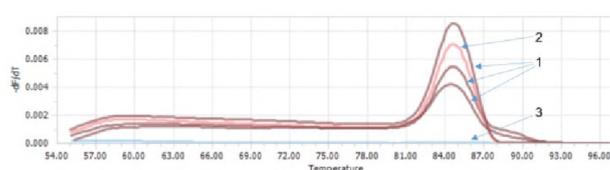
Таким образом, в трех из восьми проанализированных образцов винограда детектирован вирус скручивания листьев виноградной лозы 1 (GLRaV-1), в пяти образцах - вируса бороздчатости древесины винограда (GRSPaV), что подтверждает идентификацию методом ОТ-ПЦР.

Разработанные методики позволяют эффективно выполнять детекцию вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 и вируса бороздчатости древесины винограда и могут быть использованы для их идентификации при фитосанитарном мониторинге виноградных насаждений или оценке качества посадочного материала.

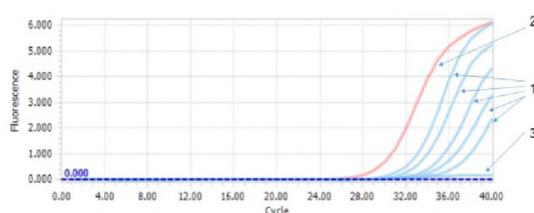
А Кривые амплификации GLRaV-1 в анализируемых образцах



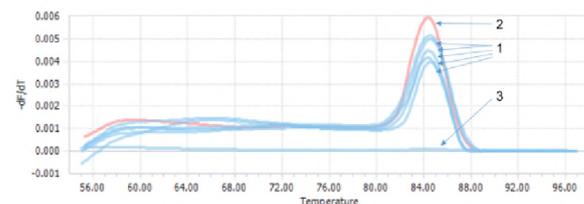
Кривые плавления амплифицированных фрагментов GLRaV-1



Б Кривые амплификации GRSPaV в анализируемых образцах



Кривые плавления амплифицированных фрагментов GRSPaV



Примечания: 1 – исследуемые образцы; 2 – положительный контроль на вирус скручивания листьев виноградной лозы 1 или вируса бороздчатости древесины винограда в образцах винограда; 3 – отрицательный контроль

Рисунок 50 – Результаты детекции вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 (А) и вируса бороздчатости древесины винограда в образцах винограда (Б)

Таблица 30 – Результаты детекции вирусов винограда с использованием разработанных методик идентификации

Номер образца	Идентификация вирусов с помощью разработанных методик		Идентификация вирусов методом ОТ-ПЦР для подтверждения эффективности разработанных методик	
	GLRaV-1	GRSPaV	GLRaV-1	GRSPaV
1	-	+	-	+
2	+	-	+	-
3	-	+	-	+
4	+	-	+	-
5	+	+	+	+
6	-	+	-	+
7	-	-	-	-
8	-	+	-	+
Положительный контроль	+	+	+	+
Отрицательный контроль	-	-	-	-

Основным конкурентным преимуществом данной технологии является применение для анализа метода ПЦР в реальном времени с использованием

красителя SYBR Green I, что позволяет с высокой точностью, специфичностью и чувствительностью в короткие сроки провести детекцию вирусов. При этом отсутствует необходимость проведения электрофоретического анализа, что сокращает время выполнения детекции и снижает риск контаминации ПЦР-продуктами. Анализ кривых плавления с помощью программного обеспечения амплификатора дает возможность контроля специфичности амплификации без применения дополнительных методов.

2.3.7 Разработка молекулярно-генетических паспортов генотипов рода *Malus* по аллелям локуса самонесовместимости и микросателлитным ДНК-маркерам

В соответствии с поставленными ранее задачами, в ходе исследований, выполненных в 2022 году, было проведено генотипирование 42 образцов яблони домашней с использованием восьми микросателлитных ДНК-маркеров и ДНК-маркеров трех аллелей гена самонесовместимости (S-ген). В выборку изучаемых образцов вошли гибридные образцы, отобранные в различных комбинациях селекционных скрещиваний на основе ДНК-маркерного анализа по гену устойчивости к парше *Rvi6* и гена, контролирующего эндогенный синтез этилена *Md-ACS1*. Все представленные образцы несут искомый ген устойчивости к парше и наиболее ценный с селекционной точки зрения аллельный вариант гена *Md-ACS1* - 2/2. Эти образцы являются ценными комплексными донорами, а также представляют ценный селекционный материал. Это актуализирует вопрос идентификации аллелей гена самонесовместимости, что позволит более эффективно вовлекать их в селекционные скрещивания за счет подбора совместимых при опылении комбинаций. Кроме того, важен вопрос их генотипирования по микросателлитным ДНК-маркерам, т.к. это позволит получить их ДНК-паспорта, а также в дальнейшем выполнить анализ их генетического полиморфизма изученной выборки в целях выявления групп наименьшего и

наибольшего генетического сходства, что позволит более эффективно подбирать комбинации скрещиваний.

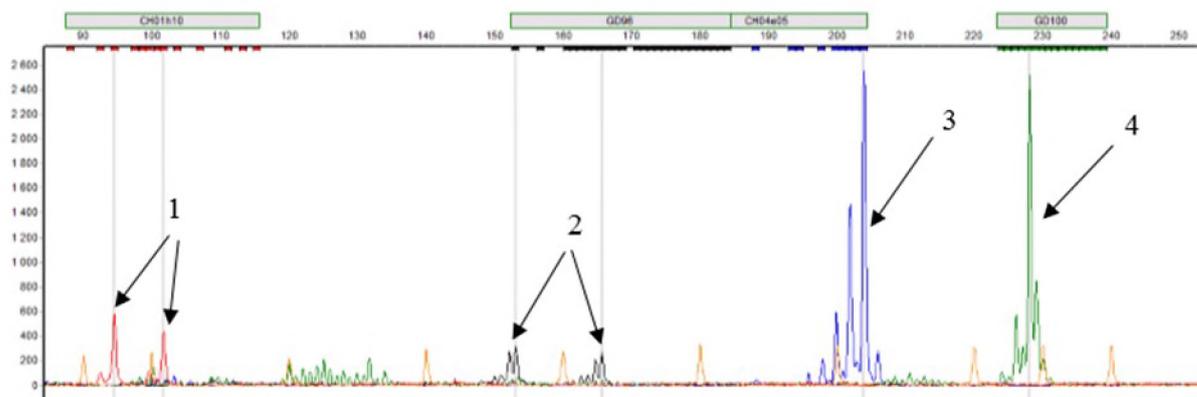
В работе использовали следующие SSR-маркеры: CH04e05, GD100, GD96, CH01h10, CH04C07, CH03d07, GD12 и CH02C09. Кроме того, использовали ДНК-маркеры трех аллелей S-гена: аллели S2, S3 и S10. В целях сокращения затрат на проведение SSR-генотипирования в работе использовали мультиплексный анализ – проводили генотипирование одновременно по четырем SSR-маркерам в одной реакции. Таким образом, в работе использовали два мультиплексных набора, которые приведены в таблице 31. В таблице, наряду с информацией о флуоресцентном красителе и мультиплексном наборе, к которому относится маркер, приведены также данные о диапазоне амплифицированных фрагментов и количестве аллелей, выявленных в изученной выборке образцов при проведении ДНК-паспортизации.

Таблица 31 – Мультиплексные наборы SSR-маркеров

Маркер	Флюорофор	Мультиплекс	Кол-ва аллелей	Диапазон размеров ампликонов, п. н.
CH04e05	FAM	I	2	176-204
GD100	R6G	I	3	227-239
GD96	TAMRA	I	8	153-184
CH01h10	ROX	I	4	95-115
CH04C07	FAM	II	7	96-136
CH03d07	R6G	II	6	192-231
GD12	TAMRA	II	4	157-163
CH02C09	ROX	II	4	237-262

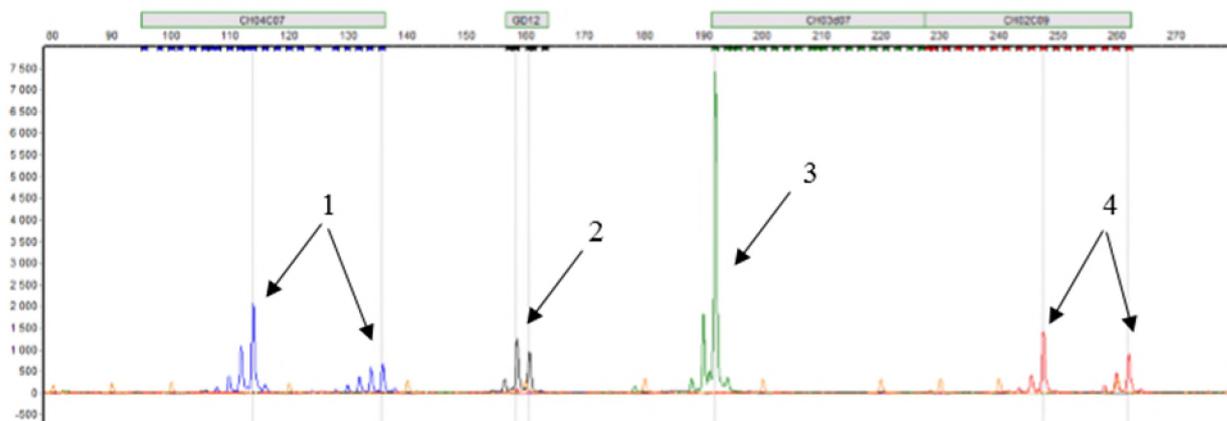
Используемые мультиплексные комбинации ДНК-маркеров позволили четко идентифицировать целевые фрагменты, примеры которых приведены на рисунках 51 и 52. Результаты приведены в интерфейсе программы GeneMarkerV3.0.1 генетического анализатора Нанофор 05. Наличие двух пиков на электрофореграмме свидетельствует о гетерозиготности по локусу

SSR-маркера и выражено в наличии двух разных значений в ДНК-фингерпринте образца.



Примечания: 1 – CH01h10, 2 – GD96, 3 - CH04e05, 4 - GD100

Рисунок 51 – Результаты фрагментного анализ по мультиплексному набору №1



Примечания: 1 – CH04C07, 2 – GD12, 3 - CH03d07, 4 - CH02C09

Рисунок 52 – Результаты фрагментного анализ по мультиплексному набору №1

По результатам работы были получены SSR-фингерпринты для всех изученных 42 образцов яблони. Данные приведены в таблицах 32 и 33.

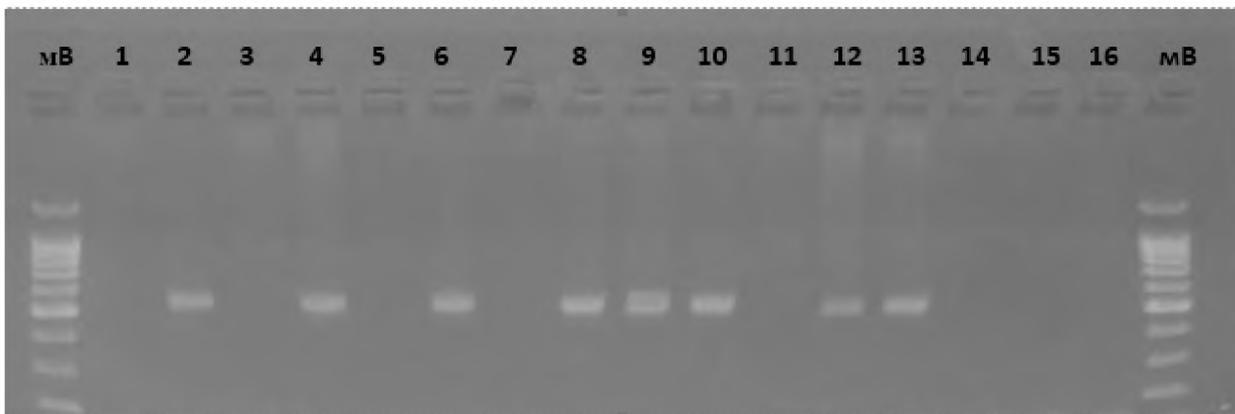
Таблица 32 – SSR-фингерпринты изученных образцов яблони по маркерам CH04e05, GD100, GD96, CH01h10

№ п/п	Образец	SSR-маркер			
		CH04e05	GD100	GD96	CH01h10
1.	29c-2016-1	176:204	227:227	153:166	95:102
2.	36-2016-1	204:204	227:227	153:166	95:102
3.	62-2016-1	176:176	227:227	153:178	102:115
4.	90-2016-1	176:204	227:227	178:182	95:115
5.	127-2016-1	176:204	227:227	166:182	102:115
6.	155-2016-1	176:176	227:227	166:182	95:95
7.	157-2016-1	204:204	227:227	178:182	102:115
8.	54-2016-2	176:204	227:227	166:182	95:115
9.	74-2016-2	176:204	227:227	166:182	102:113
10.	80-2016-2	176:176	227:227	166:182	95:113
11.	85-2016-2	176:176	227:227	166:168	102:115
12.	86-2016-2	176:176	227:227	178:182	102:115
13.	103-2016-2	176:204	227:227	178:182	102:115
14.	115-2016-2	176:204	227:227	166:182	102:115
15.	2-2016-3	176:204	227:227	166:182	102:115
16.	11-2016-3	176:204	227:227	153:166	102:115
17.	28-2016-3	204:204	227:227	178:182	102:115
18.	71-2016-3	204:204	239:239	166:182	102:102
19.	73-2016-3	204:204	227:239	153:166	102:102
20.	79-2016-3	176:176	227:227	178:182	95:115
21.	83-2016-3	176:176	227:239	153:178	102:102
22.	9-2016-4	176:204	227:235	174:178	95:95
23.	10-2016-4	176:204	227:227	178:180	95:95
24.	13-2016-4	176:204	227:227	166:174	95:102
25.	45-2016-4	176:204	227:235	174:178	95:102
26.	23н-2016-4	176:204	227:235	166:174	95:95
27.	28-2016-4	204:204	227:235	166:174	95:95
28.	46-2016-4	176:204	235:235	178:180	95:102
29.	2-2016-5	176:176	239:239	153:178	102:115
30.	4-2016-5	176:176	227:227	153:184	102:102
31.	10-2016-5	176:204	227:227	178:182	102:115
32.	13-2016-5	176:204	227:227	153:184	102:115
33.	17-2016-5	176:204	227:227	182:184	102:115
34.	18-2016-5	176:176	227:227	178:182	102:115
35.	19-2016-5	176:176	227:239	153:184	102:115
36.	8-2016-6	176:176	227:227	182:184	95:102
37.	10-2016-6	176:176	227:227	153:178	95:95
38.	22-2016-6	176:176	227:227	153:184	102:115
39.	31-2016-6	176:176	227:227	153:184	95:102
40.	36-2016-6	176:176	227:227	153:178	95:102
41.	47-2016-6	176:176	227:227	153:184	95:102
42.	80-2016-6	176:204	227:227	182:184	95:102

Таблица 33 – SSR-фингерпринты изученных образцов яблони по маркерам CH04C07, CH03d07, GD12, CH02C09

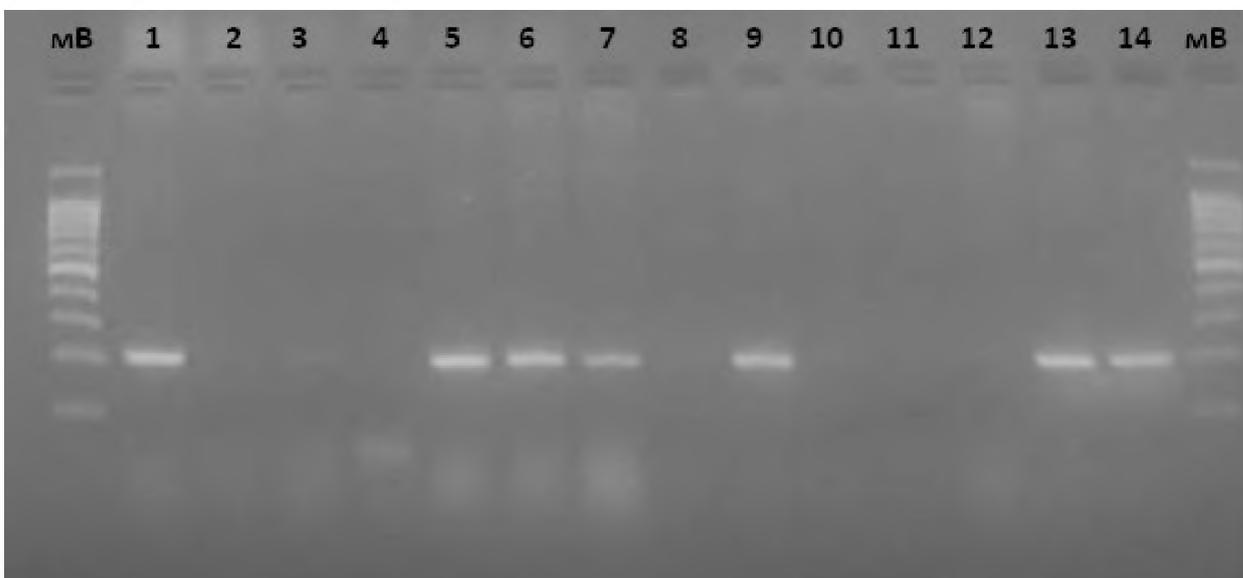
№ п/п	Образец	SSR-маркер			
		CH04C07	CH03d07	GD12	CH02C09
1.	29c-2016-1	114:136	192:194	159:161	237:262
2.	36-2016-1	110:114	192:194	157:159	248:262
3.	62-2016-1	114:136	192:192	159:161	248:262
4.	90-2016-1	114:136	192:194	157:159	248:262
5.	127-2016-1	114:136	192:223	157:159	237:262
6.	155-2016-1	110:114	192:192	157:159	237:262
7.	157-2016-1	114:136	194:223	159:161	237:262
8.	54-2016-2	96:114	192:210	159:159	248:262
9.	74-2016-2	106:114	192:210	159:159	248:262
10.	80-2016-2	96:114	210:223	159:159	248:262
11.	85-2016-2	96:114	192:210	159:159	248:262
12.	86-2016-2	96:114	210:223	159:159	248:262
13.	103-2016-2	106:114	192:210	159:159	248:262
14.	115-2016-2	96:114	210:223	159:159	248:262
15.	2-2016-3	114:136	192:210	157:159	248:262
16.	11-2016-3	96:114	192:210	157:159	248:262
17.	28-2016-3	96:114	210:223	157:159	248:262
18.	71-2016-3	114:136	223:223	157:159	248:262
19.	73-2016-3	96:114	192:223	157:159	248:262
20.	79-2016-3	96:114	192:210	157:159	248:262
21.	83-2016-3	96:114	223:223	157:159	248:262
22.	9-2016-4	114:120	192:231	159:163	250:262
23.	10-2016-4	114:136	223:231	159:159	250:262
24.	13-2016-4	114:136	192:231	159:159	250:262
25.	45-2016-4	114:120	192:192	159:163	237:262
26.	23H-2016-4	114:120	223:231	159:159	237:262
27.	28-2016-4	114:136	192:231	159:163	237:262
28.	46-2016-4	114:136	192:223	159:159	250:262
29.	2-2016-5	108:136	196:210	157:159	248:248
30.	4-2016-5	114:136	223:231	157:159	237:248
31.	10-2016-5	114:136	223:231	157:163	248:248
32.	13-2016-5	108:136	223:231	157:159	248:248
33.	17-2016-5	108:136	196:223	157:163	237:248
34.	18-2016-5	108:136	223:231	157:163	237:248
35.	19-2016-5	108:136	210:231	157:159	237:248
36.	8-2016-6	108:110	194:231	157:159	248:248
37.	10-2016-6	108:136	192:196	161:161	237:237
38.	22-2016-6	108:110	194:196	157:163	248:248
39.	31-2016-6	108:110	194:231	161:163	237:248
40.	36-2016-6	108:110	192:231	157:159	248:248
41.	47-2016-6	108:136	192:231	157:163	248:248
42.	80-2016-6	114:136	194:231	157:163	237:248

Наряду с SSR-генотипирование была выполнена молекулярно-генетическая идентификация аллелей S3, S5 и S10 гена самонесовместимости. Для примера, на рисунках 53 и 54 приведены результаты ДНК-маркерного анализа по аллелям S3 и S10.



Примечания: mB – маркер молекулярного веса; 1 – 29с-2016-1, 2 – 36-2016-1, 3– 62-2016-1, 4 – 90-2016-1, 5– 127-2016-1, 6 – 155-2016-1, 7– 157-2016-1, 8 – 54-2016-2, 9 – 74-2016-2, 10 – 80-2016-2, 11 – 85-2016-2, 12 – 86-2016-2, 13 – 103-2016-2, 14 – 115-2016-2, 15 – 2-2016-3, 16 – 11-2016-3

Рисунок 53 – Электрофореграмма продуктов ПЦР реакции с использованием ДНК-маркера аллеля S3



Примечания: mB – маркер молекулярного веса; 1 – 2-2016-5, 2 – 4-2016-5, 3 – 10-2016-5, 4 – 13-2016-5, 5 – 17-2016-5, 6 – 18-2016-5, 7 – 19-2016-5, 8 – 8-2016-6, 9–10-2016-6, 10– 22-2016-6, 11 – 31-2016-6, 12 – 36-2016-6, 13 – 47-2016-6, 14 – 80-2016-6

Рисунок 54 – Электрофореграмма продуктов ПЦР реакции с использованием ДНК-маркера аллеля S10

В результате молекулярно-генетической идентификации у значительной части исследованных образцов были выявлены искомые аллели. Полные результаты приведены в таблице 32. Видно, что наиболее распространены в изученной выборке аллели *S3* и *S10*.

Таблица 32 – Наличие аллелей *S3*, *S5* и *S10* у изученных образцов яблони

№ п/п	Образец	S3	S5	S10	№ п/п	Образец	S3	S5	S10
1.	29с-2016-1				22.	9-2016-4			+
2.	36-2016-1	+		+	23.	10-2016-4			+
3.	62-2016-1				24.	13-2016-4			+
4.	90-2016-1	+		+	25.	45-2016-4			+
5.	127-2016-1				26.	23н-2016-4			+
6.	155-2016-1	+		+	27.	28-2016-4			+
7.	157-2016-1				28.	46-2016-4			+
8.	54-2016-2	+		+	29.	2-2016-5			+
9.	74-2016-2	+		+	30.	4-2016-5			
10.	80-2016-2	+		+	31.	10-2016-5			
11.	85-2016-2				32.	13-2016-5			
12.	86-2016-2	+		+	33.	17-2016-5	+		+
13.	103-2016-2	+		+	34.	18-2016-5	+		+
14.	115-2016-2				35.	19-2016-5			+
15.	2-2016-3				36.	8-2016-6			
16.	11-2016-3				37.	10-2016-6			+
17.	28-2016-3				38.	22-2016-6			
18.	71-2016-3				39.	31-2016-6			
19.	73-2016-3				40.	36-2016-6		+	
20.	79-2016-3				41.	47-2016-6			+
21.	83-2016-3				42.	80-2016-6			+

Информация о наличии/отсутствии целевых аллелей гена самонесовместимости представляет ценность для более эффективного включения изученных образцов, являющихся комплексными донорами, в селекционные скрещивания. Для максимальной совместимости при выполнении опыления с образцами, определенными в качестве второй родительской формы, необходимо избегать наличия одной или двух идентичных аллелей. Так, к примеру, образцы, имеющие аллельный набор

S3S10 будут несовместимы с сортами и другими селекционными формами, имеющими аналогичный набор аллелей. При наличии одной идентичной аллели, совместимость близка к величине 50% (только 50 % пыльцевых зерен прорастает). Наряду с этим, данные о наличии аллелей *S*-гена являются частью ДНК-паспорта генотипа. В таблице 33 приведен пример объединенного ДНК-паспорта для некоторых из изученных образцов.

Таблица 33 – ДНК-паспорт на основе SSR-анализа и генотипирования по локусу *S*-гена

ДНК-маркер	Образец		
	36-2016-1	80-2016-2	17-2016-5
CH04e05	204:204	176:176	176:204
GD100	227:227	227:227	227:227
GD96	153:166	166:182	182:184
CH01h10	95:102	95:113	102:115
CH04C07	110:114	96:114	108:136
CH03d07	192:194	210:223	196:223
GD12	157:159	159:159	157:163
CH02C09	248:262	248:262	237:248
<i>S</i> -ген	S3S10	S3S10	S3S10

Необходимо также отметить, что данные микросателлитного генотипирования могут быть также использованы для анализа степени генетического сходства изученных генотипов, что позволит в дальнейшем избегать включения в пары селекционных скрещиваний генетически близких образцов и повысить, таким образом, разнообразие гибридного потомства.

2.4 Выводы

В результате выполненных исследований:

разработан метод мультиплексной ДНК-паспортизации сортов черешни, позволяющий проводить генотипирование одновременно по шести микросателлитным локусам;

выполнена экспериментальная апробация и оценка полиморфизма локуспецифичных (8 SSR-маркеров) и мультилокусных (20 ISSR ДНК-маркеров на) ДНК-маркеров применительно к семечковой культуре – груша.

Наиболее перспективными для выполнения генотипирования сортов груши являются SSR-маркеры CH04e05, CH01h10, CH04c07, CH03d07 и CH02C09, а также ISSR-маркеры UBC 825, UBC 826 и UBC 844;

на основе апробации 14 SCoT ДНК-маркеров выявлены информативные маркеры, перспективные для генотипирования сортов яблони, на основе SCoT-праймеров, получены ДНК-паспорта по указанным мультилокусным ДНК-маркерам для востребованных в садоводстве отечественных и зарубежных сортов яблони;

с использованием девяти микросателлитных ДНК-маркеров выполнено генотипирование 31 форм абрикоса из природных популяций, отобранных на территории Дагестана, а также культурных сортов из различных эколого-географических групп, получена информация о генетических взаимосвязях и установлено уникальность дагестанского автохтонного генофонда абрикоса сформированного в условиях частичной изоляции горной местности;

по результатам апробации десяти ISSR-маркеров были выявлены наиболее перспективные для выполнения генотипирования земляники садовой и анализа генетической стабильности при микроклонировании: UBC 849 и ISSR6;

разработаны методики идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 (Grapevine leafroll-associated virus 1) и вируса бороздчатости древесины винограда (Grapevine rupestris stem pitting-associated virus) на основе использования метода ПЦР в реальном времени (Приложение В);

выполнена молекулярно-генетическая паспортизация 32 ценных селекционных форм яблони, являющихся комплексными донорами, по трем аллелям локуса самонесовместимости (S3, S5 и S10), а также восьми микросателлитным ДНК-маркерам и получены генотипспецифичные ДНК-паспорта. Данные об аллельных вариантах S-локуса будут также использованы для оптимального подбора пар при селекционных скрещиваниях.

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

Применение методов биотехнологии, основанных на культивировании растительных тканей в условиях *in vitro*, позволяет ускорить внедрение новых, перспективных сортов, подвоев в производство, при этом посадочный материал будет генетически однородным и свободным от вредоносных организмов. Наличие таких высокоэффективных методов размножения, в настоящее время, имеет важное значение для питомниководства, в связи с острой необходимостью создания насаждений базисных маточных растений, и для последующего тиражирования оздоровленного посадочного материала. Метод клонального микроразмножения растений меристемным способом является одним из способов вегетативного микроразмножения растений, использование которого в совокупности с хемо- и термотерапией позволяет провести оздоровление растений от вирусных и фитоплазменных инфекций.

Важными преимуществами данного способа размножения является возможность тиражирования необходимого количества растений в короткие сроки, круглогодичность работы, а также размножение трудно размножаемых традиционными способами культур, сортов. Хотя технология клонального микроразмножения разработана для многих культур, в процессе работы могут возникнуть свои сложности.

На первом этапе клонального микроразмножения растений, как правило, сталкиваются с проблемой высокой контаминации эксплантов сапрофитной и фитопатогенной микрофлорой, продуцированием некоторыми видами растениями в большом количестве фенольных соединений, некрозом тканей [48-54]. Уровень инфицированности и продуцирования фенольных

соединений определяется периодом отбора эксплантов для введения в культуру, физиологическим состоянием материнского растения, его возрастом, фазами органо- и морфогенеза культуры [55, 56].

Для одних культур, оптимальным периодом отбора меристем является ранневесенний период (март, апрель), когда меристемы изолируют из пророщенных в лабораторных условиях почек, для других - период активного роста – май, июнь, для третьих, в период покоя [57-59].

В некоторых случаях мнения исследователей расходятся, что может быть обусловлено и сортовыми особенностями культур. Так по одним данным для земляники оптимальным периодом изоляции эксплантов в культуру *in vitro* является позднеосенний период, при котором процент регенерации составляет в среднем по сортам 76,5 % [60], по данным Муратовой (2015) наилучшим периодом введения в культуру *in vitro* является фаза выхода растений из состояния покоя или начало активной вегетации.

Для малины и ежевики установлено, что уровень приживаемости и частота регенерации существенно выше в осенний период, чем в ранневесенний период [61].

На этапе подготовке эксплантов к введению в культуру *in vitro* в качестве saniрующих средств применяют соединения из различных химических групп. Раннее активно использовали растворы, содержащие ртуть (сулема, мертиолят) [62-64], также используют перекись водорода и средства, содержащие в своем составе активный хлор - гипохлорит натрия и кальция, хлорамин [63-68]. Некоторые исследователи предварительно обрабатывают экспланты фунгицидами [65-67, 69-70], а для борьбы с внутренней инфекцией применяют антибиотики [71-73]. Выбор стерилизующего вещества, его концентрация, экспозиция обработки, обеспечивающие высокий выход стерильных эксплантов и высокий уровень их регенерации, определяется индивидуально и зависит от культуры и периода изоляции.

Большое значение для регенерации имеет размер вводимого экспланта. Для целей оздоровления растений от внутриклеточных организмов

необходимо вычленять верхушки размером не более 0,1-0,2 мм (соответственно, уровень регенерации будет низким), для микроразмножения используют экспланты размером 0,5-2,0 мм (соответственно, уровень регенерации будет гораздо выше) [74,75].

Темпы роста и развития эксплантов на питательной среде в значительной степени определяется ее составом: соотношением макро- и микросолей, концентрацией витаминов, углеводов, регуляторов роста и ФАВ (физиологически активных веществ) [49].

В технологии клонального микроразмножения плодово-ягодных культур и винограда чаще всего используют среды Мурасиге и Скуга (MS), Кворина-Лепуавра (QL), Driver and Kuniyuki (DKW), WPM, Андрерсона, с модификациями в части концентрации гормональных веществ, витаминов, макроэлементов, сахарозы [48, 57, 69, 76, 77-84].

На этапе укоренения, как правило, используют обедненный состав среды (т.е. с уменьшенным количеством макросолей и углеводов) [85-87].

На этапе, собственно, микроразмножения в качестве регуляторов роста используют различные комбинации из цитокининов (6-БАП, кинетин, зеатин, TDZ, CPPU), гиббереллина, и для активации процесса пролиферации в незначительном количестве добавляют ауксины (ИМК) [56, 65, 88-89].

На этапе укоренения, для стимуляции корнеобразования используют β -индолилмасляную кислоту (β -ИМК), β -индолилуксусную кислоту (β -ИУК), ф-нафтилуксусную кислоту (ф-НУК) в различных концентрациях [81, 85, 90, 91].

Кроме того, для хорошего роста и развития эксплантов в условиях *in vitro* необходимо подобрать оптимальный режим освещения: интенсивность и спектральный состав светового потока, т.к. эти физические факторы оказывают значительное влияние на процессы роста надземной части растений и корнеобразования [92-94].

Один из наиболее сложных этапов в процессе клонального микроразмножения является перевод пробирочных растений из стерильных условий в условия *ex vitro* [95]. Сложность заключается в том, что у растений

еще не развит фотосинтетический аппарат, корневая система. В связи с этим необходимо создать благоприятные условия: подобрать почвенный субстрат, водный режим, питание, температура, влажность, освещение [96].

Исследование физиологических механизмов адаптации растений к условиям *ex vitro*, индивидуальных сортовых реакций растений, позволит повысить эффективность адаптации и более эффективно производить посадочный материал.

В связи с постоянно совершенствующимся ассортиментом сортов и подвоев садовых культур и винограда, необходимо индивидуально подбирать протоколы микроклонального размножения, так как существующий ряд проблем, связан, в первую очередь с генотипическими особенностями размножаемых *in vitro* сортов, гибридов и т.д.

Поэтому, направления исследований, связанные с разработкой сортоспецифичных протоколов микроклонального размножения по всем этапам клонального микроразмножения являются актуальными.

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.

Оптимизация состава среды под конкретную культуру и даже сорт может иметь особую важность, ввиду зачастую проявляемой генотипической специфичности реакции растения на условия *in vitro*.

Цель работы - разработать и усовершенствовать методы ускоренного размножения садовых культур и винограда, свободных от вирусных и фитоплазменных патогенов на основе использования методов культуры клеток и тканей *in vitro* и современных методов размножения *in vivo*.

Новизна исследований состоит в отсутствии эффективных протоколов размножения качественного посадочного материала новых перспективных коммерчески привлекательных подвоев, сортов и гибридов садовых культур и винограда, в т.ч. селекции ФГБНУ СКФНЦСВВ (эффективность размножения методом клонального микроразмножения и сортовая специфичность сортов и гибридов не изучена) с использованием биотехнологических приемов размножения в условиях *in vitro* и *in vivo*.

3.2 Объекты, методы, методики и условия проведения исследований

Объекты исследований: клоновые подвои мелкокосточковых культур АИ 1, АИ 11, АИ 70, АИ 71, крупнокосточковых культур ПК СК 1, ПКГ 18/1, ПКГ 18/2, ПКГ 18/3 (селекция СКФНЦСВВ), ПК СК 2 (совместная селекция СКФНЦСВВ и Ставропольской опытно-селекционной станции), Дружба; сорта земляники садовой Кемия, Нелли (селекция СКФНЦСВВ); интродуцированный сорт ежевики Карака Блэк; сорта винограда селекции ФГБНУ СКФНЦСВВ Гранатовый, Достойный и Красностоп АЗОС селекции АЗОСВиВ – филиал ФГБНУ СКФНЦСВВ.

Основное используемое лабораторное оборудование: стерилизатор ВК-30, стерилизатор воздушный ГП-80 СПУ, дистиллятор ДЭ-10, термостат с воздушным охлаждением ТСО-1/80, облучатель-рециркулятор воздуха ультрафиолетовый бактерицидный ОРУБ-3-5 – «КРОНТ», облучатель ОБН-1х30, камера бактерицидная для хранения простерилизованных инструментов «СПДС-3-К», весы аналитические Shinko HTR-220-E, мешалка магнитная C-MAG HS 7, бокс абактериальной воздушной среды БАВнп-01-«Ламинар-С-1,2, бинокулярный стерео микроскоп Kaisa- KS-7045, рН-метр Edge HI 2020, люксметр ТКА-люкс, микродозаторы автоматические Thermo Labsystems и

Biohit с переменным объемом, стеллажи световые, оборудованные лампами люминесцентными и светодиодными.

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, сахароза, фитогормоны, витамины);

- лабораторная посуда, расходные и другие материалы для биотехнологических исследований в культуре *in vitro* (средства дезинфицирующие ОКА-ТАБ, Аламинол, 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 смесей для адаптации растений, 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 2023 год.

Алгоритм работ по микрклональному размножению растений соответствовал общим требованиям и правилам [97-99].

Работы проводились в следующем порядке:

1. Отбор эксплантов с выделенных селекционерами исходных визуально здоровых растений в полевых условиях и в условиях;

2. Введение эксплантов в культуру *in vitro*;

3. Микроразмножение сортообразцов в условиях *in vitro*;
4. Укоренение микропобегов *in vitro*;
5. Адаптация укорененных растений к нестерильным условиям *ex vitro*.

Схема стерилизации растительного материала:

– подготовительный этап: промывка эксплантов в мыльном растворе и часовая промывка под проточной водопроводной водой;

– основная стерилизация проводилась дезинфицирующим средством торговой марки «ОКА-ТАБ», 0,5 % р-ром в течение 7 минут (для винограда 5 минут), 3-х кратная отмывка эксплантов 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 пенициллинках и банках при температуре 24-26°C и 16-ти часовом освещении с интенсивностью 3500-5000 люкс.

В опытах использовали питательную среду по прописи Мурасиге и Скуга (MS) [97], модифицированную среду Реброва А.Н. для винограда [100].

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 (из соотношения между количеством побегов, образовавшихся из одного экспланта, культивируемого *in vitro*, и количеством начальных побегов), размер микропобегов.

На этапе адаптации растения высаживали на субстрат, содержащий готовую почвенную смесь, 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.

Оценку действия инокулята грибов арбускулярной микоризы на рост и развитие подвоев и саженцев яблони определяли по биометрическим показателям растений согласно общепринятым методикам сортоиспытания (Орел, 1999).

3.3 Результаты исследований

3.3.1 Совершенствование протоколов введения в культуру *in vitro*, подвоев косточковых, ягодных культур и сортов винограда

Оценка эффективности стерилизующих веществ на этапе введения клоновых подвоев крупнокосточковых культур.

Поиск эффективных протоколов стерилизации, использование новых дезинфицирующих средств для санации эксплантов при введении в культуру *in vitro* является актуальной задачей. В связи с тем, что экспланты клоновых подвоев серии ПКГ вводились в культуру впервые, в текущем году в качестве дезинфицирующих средств были использованы следующие варианты обработки:

1. Контроль – гипохлорит натрия (NaOCl) в составе бытового средства «Белизна», в разведении 1:3, экспозиция 5 минут;
2. Вариант – дезинфицирующие таблетки «ОКА-ТАБ» (0,5 %), экспозиция 5 минут (испытано ранее на других культурах);
3. Средство «Аламинол» в разведении 1:9, экспозиция 5 мин.

Для оценки эффективности обработки дезинфицирующими средствами использовали следующие показатели: выход жизнеспособных эксплантов, контаминированных эксплантов и гибель эксплантов в результате фитотоксичности препарата (табл. 34). Повторность опыта – трехкратная, по 15 эксплантов в повторности. Учет проводили спустя 10 дней после обработки.

Таблица 34 – Процент приживаемости эксплантов при введении в культуру *in vitro* в зависимости от способа стерилизации

Вариант	Показатель	Сортообразец			
		ПК СК 1	ПК СК 2	ПКГ 18/3	Дружба
Контроль - Белизна 1:3, 5 мин.	Жизнеспособные	85,6	64,1	70,6	74,2
	Контаминация	6,5	13,4	11,0	13,1
	Некроз	7,9	22,5	18,4	12,7
ОКА-ТАБ, 7 мин.	Жизнеспособные	93,1	77,2	78,4	64
	Контаминация	6,9	16,2	13,2	12
	Некроз	0	6,6	8,4	20
Аламинол, 1:9 5 мин.	Жизнеспособные	30,8	68,6	64,5	56
	Контаминация	69,2	10,0	18,2	4
	Некроз	0	21,4	17,3	30

По данным таблицы видно, что вариант с обработкой эксплантов 0,5 %-ным водным раствором дезинфицирующих таблеток "ОКА-ТАБ" подвоем ПК СК 1, ПК СК2 и ПКГ 18/3 показал хороший результат. Эффективность обработки составляла от 77,2 % при обработке подвоя ПК СК 2 до 93,1 %, при обработке эксплантов подвоя ПК СК 1, что выше, чем в контрольном варианте при обработке средством, содержащим гипохлорид натрия, где эффективность варьировала в пределах 64,1-85,6 %. В варианте с обработкой раствором «Аламинола» эффективность была ниже или на уровне с контрольным вариантом, от 30,8 до 68,5 %.

При обработке эксплантов подвоя ПК СК 1 лучшим вариантом была обработка дезсредством «ОКА-ТАБ», эффективность обработки составляет 93,1 %, в контрольном варианте – 85,6 %. Низкую эффективность показало средство «Аламинол», эффективность всего 30,38 %, при этом самый высокий уровень контаминации эксплантов – 69,2 %. Предполагаем, что для повышения эффективности обработки следует попробовать иную концентрацию средства и экспозицию обработки.

При обработке эксплантов подвоя ПК СК 2 также лучшим вариантом была обработка «ОКА-ТАБ», выход жизнеспособных эксплантов составил 77,2 %. В контрольном варианте и в варианте с обработкой средством

«Аламинол» эффективность обработки была примерно одинаковой и составляла 64,1-68,6 %.

Эффективность обработки эксплантов подвоя ПКГ 18/3 варьировала от 64,5 % при обработке «Аламинолом», 70,6 % при обработке «Белизной» до 78,4 % при обработке раствором «ОКА-ТАБ».

Для поверхностной обработки эксплантов подвоя Дружба больше подходит использование раствора гипохлорита натрия (в составе средства «Белизна»). Эффективность обработки составляет 74,2 %. При обработке средством «ОКА-ТАБ» процент жизнеспособных эксплантов составляет 64 %, а при обработке «Аламинолом» - 56 %.

Таким образом, наилучшую эффективность при обработке эксплантов подвоев косточковых культур показал способ поверхностной обработки эксплантов с помощью дезинфицирующих таблеток «ОКА-ТАБ» (0,5 % р-р) в течение 7 мин., выход жизнеспособных эксплантов 64-93,1 %.

Определение оптимальных сроков введения в культуру *in vitro* перспективных клоновых подвоев для мелкокосточковых и крупнокосточковых культур.

Известно, что особенности генотипа культур оказывают более сильное влияние на регенерацию, рост и развитие эксплантов в условиях *in vitro*, чем в обычных условиях. На этапе введения, на регенерацию меристем, помимо генотипа, влияет дезинфицирующее средство, его концентрация и экспозиция, а также период отбора экспланта для введения в культуру и условия отбора (погодные условия, открытый или защищенный грунт).

По многолетним наблюдениям в Краснодарском крае, активный рост побегов плодовых культур отмечается в апреле-мае. При наступлении высоких температур, отсутствии осадков (июнь-июль) активный рост новых побегов снижается. Как правило, к концу лета - началу осени наблюдается вторая волна роста побегов.

В предыдущие годы исследований были определены оптимальный сроки для введения в культуру подвоев АИ 1 (подвой для вишни, черешни) и

ПК СК 1 (подвой для сливы) – это период с начала второй и до конца третьей декады мая.

В текущем году, в культуру *in vitro* впервые вводились новые формы перспективных клоновых подвоев из серии АИ и ПКГ. Для определения наиболее благоприятных сроков введения в культуру экспланты высаживались на искусственные питательные среды в несколько периодов вегетации.

В апреле и мае уровень регенерации эксплантов в культуре варьирует от 32,4-85 %, в зависимости от генотипа подвоя (рис. 55). В целом, у всех подвоев во второй декаде апреля регенерация идет не много слабее, а в период с третьей декады апреля до 3 декады мая уровень регенерации выше и находится, примерно на одном уровне.

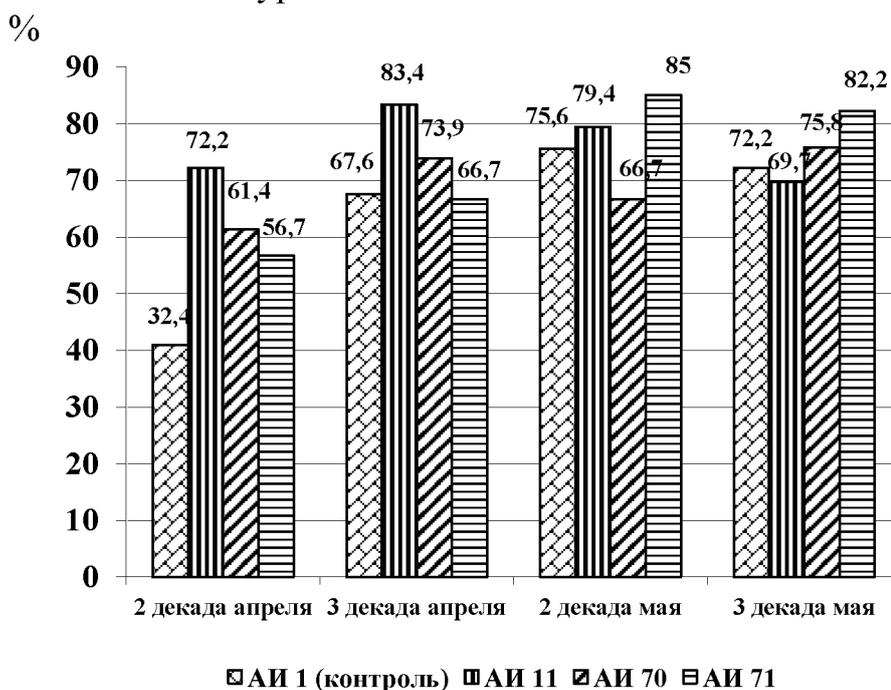


Рисунок 55 – Приживаемость эксплантов подвоев серии АИ при введении в культуру *in vitro*

У подвоя АИ 1, как и в предыдущие годы, наиболее высокий уровень регенерации эксплантов отмечался во 2-3 декаде мая и составлял от 72,2 до 75,6 %. Этот же период наиболее благоприятен и для введения в культуру подвоя АИ 71. Приживаемость эксплантов составляет 82,2-85,0 %. У подвоя АИ 11 наиболее высоки процент приживаемости эксплантов был в третьей

декаде – 83,4 % апреля и 2 декаде мая – 79,4 %. Для подвоя АИ 70 оптимально вводить экпланты с 3 декады апреля по 3 декаду мая, тогда приживаемость составляет 66,7-75,8 %. Процент контаминации экплантов в апреле-мае варьирует от 0 до 36,4 %, не развившихся экплантов от 0 до 22,7 %.

Таким образом, по результатам текущего года видно, что для подвоев серии АИ оптимальным периодом для введения в культуру *in vitro* является период активного роста побегов с 3 декады апреля до начала июня.

У подвоев крупнокосточковых культур серии ПКГ нарастание прироста проходит не так активно, поэтому введение в культуру *in vitro* проводили по мере отрастания побегов, начиная со второй декады апреля (рис. 56). В качестве контроля выбран подвой ПК СК 1, для которого уже установлены оптимальные сроки введения (2-3 декада мая).

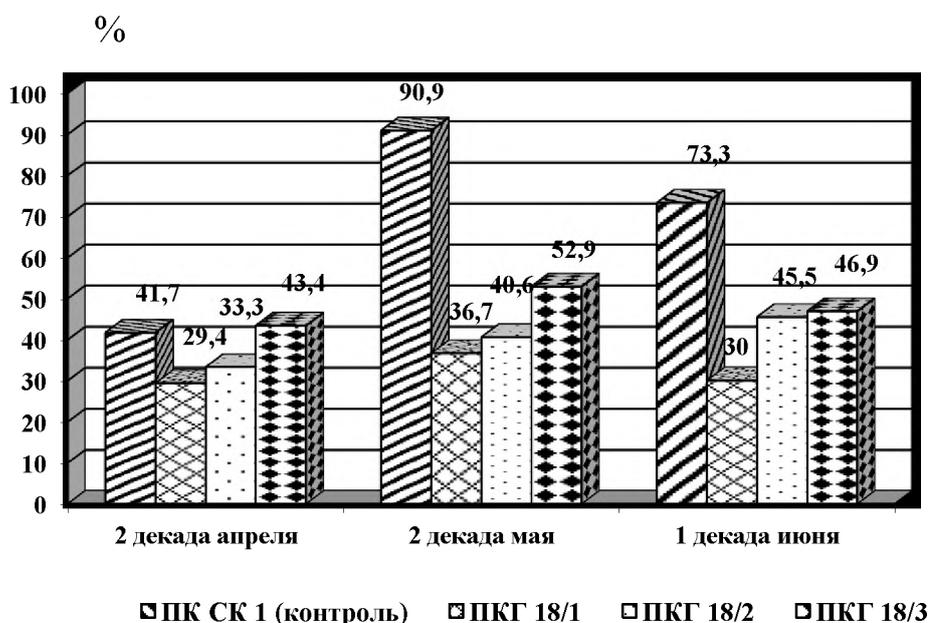


Рисунок 56 – Приживаемость экплантов крупнокосточковых клоновых подвоев

При введении экплантов в период пробуждения почек во 2 декаде апреля, регенерация меристем проходит слабо и составляет 29,4-43,4 %.

Для подвоя ПК СК 1 в текущем году, как и в предыдущие годы, оптимальным периодом введения в культуру является период активного роста побегов, начиная со 2 декады мая. В этот период приживаемость экплантов

составила 90,9 %, к началу июня уровень регенерации начал снижаться до 73,3 %.

У всех подвоев серии ПКГ уровень регенерации был 2-3 раза ниже, чем у ПК СК 1, даже в период активного роста. Приживаемость эксплантов во 2 декаде составляла 36,7-52,9 %, в 1 декаде июня 30-46,9 % (рис. 56).

Уровень контаминации эксплантов во 2 декаде апреля был высокий 20-47,7 %, в последующем снизился до 9,1-31,2 %. У подвоев ПКГ отмечен высокий процент не развившихся эксплантов 23,3 - 46,7 %. Предполагаем, что это связано с последствием стерилизующего средства и еще необходимо провести работу в данном направлении.

Таким образом, в текущем году для подвоев серии ПКГ на сегодняшний день оптимальным периодом для изоляции эксплантов в культуру *in vitro* был период со 2 декады мая до конца 1 декады июня, регенерация меристем составила 30-52,9 %.

Введение сортов винограда селекции ФГБНУ СКФНЦСВВ в культуру *in vitro*.

В отчетном году в культуру *in vitro* вводились сорта винограда Гранатовый, Достойный и Красностоп АЗОС (селекция ФГБНУ СКФНЦСВВ). Для введения сортообразцов была использована питательная среда по прописи Мурасиге-Скуга (MS – контроль) и среда, рекомендуемая для размножения винограда Реброва А.Н. Кроме того, для стимулирования регенерации и развития эксплантов винограда, в один из вариантов, в питательную среду Реброва А.Н. помимо 6-БАП добавили ИУК.

Оценка уровня регенерации меристем показала, что наиболее высокая приживаемость эксплантов была у сорта Гранатовый на модифицированной среде по прописи Реброва А.Н., содержащей 6-БАП и ИУК и составляла 66,7 %, что в 2 раза выше, чем на среде MS (33,3 %) и среде Реброва А.Н., содержащей только 6-БАП (рис. 57).

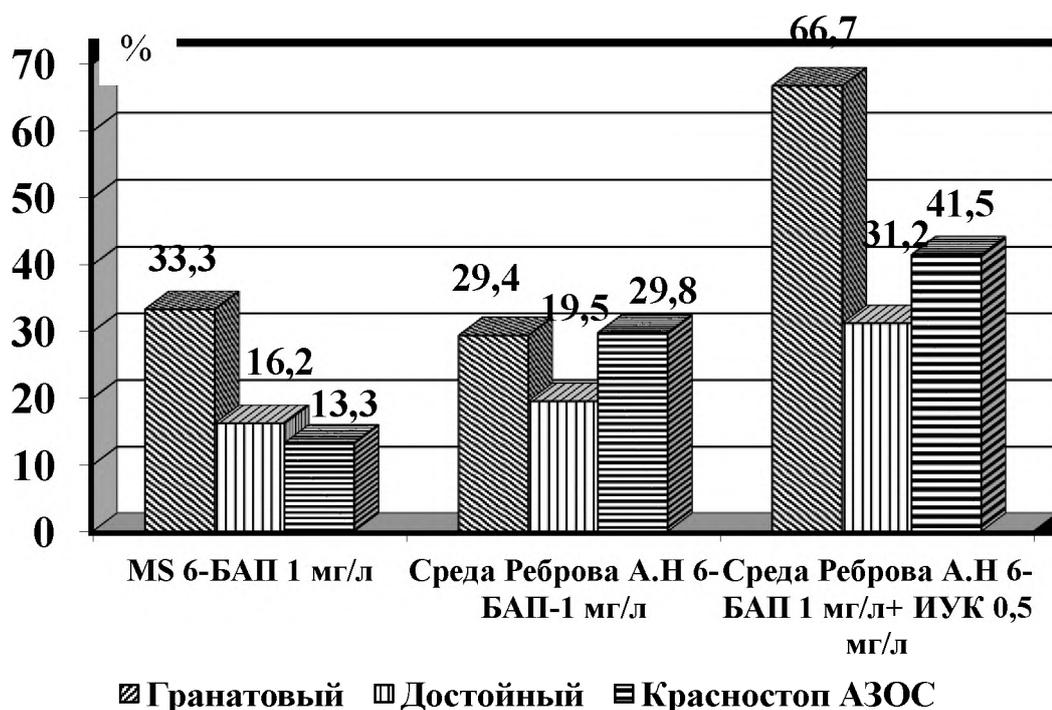


Рисунок 57 – Приживаемость меристем селекционно-ценных генотипов винограда в культуре *in vitro*

У сорта Достойный регенерация меристем на всех вариантах сред проходила на низком уровне и составляла всего и варьировала от 16,2 % на среде MS до 31,2 % модифицированной среде Реброва с 6-БАП +ИУК. У сорта Красностоп АЗОС на среде MS приживаемость эксплантов составляла всего 13,3 %, на модифицированной среде Реброва А.Н. с 6-БАП – 29,8 %. Наиболее высокая регенерация меристем и хорошее развитие эксплантов отмечено в варианте с 6-БАП+ИУК – 41,5 %. Характерно, что в данном варианте еще на этапе введения микропобеги имели 3-5 междоузлия и у некоторых образцов наблюдалось образование корней (рис. 58).

Таким образом, сорт винограда Гранатовый имеет более высокую регенерационную активность по всем вариантам опыта (29,4-66,7 %). Для более эффективной регенерации меристем и развития эксплантов подходит среда Реброва А.Н. с добавлением 6-БАП 1 мг/л и ИУК 0,5 мг/л, регенерация составляет 31,2-66,7 %.



а



б

Рисунок 58 – Микропобеги винограда на модифицированной питательной среде по прописи Реброва А.Н. с содержанием регуляторов роста 6-БАП - 1,0 мг/л + ИУК - 0,5 мг/л:
а – сорт Гранатовый, б – сорт Красностоп АЗОС

Влияние условий отбора инициального экспланта земляники садовой на уровень регенерации эксплантов.

В текущем году проведена оценка эффективности введения эксплантов земляники садовой отобранных с растений, выращиваемых в условиях защищенного грунта (теплица), содержащихся в адаптационном фитотроне и с растений из маточника (табл. 35).

Таблица 35 – Эффективность введения эксплантов земляники садовой *in vitro* (дата введения 29.07.2022 г.)

Сорт (место отбора)	Показатель (%)			
	инфекция	некроз	без регенерации	регенерация
Нелли (из теплицы)	23,5	29,4	29,4	17,7
Нелли (из фитотрона)	10,0	10,0	10,0	70,0
Нелли (маточник)	11,8	0	0	75,4
Кемия (из теплицы)	14,8	18,5	37,0	29,7
Кемия (из фитотрона)	12,5	25,0	0	62,5
Кемия (маточник)	26,3	10,5	0	63,2

В отчетном периоде активное усообразование началось позже обычного, поэтому сорта земляники начали вводить в культуру с третьей декады июля. Введение проводили на среду Мурасиге-Скуга, содержащую 6-БАП 0,5 мг/л.

По данным таблицы видно, что наибольший процент регенерации отмечен в вариантах, когда инициальные экспланты отбирались из фитотрона и из маточника. У сорта Нелли процент регенерации был в пределах 70-78,4 %, у сорта Кемия – 62,5-63,2 %. При отборе эксплантов из теплицы уровень регенерации был наименьшим и составлял у сорта Нелли - 17,7 %, у сорта Кемия – 29,7 %, а уровень не развившихся (не регенирировавших) эксплантов был наоборот высоким: у сорта Нелли – 29,4 %, у сорта Кемия – 37,0 %.

3.3.2 Оптимизация этапов мультипликации, укоренения плодовых и ягодных культур, адаптации ex vitro

Оценка эффективности клонального микроразмножения сортов земляники Кемия и Нелли.

На этапе мультипликации земляники сортов Кемия и Нелли микропобеги были пассированы на среду MS с концентрацией 6-БАП - 0,75 мг/л и 6-БАП – 1,0 мг/л (рис. 59).

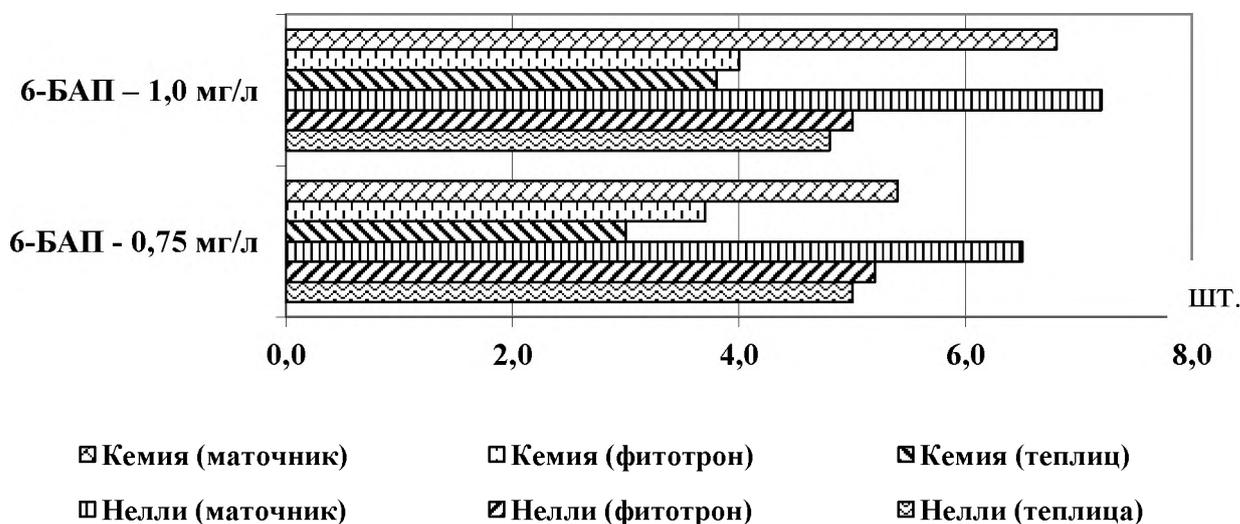


Рисунок 59 – Среднее количество побегов земляники садовой Кемия и Нелли, после 1 пассажа

Анализ данных показал, что в вариантах, когда экспланты отбирались непосредственно из маточника, побегов формировалось больше, чем при отборе из изолированных условий: у сорта Нелли 6,5-7,2 побега/эксп., в зависимости от концентрации 6-БАП, у сорта Кемия 5,4-6,8 побега/эксп.

Среднее количество побегов полученных из эксплантов, отобранных из теплицы и фитотрона у сорта Нелли составило ± 5 шт, у сорта Кемия 3-4 шт (рис. 60).



Рисунок 60 – Микропобеги земляники сорта Нелли (фитотрон) (6- БАП 1,0 мг/л)

Таким образом, для клонального размножения лучше отбирать экспланты из маточника земляники, побегообразовательная способность таких эксплантов на этапе мультипликации выше, чем у эксплантов отобранных из изолированных условий (фитотрон, теплица), у сорта Нелли в 1,3-1,5 раза, у сорта Кемия в 1,6-1,7 раза.

Влияние концентрации 6-БАП на эффективность клонального микроразмножения ежевики сорта Карака Блэк.

Главная задача клонального микроразмножения растений состоит в получении максимального количества качественных микропобегов, за короткий период времени.

В текущем году в работу по клональному микроразмножению ягодных культур ввели ежевику, с целью ознакомления с методикой ее размножения, для дальнейшей работы с этой культурой. На этапе мультипликации ежевики проводилась оценка влияния концентрации 6-БАП на эффективность размножения. При пересадке растений по вариантам опыта использовали микрочеренки ежевики длиной 1-1,5 см, содержащие в среднем 2 узла.

Учет проводили спустя 4 недели культивирования.

Анализ полученных результатов показал, что на средах с добавлением 6-БАП в количестве 0,5 и 0,75 мг/л формируется больше побегов, готовых к этапу укоренения (рис. 61).

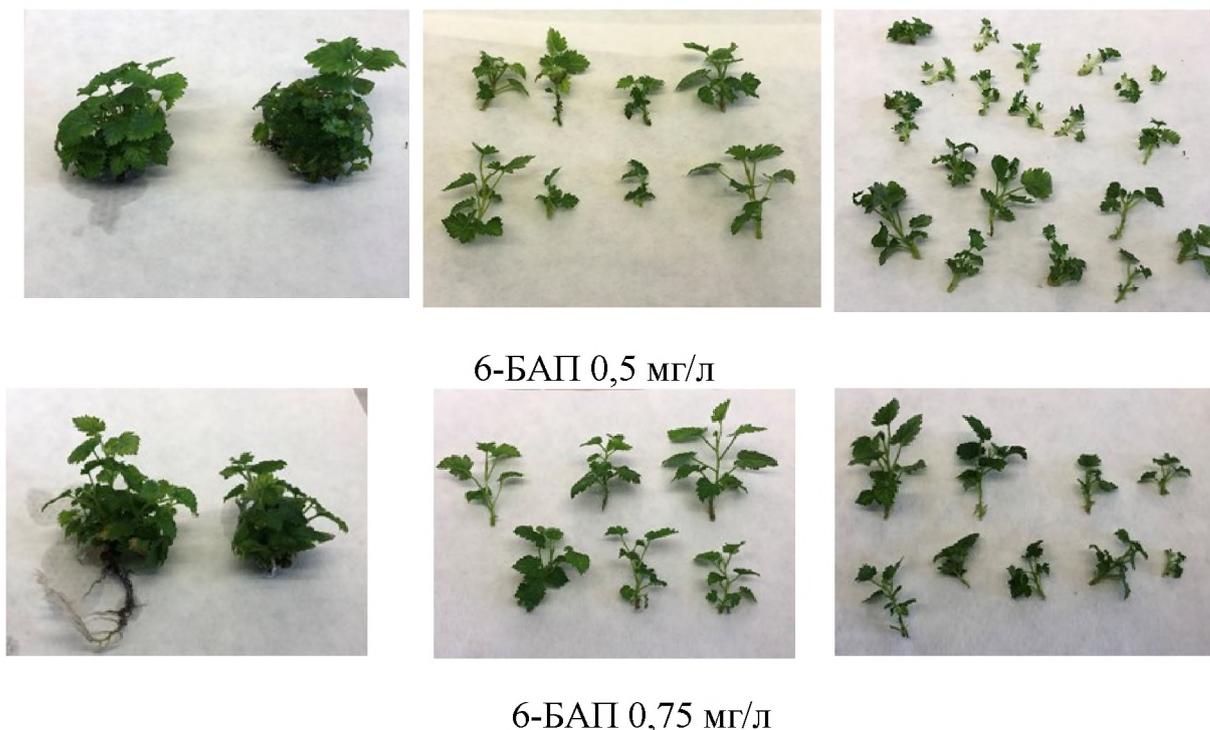


Рисунок 61 – Микропобеги ежевики Карака Блэк

На среде с 6-БАП 0,5 мг/л образуется в среднем 8 микропобегов (максимально 19 шт./ эксплант), из которых около 50 % побегов имеет длину более 2 см и таким образом, подходят по длине побега для пересадки на среду для укоренения (рис. 62). На среде с 6-БАП 0,75 мг/л коэффициент размножения в среднем составляет 1:7,5 (максимальное количество побегов 10 шт.), при этом, около 90 % этих побегов имеют размер, подходящий для этапа ризогенеза.

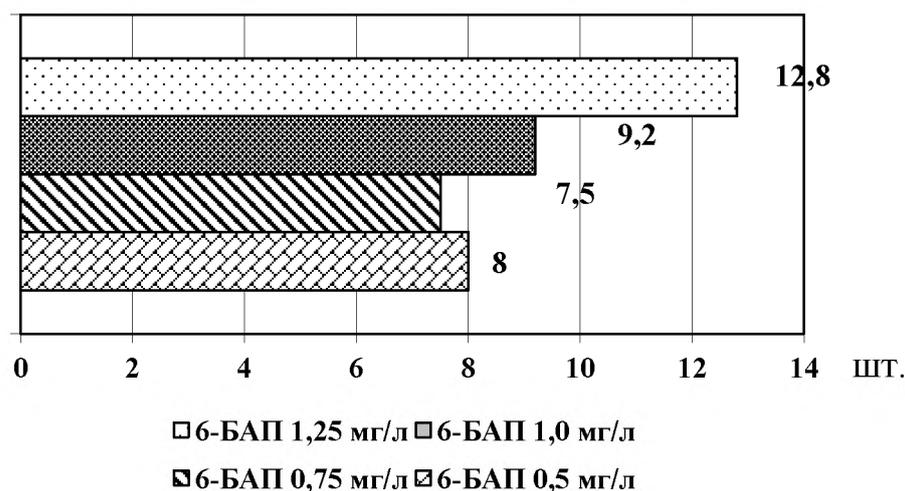


Рисунок 62 – Средний коэффициент размножения ежевики сорта *Карака Блэк* в зависимости от концентрации 6-БАП

На среде с добавлением 6-БАП в количестве 1,0 мг/л в среднем формировалось по 9,2 побега (максимально 15 побегов с одного экспланта) (рис.62). В варианте с концентрацией 6-БАП 1,25 мг/л количество побегов образующихся из одного экспланта составляло в среднем 12,8 шт. (максимально 21 побег). Однако, большая часть побегов из этих вариантов 82-93 % имела размер менее 1,5 см и требовала дополнительного пассажа для доращивания (рис. 63).



Рисунок 63 – Побеги ежевики сорта *Карака Блэк*, образовавшиеся на среде с 6-БАП 1 мг/л

Таким образом, для получения наибольшего количества микропобегов ежевики сорта *Карака Блэк*, на этапе мультипликации следует вводить в среду 6-БАП в количестве 1,0-1,25 мг/л, при этом формируется 9,2-12,8

побегов/эксплант. На этапе, предшествующему укоренению, следует снизить количество 6-БАП до 0,5 мг/л, при этом формируется в среднем 8 побегов/эксп. размером около 2 см и уже пригодных для этапа укоренения.

Оптимизация этапа укоренения подвоя мелкокосточковых культур АИ 11 с использованием ФитАктив Экстра Плюс

На этапе ризогенеза подвоя АИ 11 был использован новый способ укоренения с ФитАктив Экстра Плюс, КЭ.

ФитАктив Экстра Плюс, КЭ – это стимулятор корнеобразования в виде геля, действующим веществом которого является ауксин-фуллереновый комплекс – фитогормон, стимулирующий образование корней. Используется для укоренения одревесневших и зелёных черенков [101].

Основание побега обмакивали в геле в геле и высаживали на безгормональные среды MS с содержанием разных форм железа (Fe-EDTA и Fe-EDDHA (100 мг/л). Результаты сравнивали с результатом укоренения на тех же по составу средах, но содержащих ауксин ИМК в количестве 1,0 мг/л.

Первые признаки корнеобразования в варианте с обработкой ФитАктив Экстра Плюс, КЭ начали появляться спустя 10 дней после пересадки. Учет проводили спустя 30 дней. Данные представлены в таблице 36.

Таблица 36 – Результаты укоренения подвоя АИ 11

Вариант среды	Тип ауксина	Процент укоренения	Среднее количество корней, шт.	Средняя длина корней, см
MS с Fe-EDTA	ИМК 1 мг/л	32	1,4	2,8
	ФитАктив Экстра Плюс, КЭ	65	2,9	3,0
MS с Fe-EDDHA	ИМК 1 мг/л	36	1,8	2,5
	ФитАктив Экстра Плюс, КЭ	50	6,2	6,5

По данным таблицы видно, что при использовании геля ФитАктив Экстра Плюс, процесс корнеобразования идет более эффективно, образуется большее количество корней, при этом, имеющих корневые волоски (рис. 64).

В варианте с использованием ФитАктив Экстра Плюс процент укоренившихся эксплантов составляет 50 % на среде MS с Fe-EDDHA и 36 % на среде с ИМК, на среде MS с Fe-EDTA и фитогелем корнеобразование прошло у 65 % побегов, на среде с MS с Fe-EDTA +ИМК у 32 % побегов. На обеих средах, содержащих ИМК, у всех побегов образовался каллус, а среднее количество корней было минимальным 1,4-1,8 шт. длиной 2,5-2,8 см (рис. 64 в).



а) MS с Fe-EDDHA + ФитАктив Экстра Плюс



б) MS с Fe-EDTA + ФитАктив
Экстра Плюс

в) MS с Fe-EDTA + ИМК – 1 мг/л

Рисунок 64 – Укорененные микропобеги подвоя АИ 11

На среде с обычной формой хелата железа (Fe-EDTA) у побегов обработанных ФитАктив Экстра Плюс формировалось в среднем по 2,9 корня длиной по 3 см, на среде MS с Fe-EDDHA и ФитАктив Экстра Плюс эти показатели были в 2 раза выше: корней формировалось много - в среднем по 6,2 корня на растение, длиной 6,5 см.

Применение геля ФитАктив Экстра Плюс на этапе укоренения подвоя АИ 11 способствует более активному образованию корней. Процент укоренения выше на 14 % -33 % (в зависимости от формы хелата железа), чем при использовании ИМК 1 мг/л. На среде MS с Fe-EDDHA при использовании ФитАктив Экстра Плюс количество корней выше в 3,4 раза, а их длина в 2,6 раза, чем на средах с ИМК.

Оценка влияния препарата Рибав Экстра на развитие растений ежевики при адаптации ex vitro

Этап адаптации микропобегов к условиям *ex vitro*, является завершающим этапом клонального микроразмножения. Успешность адаптации зависит от многих факторов, в том числе: от вида растения, состава субстрата, абиотических факторов культивирования (интенсивности освещения, влажности и температуры воздуха). Поэтому важно создать оптимальные условия, при которых надземная часть и корневая система будут активно развиваться.

Для адаптации растений ежевики сорта Фридом использовали субстрат, состоящий из питательного грунта для растений марки «Садовая земля», вермикулита, перлита в соотношении 3:1:1. 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 использовали универсальный регулятор роста «Рибав Экстра» (1 мл/10 л воды), контроль – полив водой без регулятора.

После пересадки растения пролили раствором «Рибав Экстра», кассеты с микрорастениями поместили в микропарники для поддержания оптимальной влажности воздуха 95 % (рис. 65 а). Спустя 2 недели адаптации постепенно начали снижать влажность воздуха. За 3 недели растения ежевики адаптировались.



а



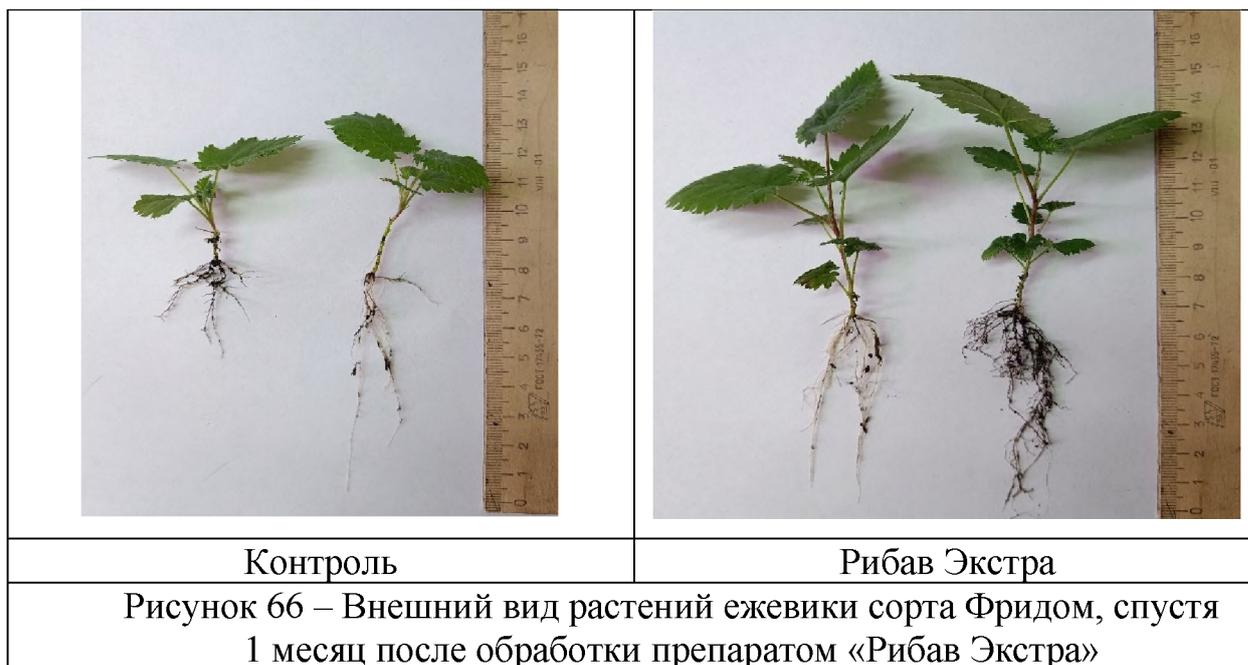
б

Рисунок 65 – Адаптация ежевики: а – микрорастения после пересадки в микропарник, б – адаптированное растение ежевики через 1,5 месяца

Адаптация в контрольном и опытном вариантах составила 95-98 %. Адаптированные растения пересадили в контейнеры большего объема (рис. 65 б), при этом оценили развитие корневой системы и надземной массы.

В контрольном варианте корневая система состояла из 4-5 корешков, длиной 2-4 см, отдельные корни до 7 см, высота надземной части растений составила 3-4 см, количество нормально развитых листьев 3-4 шт. (рис. 66).

Варианте с обработкой «Рибав Экстра», корневая система имела более развитую мочковатую систему с многочисленными корнями (до 10 и более шт.) длиной до 6,5-7 см (средняя длина основной массы корней - 4 см).



Высота надземной части растений была от 5 до 8 см, с 4-8 развитыми листьями.

Таким образом, однократная обработка универсальным регулятором «Рибав Экстра» микропобегов ежевики сорта Фридом при адаптации способствует развитию растений и улучшает показатели роста.

3.3.3 Модификация технологии размножения растений косточковых культур *in vitro* (на примере подвоя ПК СК 1)

Подвой косточковых культур селекции СКФНЦСВВ являются перспективными для использования в Северо-Кавказском регионе, так как они адаптированы к нашим почвенно-климатическим условиям. В коллекции растения находятся в ограниченном количестве, некоторые в единичных экземплярах, поэтому требуется наработка посадочного материала для дальнейшего сортоизучения. Метод клонального микроразмножения является одним из способов вегетативного размножения растений, поэтому его использовали для размножения подвоя ПК СК 1, провели оценку эффективности размножения подвоя этим способом и в результате

многочисленных исследований модифицировали технологию, подобрав оптимальные параметры для каждого этапа размножения.

1. Этап введения эксплантов в культуру *in vitro* включает в себя отбор вводимого материала, стерилизацию и вычленение эксплантов, создание оптимальных условий для регенерации и их развития на среде.

Лучшим периодом для изолирования эксплантов в культуру *in vitro* является 2-3 декада мая, когда экспланты отбираются с активно растущих побегов. Приживаемость эксплантов в этот период составляет от 83,3 до 93,1 %. Успешность регенерации во многом зависит от стерилизации материала. Для этого отобранный растительный материал промывают в мыльном растворе и в течение часа под проточной водой. Основную обработку проводят 0,5 % -ным раствором дезинфицирующего средства «ОКА-ТАБ» в течение 5 минут. Затем экспланты не менее 3 раз промывают в стерильной дистиллированной воде, эффективность обработки до 85-90 %, в зависимости от периода и условий отбора.

Размер изолированного растительного экспланта 1,0-3,0 мм.

Наиболее эффективно регенерация вычленяемых эксплантов клонового подвоя ПК СК 1 проходит на среде Мурасиге-Скуга с добавками (мг/л): тиамин – 0,1; пиридоксин, никотиновая кислота – по 0,5; глицин – 2; мезоинозит – 100; сахароза – 30000; 6-БАП – 0,3 мг/л, агар-агар – 6700; рН – 5,8.

Через 3-4 недели культивирования проводят пересадку развившихся эксплантов на свежую питательную среду.

2. Собственно микроразмножение. Цель данного этапа – получение наибольшего количества побегов от каждого экспланта путем последовательного субкультивирования их на свежую питательную среду через 3- недели (в зависимости от состояния побегов).

Оптимальным вариантом сред для микроразмножения подвоя ПК СК 1 является среда MS с добавлением Fe-EDDHA в количестве 100 мг/л (вместо Fe-EDTA) и 6-БАП в количестве 0,75-1,0 мг/л, при этом

формируется 9-10 новых побегов с одного экспланта. Изменение в темпах роста и развития побегов зависит от концентрации 6-БАП, количества и длительности субкультивирований. Количество пассажиров для подвоя ПК СК 1 не более 10, с 4-го пассажира можно начинать укоренение побегов.

3. Этап ризогенеза. Для укоренения используют побеги длиной не менее 2 см. На данном этапе используется среда MS, с половинным содержанием макросолей, добавлением Fe-EDDHA (вместо Fe-EDTA) в количестве 100-200 мг/л, полным набором микроэлементов, витамины: тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота по 0,5 мг/л, мезоинозит – 50 мг/л, сахароза – 20000 мг/л, агар-агар – 6700 мг/л.

Образование корней у подвоя ПК СК 1 проходит на данной среде и без ИМК. Эффективность корнеобразования составляет 57,1-61,8 %, при этом образуется в среднем 2,4 корня, длиной от 1,2- до 5,1 см (Получен патент на изобретение № 2779139 «Способ получения микрорастений подвоя косточковых культур (ПК СК 1)» Супрун И.И., Винтер М.А., Федорович С.В., Лободина Е.В., Авакимян А.О., Аль-Накиб Е.А. // Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ 01.09.2022 г.).

При добавлении в среду ИМК в количестве 1,5-2,0 мг/л, процент корнеобразования составляет 80-100 %, образуется 4,1-7 корней, длиной от 1,6 до 2,9 см. Однако, при этом больше образуется не качественных, хрящеватых, ломких корней, что отразится при адаптации растений.

4. Этап адаптации микропобегов. Для пересадки растений в почву отбирают укорененные побеги высотой не менее 2 см, имеющие 2 и более корней длиной не менее 2-3 см. Длинные корни укорачивают до длины 3-4 см. В качестве субстрата, состоящий из питательного грунта для растений «Агробалт», вермикулита, перлита в соотношении 3:1:1. Адаптацию проводят в микропарниках при температуре +22...+26 °С, освещенности 4,5 тыс. люкс, при фотопериоде 16/8 (день - 16 часов, ночь - 8 часов).

После 4 недель адаптации пересаживаются в контейнеры с почвенным субстратом большего объема.

В результате выполнения исследований разработана технология «Способ укоренения микрорастений подвоев сливы домашней» (ТИ 01.30.10.132 – 176 – 00668034-2022) (Приложение Г).

3.3.4 Оптимизация минерального питания тиражированных маточных растений в ампелоценозе маточника

Для природно-климатических условий Черноморской зоны виноградарства Краснодарского края основными источниками риска воздействия негативных абиотических факторов на рост и развитие растений являются: продолжительность засушливого периода (лето), усугубляемая ветрами, снижение в летний период запасов продуктивной влаги в корнеобитаемой зоне винограда, эдафические факторы. При этом имеют место функциональные повреждения кустов винограда, которые способствуют нарушению стабильности плодоношения, снижению продуктивности, ухудшению качества винограда и, как следствие потере конкурентоспособной продукции на рынке винограда и вина. Исследуя взаимодействие компонентов в системе «виноградное растение-среда», приоритетным является изучение функционального состояния растений, массы товарного урожая, выхода лозы и их качественных показателей под влиянием специальных агроприёмов. Одним из приёмов агротехники, реально оказывающим ощутимое влияние на стабилизацию функционирования сельскохозяйственных растений являются агрохимикаты сложного состава, содержащие органические и минеральные компоненты, полученные в едином технологическом процессе. Оптимизация режимов и способов их применения обеспечивают повышение устойчивости растений в условиях нестабильной среды, активизируя метаболические процессы и процессы, связанные с накоплением запасных питательных веществ.

Качество посадочного материала винограда определяет продуктивность и долговечность ампелоценоза в целом. Необходимые объемы саженцев для развития отрасли виноградарства в России и уровень соответствия

посадочного материала утвержденным нормам и стандартам зависит от функционального состояния и вегетативной продуктивности маточных насаждений, которые в значительной мере определяются обеспеченностью минеральным питанием. Оптимальный питательный режим маточных растений винограда наиболее актуален в современных нестабильных условиях среды, вызванных действием абиотических факторов (низкие температуры, возвратные заморозки, летняя засуха и др.), провоцирующих стрессовые состояния у растений, а также в условиях несоответствия эдафических факторов биологическим требованиям винограда.

Биологизация системы удобрения маточника предполагает также разработку комплекса мероприятий, дополняющих технологическую схему применения удобрений визуальной и химической диагностикой состояния растений и почвы, а также внедрением биоминеральных удобрений пролонгированного действия и эффлюентов для основного внесения в почву, некорневых и внутрпочвенных подкормок. Проведенные многочисленные экспериментальные исследования подтверждают эффективность биологизированной системы оптимизации режима питания растений винограда, стимулирующей силу роста и регенерацию маточных растений, качество и выход стандартных черенков, повышающей уровень эффективного плодородия почвы, доступность минеральных элементов для растений.

Подкормки прикорневые и некорневые приурочиваются ко времени наибольшей потребности растения в элементах питания – начало вегетации, периоды наибольшей ростовой активности.

Так, период наивысшей активности ростовых процессов у винограда (побеги, корни) совпадает с максимально высокими значениями весенней среднесуточной температуры воздуха, обильными осадками и, соответственно повышенной влажностью воздуха. В начале периода ростовой активности, весной, проводят корневые подкормки биоминеральными удобрениями пролонгированного действия. В этот период наблюдается интенсивное поступление воды в растения. Активное поступление воды по проводящим

тканям на узлах побегов и у почек способствует активации дыхания и ферментов, переводящих органические соединения (крахмал) в растворимые (сахара). В этот период питательные вещества способствуют усилению энергии деления клеток, происходит энергичный рост верхушки и междоузлий эмбрионального побега. Этот период рассматривается как один наиболее критических периодов развития растений винограда, требующий усиления минерального питания, что обуславливает необходимость проведения подкормки. Пролонгированный характер биоминеральных удобрений обеспечивает постепенное высвобождение элементов питания, обеспечивая оптимизацию питательного режима растений в течение вегетационного периода, в том числе для накопления запаса питательных веществ в многолетних частях виноградного куста и побегах, что повышает их зимостойкость.

В летний период напряженности гидротермических факторов анализировали содержание общей воды в растении и водоудерживающую способность. Известно, что поддержание необходимого водного баланса зависит преимущественно от запасов почвенной влаги и активности корневой системы, а при кратковременном дефиците воды растение способно само регулировать интенсивность транспирационных процессов, процессов поглощения воды, обеспечивающих стабилизацию его функционального состояния. Было определено, что при применении препарата «Биоконцентрат-Z» некорневым методом содержание общей воды и водоудерживающая способность листьев была выше в сравнении с вариантом «контроль» (без обработок): содержание общей воды в листьях составляло в среднем 77,2 %, что на 3,1 % выше, чем в контрольном варианте. Содержание свободной воды в листьях побегов также было выше на 3,9 %. Водоудерживающая способность значительно превысила данные, полученные в варианте «контроль» (на 56 %). Этому соответствовало и более высокое содержание в листьях ионов калия (превышение содержания над контрольным вариантом в 2,4 раза), который играет значительную роль в оводненности клеток. При этом на фоне обработок

площадь листовой поверхности у растений была больше на 3,4-4,2 % в зависимости от дозы применяемого препарата.

В период созревания урожая исследовали метаболическую активность растений винограда. Листьев характеризуют растения, обработанные препаратом, как более устойчивые. Выявлено влияние некорневых обработок на увеличение содержания в листьях органических кислот. Содержание аскорбиновой кислоты, тесно связанной с ферментативной системой растений и принимающей участие в дыхательном газообмене ткани, возросло более чем в 4 раза в сравнении с контрольным вариантом. Содержание винной кислоты возросло более чем в 2 раза.

В варианте с более благоприятным водным режимом на фоне применения некорневых обработок, в августе, несмотря на депрессию фотосинтеза, вызванную дефицитом влаги и высокими температурами воздуха (32-33 °С продолжительное время), выявлена более интенсивная ассимиляционная активность у растений винограда. Суммарное содержание зеленых пигментов составило 4,41 мг/г сух. в-ва, что на 26,4 % выше, чем в контрольном варианте, что характеризует более высокую устойчивость пигментного комплекса. Содержание в листьях хлорофилла «а» превышало значение показателя в контрольном варианте на 20,6 %, а хлорофилла «в» – на 42,3 %. Количество каротиноидов, предохраняющих зеленые пигменты от избыточного действия солнечной энергии и окисления, было также несколько выше (на 25,6 %). При этом в соотношении суммарного количества зеленых пигментов и каротиноидов различий между вариантами не наблюдалось.

Динамику роста побегов анализировали на различных этапах развития растений винограда. Суммарное количество атмосферных осадков в апреле (62 мм) способствовало активации ростовых процессов в мае. На отдельных учетных кустах винограда длина побегов превышала показатель в контрольном варианте до 18,8 % (рис. 67), однако в среднем по вариантам и по результатам статистической обработки данных различия были не существенны (табл. 37).



а



б

Рисунок 67 – Длина побегов в мае: *а* – контроль, без некорневых подкормок, *б* – некорневые подкормки растений препаратом «Биоконцентрат-Z» в дозе 1,0 л/га

Проведенные во второй половине вегетации (при дефиците атмосферных осадков) агробиологические учеты выявили более интенсивный процесс роста побегов у растений винограда на фоне применения препарата «Биоконцентрат-Z» (табл. 37).

Таблица 37 – Динамика роста побегов у растений винограда в зависимости от применения препарата «Биоконцентрат-Z», см

Вариант	Дата				
	20 мая	12 июня	20 июля	10 августа	17 сентября
Контроль	16,5	49,6	77,0	122,1	178,1
Биоконцентрат-Z 0,5 л/га	16,4	50,9	85,5	131,9	206,8
Биоконцентрат-Z 1,0 л/га	16,5	50,4	81,6	130,7	203,5
<i>НСР₀₅</i>	<i>0,34</i>	<i>0,56</i>	<i>3,34</i>	<i>6,27</i>	<i>11,68</i>

Использование почвенно-растительной диагностики для оптимизации питания растений винограда в маточнике способствует рациональному применению удобрений, своевременному восстановлению баланса

питательных веществ в растениях, поддержанию необходимого уровня эффективного плодородия почв в ампелоценозе.

Пролонгированный характер используемых биоминеральных удобрений позволяет снизить кратность их основного внесения, экономя ресурсы и снижая техногенную нагрузку на почву.

Преимущественное использование биоминеральных удобрений в жидком виде упрощает процесс приготовления рабочих растворов препаратов и позволяет совмещать опрыскивание растений с обработкой виноградника средствами защиты растений.

Комплексные многофункциональные составы органоминеральных удобрений способствуют повышению устойчивости растений к негативным абиотическим факторам среды.

Применяемая биологизированная система удобрения маточных растений винограда обеспечивает увеличение количества побегов на куст на 7,7-13,0 %. Средняя длина побегов возрастает в среднем на 16,8-36,3 % в зависимости от сорта.

На основе выполненных исследований разработана технологическая инструкция «Технология оптимизации минерального питания тиражированных маточных растений в ампелоценозе маточника» (ТИ 01.60.10.290 – 181 – 00668034-2022) (Приложение Д).

3.3.5 Совершенствование технологии создания базисных маточников на основе применения оздоровленного *in vitro* посадочного материала винограда

Для получения посадочного материала высших категорий качества используются инновационные подходы, основанные на применении биотехнологических методов, а именно технологии клонального микроразмножения винограда *in vitro*, позволяющие в короткое время провести интенсивное размножение исходного первичного материала, который не имеет в себе инфекционных начал вирусного, бактериального и

микоплазменного характера. Технология основана на культивировании тканей, клеток и частей растений винограда в стерильных условиях (*in vitro*) на искусственных питательных средах.

Для производства сертифицированного посадочного материала необходимо создание базисных маточников, свободных от карантинных болезней (грибных, вирусных, бактериальных, микоплазменных).

Процесс оздоровления растений винограда с помощью метода *in vitro* делится на три этапа:

Этап 1. Отбор эксплантов и введение их в культуру. В качестве исходного материала используются зеленые побеги, взятые с вегетирующих кустов винограда и выращенные в лаборатории из вызревшей лозы, а также почки вызревших и невызревших побегов, из которых вычлняются меристематические ткани. На данном этапе необходимо добиться хорошо растущей стерильной культуры, что осуществляется путем стерилизации растительных тканей 0,5%-м хлорсодержащим раствором (таблетки ОКА-ТАБ, содержащие 50% активного хлора) в течение 5 минут с 3-х кратной промывкой дистиллированной водой.

Этап 2. Микроразмножение. Необходимо добиться получения максимального количества мериклонов. Культивирование проводится на питательной среде по прописи Мурасиге-Скуга, модифицированной Медведевой Н.И. и Реброва А.Н. в пробирках. Добавление в питательную среду цитокинина 6-БАП (в первом пассаже – 1,0 мг/л, со второго пассажа – 1,5 мг/л) индуцирует развитие многочисленных пазушных побегов. Культивирования первичных эксплантов в течение 20 – 30 дней в зависимости от генотипов в беспересадочной культуре показали, что повышенная регенерационная активность меристем винограда составила для сорта Цитронный Магарача – 100%, подвоя: Берландиери x Рипариа Кобер 5 ББ – 93,3%, Берландиери x Рупестрис Рюгжери 140 – 88,9%.

Этап 3. Укоренение полученных микропобегов. Осуществляется на питательной среде Мурасиге-Скуга с уменьшенным содержанием (1/4)

макроэлементов, сахарозы (10 г/л) + 0,1 мг/л ИУК. Микрорастения размещаются в культуральную комнату с соответствующими условиями: освещенность 3-4 тыс. люкс, температура 21 – 23 °С и относительная влажность воздуха 65 – 70 %.

В культуральной производится дорастивание растений винограда *in vitro* с целью последующей адаптации их к нестерильным условиям. Оздоровленные вегетирующие саженцы с закрытой корневой системой после дорастивания, адаптации и закалки высаживаются в открытый грунт или теплицу для создания базисного маточника винограда.

После высадки в открытый грунт оздоровленных базисных растений очень важно создать благоприятные условия в первые годы их жизни, так как в этот период происходит закладка основы виноградного куста, от которой зависит дальнейшая продуктивность и долговечность промышленных насаждений.

Установлено, что высадку оздоровленных методом *in vitro* вегетирующих саженцев желательно осуществить не позднее первой декады мая, когда почва на глубине посадки достаточно прогреется. Для снижения риска подмерзания корневой системы посадка саженцев производится в траншеи шириной и глубиной 35-40 см. Оптимальная схема посадки – 3,0 м x 1,0 м для привойных сортов винограда и 3,0 м x 1,5 м для подвоев, ширина междурядий 3,0-3,5 м. Благодаря правильно подобранным способам посадки, приживаемость растений, высаженных на маточнике, в первый год составляет около 90 %. Через 4-5 лет растения вступают в полную силу лозоношения. Расстояние между кустами должно быть такое, чтобы оптимально загрузить побегами шпалеру, не допускать загущения пространства кустов побегами при их вертикальном расположении или незаполненных участков шпалеры. Оптимальное количество от 12 до 16 побегов на 1 м погонный шпалеры.

Хорошему развитию базисных растений способствует внесение стартового комплекса минерального питания. Эффективным при посадке является внесение комплексного минерального удобрения Грин Го 8-16-

24+10CaO+микро (50 г/растение), содержащего в своем составе макро- и микроэлементы: общий азот (N) – 8 %, нитратный азот – 8 %, фосфор (P₂O₅) водорастворимый – 16 %, калий (K₂O) водорастворимый – 24 %, кальций (CaO) водорастворимый – 10 %, бор (B) водорастворимый – 0,05 %, медь (Cu) хелат ЭДТА – 0,008 %, железо(Fe) хелат ДТПА – 0,15 %, марганец (Mn) хелат ЭДТА – 0,10 %, молибден (Mo) водорастворимый – 0,008 %, цинк (Zn) хелат ЭДТА – 0,05 %, а также применение природного минерала глауконита как отдельно (80 г/растение), так и с добавлением минеральных удобрений NPKMgS (25 г/растение).

При высадке в открытый грунт вегетирующих оздоровленных саженцев отмечается сортовая специфика, которая выражается в различной степени адаптивности сортов к абио- и биотическим условиям. Большинство высаживаемых сортов при соблюдении основных правил закладки базисного маточника хорошо приживаются, развиваются и соответственно сохраняются.

На основе исследований разработана технологическая инструкция: «Технология создания базисных маточников из оздоровленного *in vitro* посадочного материала винограда» (ТИ 01.61.10.290-179-00668034-2022) (Приложение Е).

3.3.6 Разработка технологии производства высококачественного посадочного материала с использованием механизма симбиоза растений и микроорганизмов

Необходимость увеличения производства высококачественного посадочного материала плодовых в условиях усиления воздействия абиотических и биотических стрессов на агроэкосистемы в современных условиях трансформации климата, потребовала новых подходов к усовершенствованию существующей технологии производства.

На протяжении ряда лет проводился многолетний эксперимент, направленный на оценку пролонгированного влияния биопрепарата на основе грибов арбускулярной микоризы на рост и развитие растений яблони.

Одним из эффективных приемов стимуляции ростовых процессов для достижения растениями размеров, соответствующих действующему национальному стандарту РФ – ГОСТ Р 59653-2021, является использование механизма симбиотического взаимодействия грибов арбускулярной микоризы (АМ) и корневой системы растений.

Использование биопрепарата на основе симбиотических грибов *Glomus sp.* увеличивает биологический потенциал растений в питомнике, улучшает их рост и развитие, оказывает наибольшее влияние на формирование адаптационной устойчивости растений к абиотическим стрессам летнего периода в условиях увеличения амплитуды изменчивости метеофакторов.

В условиях стресса от засухи АМ способна влиять на движение воды, усиливая гидратацию и физиологические процессы у растений, стимулировать рост растений через влияние на структуру почвы: гифы грибов улучшают структуру почвы, связывая ее частицы и производя гломалин, который способствует удержанию влаги в почве. Следовательно, микоризованные растения обладают высоким водным потенциалом и могут ускорять рост растений яблони более быстрыми темпами.

Растения с микоризой способны более эффективно поглощать питательные вещества из почвы. Благодаря большей площади поверхности и проникновению грибных гиф в тончайшие почвенные поры, недоступные корням, для растений создаются более благоприятные условия конкуренции за азот со свободно живущими в почве микроорганизмами. При этом поглощение азота корнями с внедренной в них микоризой увеличивается в пять раз в сравнении с корнями немикоризованных растений.

Таким образом, в условиях стресса высокое усвоение питательных веществ растениями, обработанными АМ, а также наличие у них усиленного роста и большей площади поверхности корней повышают общую толерантность растений к неблагоприятным факторам, что в конечном счете увеличивает выход высококачественного посадочного материала.

До настоящего времени в Российской Федерации не разработаны нормативные документы, регламентирующие технологию применения биопрепаратов, основанных на использовании симбиотического

взаимодействия грибов арбускулярной микоризы и корневой системы растений в питомнике плодовых культур.

В этой связи оценка влияния биопрепарата на основе симбиотических грибов *Glomus sp.* на ростовые и продукционные процессы растений яблони в питомнике весьма актуальна и имеет существенный прикладной аспект.

Объекты исследований – слаборослые подвои яблони СК 3 и СК 7, а также саженцы яблони сорта Прикубанское, выращенные на этих подвоях.

СК 3. Очень слаборослый подвой яблони для садов интенсивного типа. Выведен в СКФНЦСВВ в результате направленного скрещивания сорта яблони Боровинка и подвоя М8. Подвой включен в Госреестр селекционных достижений РФ с 2002 г. Весьма перспективен также для фермерского и любительского садоводства.

В маточнике куст слаборослый, корневая система мочковатая, при хорошем окучивании многоярусная, хрупкая. В саду деревья на этом подвое очень слаборослые – на 25-30 % ниже, чем на подвое М 9. Привитые деревья отличаются скороплодностью – плодовая почка образуется уже в питомнике, промышленное плодоношение наступает на 2-3-й год. Деревья высокоурожайные, с отличным качеством плодов. Установка опоры необходима уже с первого года жизни, так как ранняя нагрузка плодами на фоне хрупкой корневой системы приводит к наклонам и поломкам деревьев, усложняет формирование кроны.

СК 7. Карликовый подвой, перспективный для садов интенсивного типа. Выделен в СКФНЦСВВ. Подвой включен в Госреестр РФ в 2005 г. В маточнике куст средней силы роста, раскидистый, корневая система: мочковатая, при хорошем окучивании многоярусная. В саду деревья на СК 7 по силе роста на 10-15 % больше, чем на М 9. Значительно лучше закрепляются в почве: возможно безопорное ведение сада, достаточно установки посадочного кола. Сорто-подвойные комбинации с участием этого подвоя отличаются скороплодностью, обильной регулярной урожайностью при высокой стандартности плодов, хорошо адаптированы к засухе, достаточно зимостойки.

В питомнике плодовых культур ОПХ «Центральное» ФГБНУ СКФНЦСВВ были выполнены испытания биопрепарата, произведенного на основе симбиотических грибов арбускулярной микоризы *Glomus sp.*

Способ применения биопрепарата:

1. Ранней весной в первом поле питомника перед высадкой подвоев яблони в почву их корни обмакивали в емкость с рабочим раствором препарата (болтушкой - разведенным водой биопрепаратом).

2. Испытывали дозы – 0,2; 0,4; 1,0 и 2,0 г/растение. Расход рабочего раствора – для достижения этой концентрации в расчете на обработку 100 подвоев использовали емкость с 3-4 л воды, в которой растворяли 20, 40, 100 или 200 г инокулята гриба арбускулярной микоризы *Glomus sp.*

3. При обработке необходимо постоянно помешивать препарат, чтобы взвесь оседала на корнях саженцев. С целью лучшего сцепления препарата с корнями, желательно применить прилипатель (КМЦ-20 г или глину-500 г).

4. После высадки подвоев в первое поле провели полив всего участка для достижения глубины промокания 5-7 см.

Отмечено, что в первом поле питомника у подвоев яблони СК 3 и СК 7 увеличились, в зависимости от дозы препарата, следующие показатели:

- диаметр ствола подвоя на 9 -16 %,
- высота подвоев на 11-35 %,
- суммарный прирост на 42-65 %.

Таким образом, установлено положительное влияние биопрепарата на основе грибов арбускулярной микоризы на ростовую активность растений подвоев яблони СК 3, СК 7 в первом поле питомника. Наиболее эффективно усилили рост подвоя СК 3 дозы биопрепарата 0,4 и 1 г/растение, подвоя СК 7 – 1 и 2 г/растение.

Далее оценивали пролонгированное действие биопрепарата на рост и развитие саженцев яблони сорта Прикубанское, полученных из обработанных микоризой при посадке подвоев.

У саженцев сорта Прикубанское с микоризованной корневой системой во втором поле питомника увеличились, в зависимости от дозы препарата,

диаметр штамба на 6-22 %, высота саженца на 9-12 %, количество боковых ветвей на 61-77 %. Следовательно, наблюдается пролонгация положительного влияния обработки микоризой подвоев на рост и развитие окулянтов яблони во 2 поле питомника (рис. 68).



Контроль (без обработки)

Биопрепарат в дозе 2,0 г/растение

Рисунок 68 – Высота саженцев сорта Прикубанское на подвое СК 7 с обработанными биопрепаратом корнями

В условиях повышенной температуры воздуха по сравнению со среднемноголетними значениями в комплексе с недостаточным уровнем осадков, исследовали влияние обработки биопрепаратом на основе грибов *Glomus sp.* на устойчивость саженцев яблони сорта Прикубанское к стресс-факторам в летний период вегетации.

В лабораторном опыте в период наибольшего напряжения водного дефицита (вторая декада июля) оценивали водоудерживающую способность (ВС) листьев саженцев яблони. Повторность опыта трехкратная (рис. 69).

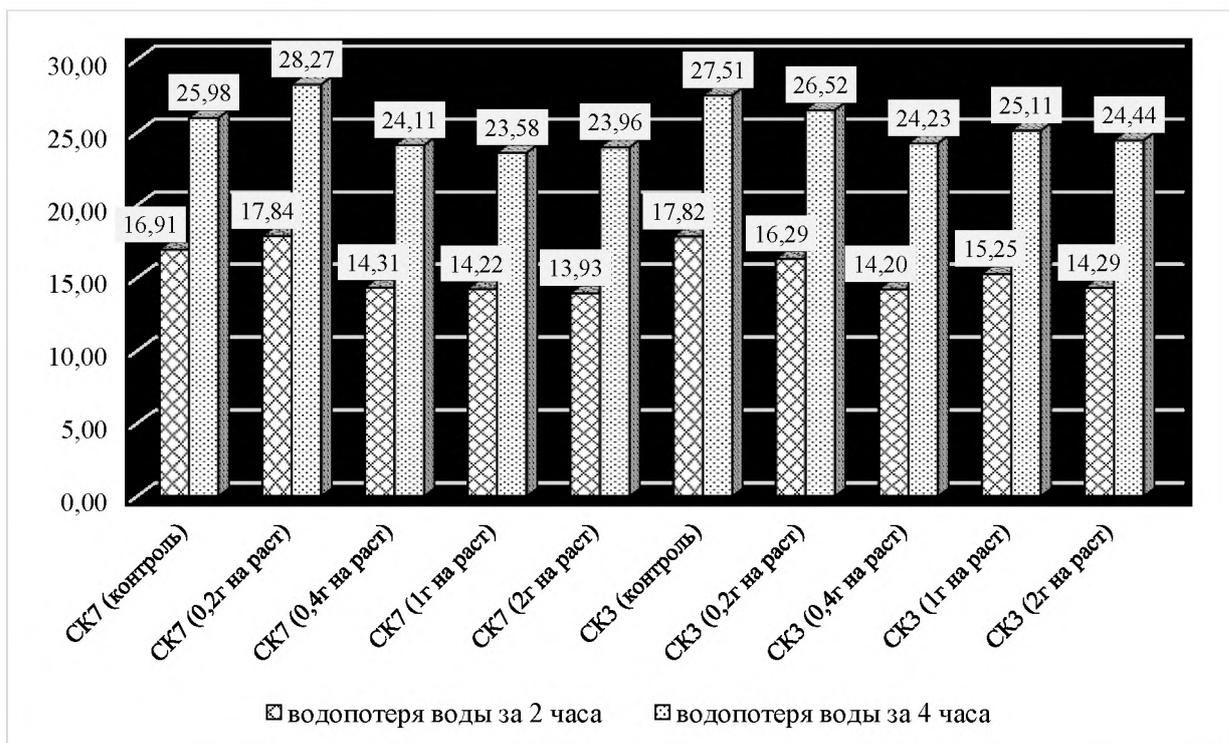


Рисунок 69 – Водоудерживающая способность листьев саженцев яблони сорта Прикубанское на подвоях, обработанных инокулятом грибов *Glomus sp.*

Выявлено положительное влияние биопрепарата на водоудерживающую способность листьев саженцев яблони сорта Прикубанское: отмечено уменьшение потери воды листьями при подсушивании, то есть биопрепарат на основе грибов *Glomus sp.* повысил устойчивость саженцев к неблагоприятным факторам летнего периода вегетации – высокой температуре воздуха и засухе.

Дальнейшие исследования влияния микоризации корней подвоев в питомнике на рост привитых деревьев яблони в саду показали, что микоризация корневой системы привела к изменению баланса ростовых и продукционных процессов у привитых деревьев в саду.

Влияние микоризации корней в питомнике на ослабление ростовых процессов у деревьев яблони в саду показано на рисунке 70.

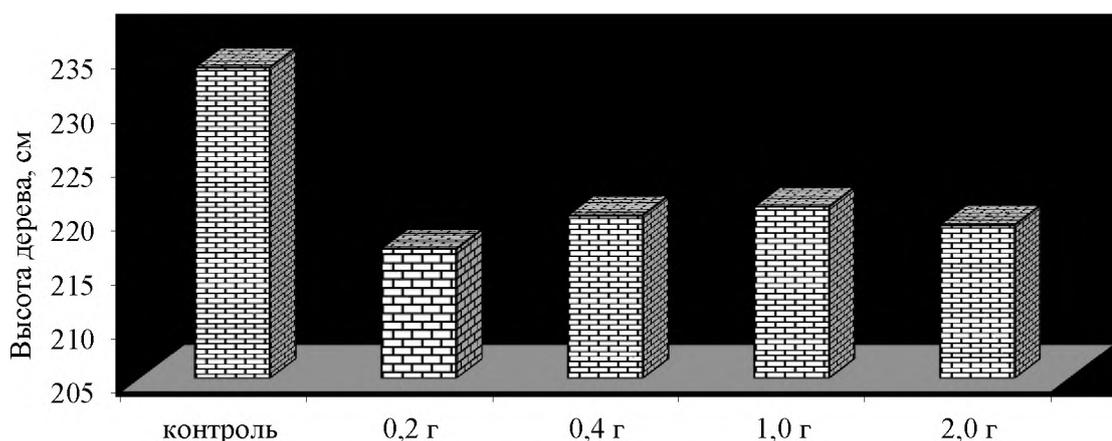


Рисунок 70 – Высота деревьев яблони сорта Прикубанское в зависимости от дозировки биопрепарата на основе грибов *Glomus sp.* (ОПХ «Центральное», г. Краснодар, 2022 г.)

Для выявления закономерностей влияния микоризации корней яблони биопрепаратом на основе симбиотических грибов *Glomus sp.* на изменение продукционных процессов у привитых деревьев, анализировали урожайность опытных деревьев за период плодоношения (2016-2022 гг.) (табл. 38).

Таблица 38 – Влияние микоризации биопрепаратом на основе *Glomus sp.* на урожайность деревьев яблони сорта Прикубанское на подвое СК 7 в 2016-2022 гг. (ОПХ «Центральное», г. Краснодар, посадка 2013 г.)

Доза биопрепарата, г/растение	Урожай, кг/дер.		Удельное плодоношение, кг/см ²	
	2022 г.	∑ 2016-2022 гг.	2022 г.	2016-2022 гг.
контроль	10,4	61,4	0,42	2,50
0,2	9,1	57,7	0,50	3,19
0,4	12,4	62,9	0,68	3,48
1,0	11,2	55,5	0,70	3,49
2,0	9,1	58,8	0,55	3,54
НСР05	1,5	3,1	0,12	0,46

Суммарная урожайность, являющаяся интегральным показателем, учитывающим многолетнее комплексное влияние неблагоприятных факторов на урожайность растений, близка к контролю, то есть по мере увеличения возраста деревьев, нивелируется разница по вариантам опыта в зависимости от дозировки биопрепарата.

Ранее выполненные исследования показали, что микоризация корней ослабила ростовые процессы у деревьев яблони и привела к изменению баланса ростовых и продукционных процессов в пользу последних.

Для сравнительной оценки влияния любого агроприема на урожайность опытных растений, имеющих различия по биометрическим параметрам, используется методика определения удельной урожайности – отношения урожая к площади поперечного сечения штамба (ППСШ).

Данный анализ был выполнен по отношению урожайности 2022 года и суммарной за 2016-202 гг. к сечению штамба деревьев в 2021 году.

Установлено, что микоризация корней обеспечила наиболее эффективное для деревьев соотношение ростовых и продукционных процессов: лучшая удельная продуктивность была при дозе биопрепарата 2,0 г/растение.

При применении биопрепарата на основе симбиотических грибов арбускулярной микоризы *Glomus sp.* в плодовом питомнике достигнут следующий экономический эффект:

- увеличение стандартности саженцев яблони на 17 %
- снижение издержек относительно доходной части на 6,7 пунктов
- снижение себестоимости продукции на 8,8 % или 264 руб./ц
- рост рентабельность производства на 11,5 процентных пункта
- снижение техногенного прессинга в питомниководстве за счет использования природоподобных технологий.

Таким образом, изложенные выше результаты исследований явились основанием для разработки «Технологии производства высококачественного посадочного материала с использованием механизма симбиоза растений и микроорганизмов» (ТИ 01.30.10.131–180–00668034-2022), которую можно рекомендовать как природоподобную технологию, повышающую адаптивный потенциал растений яблони за счет мобилизации механизмов симбиотического взаимодействия грибов арбускулярной микоризы и корневой системы растений (Приложение Ж).

- усиление ростовых процессов у растений яблони в питомнике;
- увеличение уровня продуктивности насаждений яблони за счет пролонгированного действия биопрепарата;
- улучшение физиологических процессов и повышение адаптации растений к абиотическим стрессам летнего периода за счет мобилизации механизмов симбиотического взаимодействия грибов арбускулярной микоризы и корневой системы растений.

3.3.7 Разработка биотехнологического способа повышения устойчивости привитых саженцев винограда к биотическим стрессам

Необходимость увеличения производства высококачественного посадочного материала в условиях усиления воздействия биотических стрессов на виноградники в современных условиях трансформации климата, требует новых подходов к производству безвирусного посадочного материала, способствующих росту устойчивости к другим биотическим стрессорам как при выращивании высококачественных привитых саженцев в школке, так и в эксплуатируемых виноградниках.

Основой для проведения исследований послужили результаты многолетней работы по изучению закономерностей формирования видовой и функциональной структуры микробиотических комплексов ампелоценозов и разработке биотехнологий в защите винограда от вредных организмов, дополненных данными за 2021-2022 годы.

Исследования базировались на результатах ступенчатого скрининга созданной коллекции эффективных грибных и бактериальных штаммов/изолятов с антагонистической, гиперпаразитной и рострегуляторной активностью, среди которых выделены перспективные продуценты биопрепаратов.

Разработана методологическая база для использования биотехнологий в программах контроля заболеваний саженцев и плодоносящего винограда.

В исследованиях при выращивании привитых и корнесобственных саженцев винограда проводилась оценка биологической эффективности широкого спектра микроорганизмов, на основе которой разработан способ оптимизации производства привитых саженцев винограда посредством использования штамма гриба арбускулярной микоризы.

Новизна технологии заключается в том, что впервые для повышения устойчивости привитых виноградных саженцев к биотическим стрессорам используются специально подобранные (на основании скрининга на антимикотическую активность в отношении целевых патогенов) штаммы гриба *Trichoderma viride* Pers.: *T. viride* F-838; *T. viride* 256, путем 2-кратного замачивания и опрыскивания для подавления не только наружной, но и системной (сосудистой) инфекции. При этом штамм *T. viride* F-838 обладает выраженной антагонистической, гиперпаразитной и конкурентной активностью в том числе в отношении грибов рода *Fusarium* и возбудителя эски *Phomopsis viticola*, а штамм *T. viride* 256 наряду с антагонистической активностью обладает и эффективным рострегуляторным действием.

Подана заявка на изобретение «Биотехнологический способ повышения устойчивости привитых саженцев винограда к биотическим стрессорам» (№ 2022128897 от 07.11.2022).

Способ повышения устойчивости привитых саженцев винограда к биотическим стрессорам включает:

– замачивание черенков подвоя и привоя на 48-72 часа (в зависимости от исходной влажности черенков) в 0,5 %-ном водном растворе культуральной жидкости штамма гриба *T. viride* F-838 с титром не ниже 1×10^9 КОЕ/мл, в срок до изготовления прививок (соединения подвоя с привоем);

– 1-2-кратное опрыскивание после парафинирования прививок, их хранения и стратификации (на воде) на этапе закалки 0,5 %-ным водным раствором культуральной жидкости штамма гриба *T. viride* F-838 с титром не ниже 1×10^9 КОЕ/мл;

– замачивание перед посадкой в школку на 2-3 часа в смеси 1:1 0,5 %-ного водного раствора культуральной жидкости штамма гриба *T. viride* F-838 с титром не ниже 1×10^9 КОЕ/мл и 0,5 %-ного водного раствора культуральной жидкости штамма гриба *T. viride* 256 с титром не ниже 1×10^9 КОЕ/мл.

Технология характеризуется следующими основными показателями:

- увеличением приживаемости саженцев в школке в стрессовых средовых условиях на 11-14 %;
- увеличением выхода саженцев на 21-35 %;
- более высокой приживаемостью растений при закладке промышленных виноградников – на 15-18 % по сравнению с традиционной технологией.

Биологическая эффективность способа в оздоровлении от сосудистого некроза составляет 93,5-96,8 %, что на 35,5 % выше в среднем эффективности традиционной технологии с применением химического препарата.

В период выкопки готовых саженцев из школки наблюдалось снижение общей численности плесневых грибов, ассоциированных с растениями, при этом отмечается полное отсутствие специфической трахеомикозной инфекции по сравнению с традиционной технологией, где в составе микрофлоры сохраняются патогенные виды возбудители трахеомикозов.

Кроме того, наряду с высокой фунгицидной активностью проявлялось адаптивное регуляторное воздействие в целом на структуру микромицетов, не отмечалось резких колебаний численности отдельных групп грибов, появлялись виды-антагонисты.

Такой механизм влияния предполагает более пролонгированное подавляющее действие на системную инфекцию и снижает риски заражения патогенами при различных стрессах как на стадии производства саженцев в школке, так и в дальнейшем при закладке виноградников.

Паспорт технологии приведен в Приложении 3.

3.4 Выводы

В результате выполненных исследований:

- установлено, что наилучшую эффективность при обработке эксплантов подвоев косточковых культур показал способ поверхностной обработки эксплантов с помощью дезинфицирующих таблеток «ОКА-ТАБ» (0,5 % р-р) в течение 7 мин., выход жизнеспособных эксплантов 64-93,1 %;

- выявлено, что для подвоев серии АИ оптимальным периодом для введения в культуру *in vitro* является период активного роста побегов с 3 декады апреля до начала июня, эффективность регенерации составляет 66,7-85 %;

- определено, что у подвоев ПКГ низкий уровень регенерации меристем 30-52,9 % и оптимальным периодом для изоляции эксплантов в культуру *in vitro* является период со 2 декады мая до конца 1 декады июня;

- выявлена положительная сортоспецифическая реакция сортов винограда Гранатовый, Достойный, Красностоп АЗОС на среду Реброва А.Н. с концентрацией фитогормонов 6-БАП 1,0 мг/л + ИУК 0,5 мг/л, на которой регенерация меристем и развития эксплантов подходит более эффективно и составляет 31,2-66,7 %;

- установлено, что сорт винограда Гранатовый имеет более высокую регенерационную активность (29,4-66,7%) по сравнению с сортами Достойный и Красностоп АЗОС;

- отмечено, что в 3 декаде июля, процент регенерации выше при отборе инициальных эксплантов из фитотрона и из маточника: у сорта Нелли - 70-78,4 %, у сорта Кемя - 62,5-63,2 %;

- определено, что побегообразовательная способность эксплантов, отобранных из маточника выше, чем у эксплантов отобранных в изолированных условиях (фитотрон, теплица) у сорта Нелли в 1,3-1,5 раза, у сорта Кемя в 1,6-1,7 раза. У сорта Нелли формируется 6,5-7,2 побега/эксп., в зависимости от концентрации 6-БАП, у сорта Кемя 5,4-6,8 побега/эксп.

- выявлено, что при мультипликации побегов ежевики сорта Карака Блэк на среде с добавлением 6-БАП в количестве 1,0 или 1,25 мг/л формируется 9,2-12,8 микропобегов с одного экспланта; при более низкой концентрации 6-БАП - 0,5 мг/л. На этапе, предшествующему укоренению, следует снизить количество 6-БАП до 0,5 мг/л, при этом формируется в среднем 8 побегов/эксп. размером около 2 см, которые готовы для этапа укоренения;

- установлено, что использование ФитАктив Экстра Плюс на этапе укоренения подвоя АИ 11 позволяет повысить укореняемость побегов на 14 и 33 % (в зависимости от формы хелата железа). На среде MS с Fe-EDDHA при использовании ФитАктив Экстра Плюс количество корней выше в 3,4 раза, а их длина в 2,6 раза, чем на средах с ИМК.

- отмечено, что однократная обработка универсальным регулятором «Рибав Экстра» микропобегов ежевики сорта Фридом при адаптации способствует развитию растений и улучшает показатели роста: количество корней 10 и более шт. (контроль 4-5 шт.), длина корней 6,5-7 см (контроль 2-4 см), высота надземной части растений 5-8 см (контроль 3-4 см), количество развитых листьев 4-8 шт., (контроль 3-4 шт.);

модифицирована технология размножения растений косточковых культур *in vitro* (на примере подвоя ПК СК 1) (Приложение Г), при которой можно получить от одного экспланта за 10 пассажей до 1 млн. адаптированных растений (при промышленном тиражировании).

оптимизированы режимы минерального питания тиражированных маточных растений в ампелоценозе маточника, которые послужили основой для разработки технологической инструкции (Приложение Д), применение которой позволяет оптимизировать режимы питания в маточниках винограда;

- разработана технология создания базисных маточников из оздоровленного *in vitro* посадочного материала винограда. (Приложение Е).

- разработана технология производства высококачественного посадочного материала с использованием механизма симбиоза растений и микроорганизмов, позволяющая повышать адаптивный потенциал растений яблони за счет

мобилизации механизмов симбиотического взаимодействия грибов арбускулярной микоризы и корневой системы растений (Приложение Ж);

разработан биотехнологический способ повышения устойчивости привитых саженцев винограда к биотическим стрессорам (Приложение З) и подана заявка на изобретение № 2022128897 от 07.11.2022.

Заключение

В ходе выполнения исследований в отчетном 2022 году выполнены все поставленные задачи:

- получены новые знания о фенотипическом и генотипическом разнообразии образцов генофонда садовых культур и винограда ФГБНУ СКФНЦСВВ;

- сформирована база данных признаков качественных показателей плодов устойчивого и иммунного к парше селекционного материала, которая позволит оптимизировать важнейшие этапы селекционного процесса за счет ускорения отбора наиболее ценных форм;

- переданы на государственное сортоиспытание 2 сорта плодовых культур: 1 – иммунный к парше (ген *Rvi6*) сорт яблони Гайто Газданов зимнего срока созревания; 2 – скороплодный, устойчивый к коккомикозу сорт вишни Южанка, обладающий высоким потенциалом продуктивности. Полученные отечественные сорта 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;

- шесть элитных форм, в том числе элитная форма яблони 12/3-21-23 (из гибридной семьи Айдаред × Балсгард 0247E), обладающая иммунитетом к парше; элитная форма груши 4-8-69 (Вильямс х Бере Арданпон), выделенная по комплексу хозяйственно-ценных признаков; элитная форма черешни – 12-14-23; вишни – 17-3-29 и сливы 17-1-52, а также элитная форма винограда Тана 31.

Выделенные элитные формы являются кандидатами в будущие сорта отечественной селекции, совмещающие в своем генотипе комплекс хозяйственно-ценных признаков и не уступающие по ряду признаков зарубежным аналогам.

- выделено три донора хозяйственно-ценных признаков винограда, в том числе донор гена устойчивости к милдью *Rpv3* – Мускат летний, гена устойчивости к милдью *Rpv12* – Восторг идеальный, генов устойчивости к оидиуму *Ren3*, *Ren9* – Памяти Смирнова.

– выделено восемь источников хозяйственно ценных признаков, в том числе: яблони – 12/3-21-28 (источник ярко-красной окраски и крупноплодности плодов); груши – Вильямс (по признаку компактности кроны и силы роста); черешни – сорт Черные глаза (источник ценного биохимического состава плодов), а также высокоустойчивый к засухоустойчивости сорт Космическая (источник данного признака), имеющий также высокий уровень продуктивности в условиях дефицита влаги и высоких летних температур; вишни – сорт Застенчивая (источник ценного биохимического состава плодов); сливы домашней – сорт Август Делайт (источник зимостойкости); айвы – сорт Кубанская (источник высокого качества продуктов переработки); винограда – сорт Кишмиш Согдиана (источник признака бессемянности).

Выделенные источники и доноры ценных признаков рекомендуются для включения в дальнейший селекционный процесс по созданию сортов нового поколения с заданными признаками.

- разработан метод выделения генотипов рода *Prunus* L. с полигенным типом устойчивости к коккомикозу, позволяющий эффективно и при минимизации финансовых издержек обирать образцы, обладающие высоким уровнем устойчивости к данному патогену.

- выполнен комплекс молекулярно-генетических исследований, который позволил: - разработать метод мультиплексной ДНК-паспортизации сортов черешни, позволяющий проводить генотипирование одновременно по шести микросателлитным локусам; - апробировать и оценить полиморфизм локуспецифичных (8 SSR-маркеров) и мультилокусных (20 ISSR ДНК-маркеров на) ДНК-маркеров применительно к груше.

- также на основе апробации 14 SCoT ДНК-маркеров были выявлены информативные маркеры, перспективные для генотипирования сортов яблони, на основе SCoT-праймеров, получены ДНК-паспорта по ним для востребованных в садоводстве отечественных и зарубежных сортов яблони;

- с использованием девяти микросателлитных ДНК-маркеров выполнено генотипирование 31 форм абрикоса из природных популяций, отобранных на территории Дагестана, а также культурных сортов из различных эколого-географических групп, получена информация о генетических взаимосвязях;

- по результатам апробации десяти ISSR-маркеров были выявлены наиболее перспективные для выполнения генотипирования земляники садовой и анализа генетической стабильности при микроклонировании: UBC 849 и ISSR6;

- разработаны методики идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 (Grapevine leafroll-associated virus 1) и вируса бороздчатости древесины винограда (Grapevine rupestris stem pitting-associated virus) на основе использования метода ПЦР в реальном времени;

- выполнена молекулярно-генетическая паспортизация 32 ценных селекционных форм яблони, являющихся комплексными донорами, по трем аллелям локуса самонесовместимости (S3, S5 и S10), а также восьми микросателлитным ДНК-маркерам и получены генотипспецифичные ДНК-паспорта.

Установлены оптимальные экспериментальные параметры микроклонального размножения садовых культур и винограда по этапам от введения в культуру *in vitro* до адаптации *ex vitro* полученных микрорастений. Определены оптимальные условия стерилизации эксплантов, установлены оптимальные сроки отбора эксплантов для введения в культуру *in vitro* подвоев косточковых культур, а также установлено положительное влияние хелатной формы железа Fe-EDDHA и биопрепарата ФитАктив Экстра Плюс на укоренение подвоя косточковых АИ 11 в условиях *in vitro* и *ex vitro*. На основе полученного комплекса данных разработана модифицированная

технология размножения растений косточковых культур *in vitro* (на примере подвоя ПК СК 1), при которой можно получить от одного экспланта за 10 пассажей до 1 млн. адаптированных растений (при промышленном тиражировании). Определены сортоспецифические параметры по концентрациям фитогормонов для оптимизации регенерационных процессов при микроклонировании ряда сортов винограда отечественной селекции. Установлены оптимальные сроки введения эксплантов в культуру *in vitro* для различных сортов земляники. Определены оптимальные экспериментальные параметры, включая компонентный состав питательных сред для микроклонального размножения ежевики и установлено положительное влияние препарата Рибав Экстра при адаптации микроклонально размноженных растений и их рост в условиях *in vivo*. Разработана технология производства высококачественного посадочного материала яблони с использованием механизмов симбиотического взаимодействия грибов арбускулярной микоризы и корневой системы растений. Оптимизированы режимы минерального питания тиражированных маточных растений в ампелоценозе маточника. Разработана технология создания базисных маточников из оздоровленного *in vitro* посадочного материала винограда.

Работы по всем направления выполнены полностью.

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 // 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 Shogo M., Li T., Shungo O., Li Y., Bai S. 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, Iss. 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, Iss. 4. – С. 1995-2006.
- 19 Gessler C., Patocchi A., Sansavini S. *Venturia inaequalis* resistance in apple // Critical Reviews in Plant Sciences. – 2006. – Vol. 25, Iss. 6. – P. 473-503.
- 20 Marini R. P. et al. Apple rootstocks: History, physiology, management, and breeding // Horticult 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*. – 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., Broothaerst 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 Silfverberg-Dilworth, E. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus domestica* Borkh.) genome // Tree Genetics & Genomes. – 2006. – Vol. 2. – P. 202-224.

44 Goulao L., Oliveira C.M. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus X domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers // Euphytica. – 2001. – Vol. 122. – P. 81-89.

45 Cipriani G. Lot G., Huang W.G. et al. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation characterisation and cross-species amplification in *Prunus* // Theor Appl Genet. – 1999 – Vol. 99 – P.65-72.

46 Aranzana M.J., Garcia-Mas J., Carbo J. et al. Development and variation analysis of microsatellite markers in peach // Plant Breeding – 2002. – Vol. 121 – P.87–92.

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

48 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.

49 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.

50 Rezaдост 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.

51 Teixeira da Silva J.A., Nezami-Alanagh E., Barreal M.E., Kher M.M. et al. Shoot tip necrosis of *in vitro* plant cultures: A reappraisal of possible causes and

solutions // *Planta*. – 2020. – Vol. 252. – P. 47. – URL: <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03449-4>

52 Chinnappan Ravinder Singh. Review on problems and its remedy in plant tissue culture // *Asian J. Biol. Sci.* – 2018. – Vol. 11. – P. 165-172. – URL: Review on Problems and its Remedy in Plant Tissue Culture (docsdrive.com)

53 Abdalla N., El-Ramady H., Seliem, M.K., El-Mahrouk M.E., Taha N. et al. An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges // *Horticulturae*. – 2022. – Vol. 8. – P. 677. – URL: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080677>

54 Баймухаметова Э.А., Кулуев Б.Р. Потемнение растительных тканей при культивировании *in vitro* и способы его предотвращения // *Биотехнология*. – 2020. – № 2. – P. 26-42.

55 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>.

56 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. – Т.30. – С. 258-264.

57 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 Agrobo*. – 2014. – Vol 42 (2). – P. 488-494. – URL: <https://www.notulaebotanicae.ro/index.php/nbha/article/view/9671/7757>

58 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.

59 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.

60 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.)

61 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). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2014/01/pdf/65.pdf> (Дата обращения: 23.08.2022 г.).

62 Сулейманова С.Д. Микрклональное размножение плодовых культур (обзор) // *Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe (East European Scientific Journal)*. – 2016. – №11. – P. 47-54. – Режим доступа: [mikroklonalnoe-razmnozhenie-plodovyh-kultur-obzor.pdf](http://www.wschodnioeuropejskieczasopismoneaukowe.pl/2016/11/mikroklonalnoe-razmnozhenie-plodovyh-kultur-obzor.pdf) (Дата обращения: 26.07.2018 г.)

63 Magyar-Tabori K., Dobranszki J., Hudak I. Effect of cytokinin content of the regeneration media on *in vitro* rooting ability of adventitious apple shoots // *Scientia Horticulturae*. – 2011. – № 129. – P. 910-913. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423811002561?via%3Dihub>

64 Yancheva S., Marchev P., Yaneva V. et al. *In vitro* propagation of grape cultivars and rootstocks for production of pre-basic planting material // *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. – 2018. – Vol. 24 (№ 5). – P. 801-806.

65 Neri J.C., Meléndez-Mori J.B., Tejada-Alvarado J.J., Vilca-Valqui N.C. et al. An Optimized Protocol for Micropropagation and Acclimatization of Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) Variety ‘Aroma’ // *Agronomy*. – 2022. – Vol. 12. – P. 968. – URL: <https://doi.org/10.3390/agronomy12040968>

66 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.

67 Ghasheem, N. AL. *In vitro* effect of various sterilization techniques on peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) explants / N. AL. Ghasheem, F. Stănică, A. G.

Peticilă, O. Venat // Scientific Papers. Series B, Horticulture. – 2018. – Vol. LXII– P. 227-234.

68 Кобринец Т. П., Иванова О. С., Поух Е. В. Микроклональное размножение районированных сортов сливы в РУП «Брестская ОСХОС НАН Беларуси» // Селекция и сорторазведение садовых культур. – 2017. – Т. 4, № 1-2. – С. 53-56.

69 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>

70 Buntsevich L.L., Vamatov 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>

71 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.

72 Сулейманова С.Д. Эффективность антибиотиков в оздоровлении микроклонов подвоев Махма 14, GF 677, Мугобалан 29 С от инфекций различной этиологии // Аграрная наука. – 2019 (5). – P. 75-78. – Режим доступа: <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-325-5-75-78> (Дата обращения: 26.07.2018 г.)

73 Kay Thi Oo, Kyaw Swar Oo, YinYin Mon. Establishment of Efficient Surface Sterilization Protocol on Different Types of Field Grown Strawberry Explants (*Fragaria x ananassa* Duch.) // Journal of Scientific and Innovative Research. – 2018. – Vol. 7(3). –P. 70-74.

74 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.

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

76 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 // SpringerPlus. – 2016. – Vol. 5:453. – 9 p. - DOI 10.1186/s40064-016-2081-0.

77 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.

78 Mahdavian M., Bouzari N., Abdollahi H. // Biharean Biologist. – 2011. – Vol 5(2). – P. 86-90.

79 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.

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 Ic-52 (*Cerasus vulgaris* x *Cerasus fruticosa*) 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 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>

82 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

83 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>

84 Pakyürek M., Hepaksoy S. A research on micropropagation of Pixy Rootstock // *Euroasia Journal of Mathematics-Enguneering 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 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

86 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>

87 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.

88 88. Сковородников Д.Н., Милехина Н.В., Орлова Ю.Н. Особенности клонального микроразмножения ежевики и малино-ежевичных гибридов // *Вестник Брянского госуниверситета. Точные и естественные науки*. – 2015. – №3. – P. 417-419.

89 Кухарчик, М. С., Кастрицкая М. С., Соловей О. В. Технология получения оздоровленных клоновых подвоев сливы // Плодоводство: сб. науч. тр. – 2010. – Т. 22. – С. 126–134.

90 Suvalaxmi Palei, Arun Kumar Das, Gyana Ranjan Rout. In vitro Studies of Strawberry - An Important Fruit Crop: A Review // Jour Pl Sci Res. – 2015. – Vol. 31 (2). –P. 115-131.

91 Sarropoulou V., Dimassi-Theriou K., Therios I. In vitro rooting and biochemical parameters in the cherry rootstocks CAB-6P and Gisela 6 using L-methionine // Turkish Journal of Agriculture and Forestry. – 2013. – Vol. 37. – P. 688-698.

https://pdfs.semanticscholar.org/9dd2/78fbd948abe1bb18887df354a6aff67b6f6d.pdf?_ga=2.23651130.1605528451.1595838082-1484798313.1595244390

92 Кухарчик Н.В., Красинская Т.А., Семенас С.Э., Колбанова Е.В. Адаптация регенерантов in vitro // Плодоводство. – 2006. – Т8, Ч.2. – С174-181.

93 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.

94 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. – Вып. 7. – С. 73-82.

95 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.

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

97 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.

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

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

100 Ребров А.Н. Питательная среда для ввода и регенерации меристем винограда в условия *in vitro* // Патент на изобретение № 2636030. Опубликовано: 17.11.2017.

101 Fitaktiv Extra Plus. Гель для укоренения черенков <http://fitaktivagro.ru/extraplus>

Приложение А
Оценка отличимости, однородности и стабильности при передаче в
Государственное сортоиспытание сорта яблони Гайто Газданов

Форма RTG № 0014/2 ЯБЛОНЯ КУЛЬТУРНАЯ

Место проведения испытаний Краснодар. ЗАО ОПХ «Центральное» Год 2022

Сорт Гайто Газданов Категория _____

Группа _____

Фактическое число растений 20 Код _____

Признак		Индекс	Степень выраженности	Результат	Нетипич. растений
1.	Дерево: сила роста	1	очень слаборослое	3	0
		3	слаборослое		
		5	среднерослое		
		7	сильнорослое		
2. (*)	Дерево: тип	1	колонновидное	2	0
		2	ветвистое		
3. (*)	Только ветвистый тип дерева: Дерево: форма кроны	1	вертикальная	1	0
		2	раскидистая		
		3	свисающая		
		4	плакучая		
4.	Дерево: тип плодоношения	1	только на кольчатках	1	0
		2	на кольчатках и прутиках		
		3	только на прутиках		
5.	Прирост прошлого года: толщина	3	тонкий	5	0
		5	средней толщины		
		7	толстый		
		9	очень толстый		
6. (*)	Прирост прошлого года: длина междоузлий	1	очень короткие	3	0
		3	короткие		
		5	средней длины		
		7	длинные		
7.	Прирост прошлого года: окраска солнечной стороны	1	зеленовато-коричневый	4	0
		2	красновато-коричневый		
		3	светло-коричневый		
		4	коричневый		
		5	темно-коричневый		
8.	Прирост прошлого года: опушение (на верхней половине прироста)	1	отсутствует или очень слабое	5	0
		3	слабое		
		5	среднее		
		7	сильное		
		9	очень сильное		
9. (*)	Прирост прошлого года: число чечевичек	3	мало	7	0
		5	среднее число		
		7	много		
10. (*)	Листовая пластинка: положение относительно побега	1	направлена вверх	3	0
		2	направлена в сторону		
		3	направлена вниз		
11. (*)	Листовая пластинка: длина	1	очень короткая	5	0
		3	короткая		
		5	средней длины		
		7	длинная		
12.	Листовая пластинка: ширина	3	узкая		

Признак		Индекс	Степень выраженности	Результат	Нетипич. растений
(*)		5	средней ширины	5	0
		7	широкая		
13. (*)	Листовая пластинка: отношение длины к ширине	3	маленькое	5	0
		5	среднее		
		7	большое		
14.	Листовая пластинка: интенсивность зеленой окраски	3	светлая	5	0
		5	средняя		
		7	темная		
15.	Листовая пластинка: надрезанность края (верхняя половина)	1	городчатый	4	0
		2	двоякогородчатый		
		3	зубчатый 1-го типа		
		4	зубчатый 2-го типа		
		5	двоякозубчатый		
16.	Листовая пластинка: опушение нижней стороны	1	отсутствует или слабое	2	0
		2	среднее		
		3	сильное		
17. (*)	Черешок: длина	3	короткий	5	0
		5	средней длины		
		7	длинный		
18.	Черешок: размер антоциановой окраски от основания	3	маленькая	5	0
		5	среднего размера		
		7	большая		
19. (*)	Цветок: преобладающая окраска на стадии бутона	1	белый	3	0
		2	желтовато-розовый		
		3	светло-розовый		
		4	темно-розовый		
		5	красный		
		6	темно-красный		
		7	фиолетовый		
20. (*)	Цветок: диаметр с лепестками, прижатыми в горизонтальное положение	1	очень маленький	5	0
		3	маленький		
		5	среднего диаметра		
		7	большой		
21. (*)	Цветок: положение лепестков	1	свободные	3	0
		2	промежуточные		
		3	перекрывающиеся		
22.	Цветок: положение рылец пестика относительно тычинок	1	ниже	3	0
		2	на одном уровне		
		3	выше		
23.	Молодой плод: размер антоциановой окраски	1	отсутствует или оч. маленькая	3	0
		3	маленькая		
		5	среднего размера		
		7	большая		
		9	очень большая		
24. (*)	Плод: размер	1	очень мелкий		
		2	от очень мелкого до мелкого		
		3	мелкий		
		4	от мелкого до среднего		
		5	среднего размера		

Признак		Индекс	Степень выраженности	Результат	Нетипич. растений
		6	от среднего до крупного	6	0
		7	крупный		
		8	от крупного до очень крупного		
		9	очень крупный		
25. (*)	Плод: высота	3	низкий	5	0
		5	средней высоты		
		7	высокий		
26. (*)	Плод: диаметр	3	маленький	5	0
		5	среднего диаметра		
		7	большой		
27. (*)	Плод: отношение высоты к диаметру	1	очень маленькое	5	0
		3	маленькое		
		5	среднее		
		7	большое		
		9	очень большое		
28. (*)	Плод: форма	1	цилиндрический с перехватом	6	0
		2	конический		
		3	яйцевидный		
		4	цилиндрический		
		5	эллипсоидный		
		6	шаровидный		
		7	приплюснутый шаровидный		
29.	Плод: ребристость	1	отсутствует или слабая	1	0
		2	средняя		
		3	сильная		
30.	Плод: корона на чашечном конце (верхушке)	1	отсутствует или слабая	2	0
		2	средняя		
		3	сильная		
31. (*)	Плод: размер чашечки	3	маленькая	5	0
		5	среднего размера		
		7	большая		
32.	Плод: длина чашелистиков	3	короткие	3	0
		5	средней длины		
		7	длинные		
33. (*)	Плод: восковой налет на кожице	1	отсутствует или слабый	1	0
		2	средний		
		3	сильный		
34.	Плод: маслянистость кожицы	1	отсутствует или слабая	1	0
		2	средняя		
		3	сильная		
35. (*)	Плод: основная окраска	1	не видна	5	0
		2	беловато-желтая		
		3	желтая		
		4	беловато-зеленая		
		5	желто-зеленая		
		6	зеленая		
36. (*)		1	отсутствует или оч. маленькая		

Признак		Индекс	Степень выраженности	Результат	Нетипич. растений
	Плод: доля поверхности кожуры под покровной окраской	3	маленькая	7	0
		5	средняя		
		7	большая		
		9	очень большая		
37. (*)	Плод: покровная окраска без воскового налета	1	оранжево-красная	2	0
		2	розово-красная		
		3	красная		
		4	фиолетово-красная		
		5	коричнево-красная		
38. (*)	Плод: интенсивность покровной окраски	3	светлая	5	0
		5	средняя		
		7	темная		
39. (*)	Плод: тип покровной окраски	1	только равномерная	2	0
		2	равномерная со слабо определяемыми полосами		
		3	равномерная с явными полосами		
		4	слабая равномерная с явными полосами		
		5	только полосами		
		6	равномерная и пятнистая		
		7	равномерная, полосами и пятнистая		
40. (*)	Плод: ширина полос	3	узкие	3	0
		5	средней ширины		
		7	широкие		
41. (*)	Плод: оржавленность вокруг воронки	1	отсутствует или маленькая	1	0
		2	средняя		
		3	большая		
42.	Плод: оржавленность на боках	1	отсутствует или маленькая	1	0
		2	средняя		
		3	большая		
43. (*)	Плод: оржавленность вокруг чашечки	1	отсутствует или маленькая	1	0
		2	средняя		
		3	большая		
44.	Плод: число подкожных точек	3	мало	3	0
		5	среднее число		
		7	много		
45.	Плод: размер подкожных точек	3	маленькие	5	0
		5	среднего размера		
		7	большие		
46. (*)	Плод: длина плодоножки	1	очень короткая	3	0
		3	короткая		
		5	средней длины		
		7	длинная		
		9	очень длинная		
47. (*)	Плод: толщина плодоножки	3	тонкая	5	0
		5	средней толщины		
		7	толстая		
48.	Плод: глубина воронки	3	мелкая		

Признак		Индекс	Степень выраженности	Результат	Нетипич. растений
(*)		5	средней глубины	7	0
		7	глубокая		
49. (*)	Плод: ширина воронки	3	узкая	3	0
		5	средней ширины		
		7	широкая		
50. (*)	Плод: глубина чашечки	3	мелкая	5	0
		5	средней глубины		
		7	глубокая		
51. (*)	Плод: ширина чашечки	3	узкая	3	0
		5	средней ширины		
		7	широкая		
52. (*)	Плод: плотность мякоти	1	очень мягкая	5	0
		3	мягкая		
		5	средней плотности		
		7	плотная		
		9	очень плотная		
53. (*)	Плод: окраска мякоти	1	белая	2	0
		2	кремовая		
		3	желтоватая		
		4	зеленоватая		
		5	розовая		
		6	красноватая		
54. (*)	Плод: открытость семенных камер (поперечное сечение)	1	закрытые или слегка открытые	2	0
		2	умеренно открытые		
		3	полностью открытые		
55. (*)	Время начала цветения	1	очень раннее	7	0
		3	раннее		
		5	среднее		
		7	позднее		
		9	очень позднее		
56.	Время сбора урожая	1	очень раннее	7	0
		3	раннее		
		5	среднее		
		7	позднее		
		9	очень позднее		
57.	Время потребительской спелости плодов международное название степеней выраженности признака в скобках	1	раннелетнее (очень раннее)	8	0
		2	летнее (от очень раннего до раннего)		
		3	позднелетнее (раннее)		
		4	раннеосеннее (от раннего до среднего)		
		5	осеннее (среднее)		
		6	позднеосеннее (от среднего до позднего)		
		7	раннезимнее (позднее)		
		8	зимнее (от позднего до очень позднего)		
		9	поздnezимнее (очень позднее)		

Общее число нетипичных растений нет

**Оценка отличимости, однородности и стабильности при передаче в
Государственное сортоиспытание сорта вишни Южанка
Форма RTG № 0230 ВИШНЯ ОБЫКНОВЕННАЯ**

Место проведения испытаний Горячключевской район Год 2022

Сорт **Южанка**

Категория _____

Группа _____

Фактическое число растений **20**

Код _____

Признак	Индекс	Степень выраженности	Результат	Нетипич. растений
1. Растение: сила роста	1	очень слаборослое	5	0
	3	слаборослое		
	5	среднерослое		
	7	сильнорослое		
	9	очень сильнорослое		
2. Растение: форма кроны (*)	1	прямостоячая	3	0
	2	полупрямостоячая		
	3	раскидистая		
	4	свисающая (плакучая)		
3. Растение: ветвление (*)	3	слабое	5	0
	5	среднее		
	7	сильное		
4. Растение: расположение почек	1	вдоль всей ветви	1	0
	2	только в срединной и периферической части ветви		
	3	только в периферической части ветви		
5. Молодой побег: антоциановая окраска кончика (во время быстрого роста)	1	отсутствует или очень слабая	1	0
	3	слабая		
	5	средняя		
	7	сильная		
	9	очень сильная		
6. Молодой побег: опушение кончика (во время быстрого роста)	3	слабое	3	0
	5	среднее		
	7	сильное		
7. Прирост прошлого года: длина междоузлия (*)	1	обычное	1	0
	2	короткое		
8. Прирост прошлого года: число чечевичек	3	мало	3	0
	5	среднее число		
	7	много		
9. Листовая пластинка: длина	3	короткая	5	0
	5	средней длины		
	7	длинная		
10. Листовая пластинка: ширина	3	узкая	5	0
	5	средней ширины		
	7	широкая		
11. Листовая пластинка: отношение длины к ширине (*)	3	низкое	5	0
	5	среднее		
	7	высокое		
12.	3	светлая		

Признак		Индекс	Степень выраженности	Результат	Нетипич. растений
	Листовая пластинка: интенсивность зеленой окраски верхней стороны	5	средняя	7	0
		7	темная		
13.	Листовая пластинка: глянецвитость	1	отсутствует или слабая	1	0
		2	средняя		
		3	сильная		
14. (*)	Лист: длина черешка	3	короткий	3	0
		5	средней длины		
		7	длинный		
15.	Лист: антоциановая окраска черешка (верхняя сторона)	3	слабая	5	0
		5	средняя		
		7	сильная		
16.	Лист: отношение длины пластинки к длине черешка	3	низкое	5	0
		5	среднее		
		7	высокое		
17. (*)	Лист: железки	1	отсутствуют	9	0
		9	имеются		
18.	Железки: расположение	1	только у основания листа	1	0
		2	и у основания листовой пластинки и на черешке		
		3	только на черешке		
19.	Железки: окраска	1	зеленовато-желтые	2	0
		2	оранжево-желтые		
		3	светло-красные		
		4	темно-красные		
		5	коричневатые		
20.	Прилистник: положение	1	направлен от побега	1	0
		2	прижат к побегу		
		3	оггибает побег		
21.	Прилистник: размер	3	маленький	3	0
		5	среднего размера		
		7	большой		
22.	Прилистник: разрезанность	1	отсутствует или слабая	2	0
		2	средняя		
		3	сильная		
23.	Цветок: диаметр 2,7 см	3	маленький	5	0
		5	среднего диаметра		
		7	большой		
24.	Цветок: расположение лепестков	1	свободные	3	0
		2	промежуточные		
		3	перекрывающиеся		
25.	Цветок: форма лепестка	1	округлый	1	0
		2	обратнойцевидный		
		3	широкообратнойцевидный		
26.	Цветок: расположение	1	одиночное	3	0
		2	двойное		
		3	кистями		
		4	неравномерное		

Признак		Индекс	Степень выраженности	Результат	Нетипич. растений
27. (*)	Плод: размер	1	очень маленький	7	0
		3	маленький		
		5	среднего размера		
		7	большой		
		9	очень большой		
28. (*)	Плод: форма с брюшной стороны	1	почковидный	1	0
		2	сплюснутый		
		3	округлый		
		4	эллиптический		
29.	Плод: пестичный конец (верхушка)	1	заостренный	3	0
		2	плоский		
		3	вдавленный		
30. (*)	Плод: длина плодоножки	1	очень короткая	5	0
		3	короткая		
		5	средней длины		
		7	длинная		
		9	очень длинная		
31.	Плод: толщина плодоножки	3	тонкая	5	0
		5	средней толщины		
		7	толстая		
32. (*)	Плод: антоциановая окраска плодоножки	1	отсутствует	1	0
		9	имеется		
33.	Плод: число прилистников у плодоножки	1	отсутствуют или мало	1	0
		2	среднее число		
		3	много		
34.	Плод: размер прилистников у плодоножки	3	маленькие	3	0
		5	среднего размера		
		7	большие		
35.	Плод: отделительный слой между плодом и плодоножкой	1	отсутствует	9	0
		9	имеется		
36. (*)	Плод: окраска кожицы	1	оранжево-красная	4	0
		2	светло-красная		
		3	красная		
		4	темно-красная		
		5	коричнево-красная		
		6	почти черная		
37. (*)	Плод: окраска мякоти	1	желтоватая	3	0
		2	розовая		
		3	красная		
		4	темно-красная		
38. (*)	Плод: окраска сока	1	не окрашенный	4	0
		2	светло-желтый		
		3	розовый		
		4	красный		
		5	темно-красный		
39. (*)	Плод: плотность	3	мягкий	5	0
		5	средней плотности		

Признак		Индекс	Степень выраженности	Результат	Нетипич. растений
		7	плотный		
40.	Плод: кислотность	1	очень низкая	7	0
		3	низкая		
		5	средняя		
		7	высокая		
		9	очень высокая		
41.	Плод: сладость	3	низкая	5	0
		5	средняя		
		7	высокая		
42.	Плод: сочность	3	слабая	5	0
		5	средняя		
		7	сильная		
43. (*)	Косточка: размер 9 мм	3	мелкая	5	0
		5	среднего размера		
		7	крупная		
44. (*)	Косточка: форма с брюшной стороны	1	узкоэллиптическая	2	0
		2	широкоэллиптическая		
		3	округлая		
45. (*)	Плод: отношение массы плода к массе косточки бг –1г	3	низкое	5	0
		5	среднее		
		7	высокое		
46. (*)	Время начала цветения 22.04	1	очень раннее		
		3	раннее		
		5	среднее		
		7	позднее		
		9	очень позднее		
47. (*)	Время начала созревания плодов 5.07	1	очень раннее		
		3	раннее		
		5	среднее		
		7	позднее		
		9	очень позднее		

Общее число нетипичных растений: нет

Приложение Б

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
САДОВОДСТВА, ВИНОГРАДАРСТВА, ВИНОДЕЛИЯ"
(ФГБНУ СКФНЦСВВ)



**СТАНДАРТ
ОРГАНИЗАЦИИ**

**СТО
00668034-141-
2022**

СЕЛЕКЦИЯ МЕЛКОПЛОДНЫХ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР

**Метод выделения образцов
с полигенным типом устойчивости к коккомикозу**

**Краснодар
2022**

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 года №184-ФЗ «О техническом регулировании» и Федеральным законом от 29 июня 2015 года № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации»

Сведения о стандарте

1. РАЗРАБОТАН Селекционно-семеноводческим (питомниководческим) центром в сфере плодово-ягодных культур и винограда ФГБНУ СКФНЦСВВ, в рамках соглашения Министерства науки и высшего образования РФ №075-15-2021-536 от 31.05.2021
2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом директора ФГБНУ СКФНЦСВВ № 145 от 15.09.2022 г.
3. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального документа без разрешения ФГБНУ СКФНЦСВВ

Содержание

1	Область применения.....	5
2	Нормативные ссылки.....	5
3	Термины и определения	5
4	Сокращения.....	6
5	Сущность метода.....	6
6	Изучение полигенной устойчивости мелкокосточковых культур к коккомикозу	6
6.1	Отбор растительного материала.....	6
6.1.1	Вспомогательное оборудование и материалы.....	6
6.1.2	Проведение отборов.....	6
6.2.	Проведение лабораторных исследований.....	7
6.2.1	Вспомогательное оборудование и материалы.....	7
6.2.2	Проведение исследования.....	7
6.2.3	Обработка результатов исследований.....	8
7	Технологическо-экономические эффекты и эффективность.....	8
	ПРИЛОЖЕНИЕ А (рекомендуемое) Дифференциация косточковых культур по показателям неспецифической устойчивости к коккомикозу	10
	Библиография	12

Введение

Биологическая ценность плодов вишни и черешни неоспорима для здорового рациона человека. Однако площадей под данными культурами в России недостаточно для полномасштабного обеспечения населения этими фруктами. К тому же имеющиеся насаждения подвергаются негативному воздействию биотических и абиотических факторов. Болезни и вредители наносят огромный ущерб насаждениям, значительно уменьшая урожайность культур. Одной из причин снижения урожайности и гибели растений является развитие вредоносного грибного заболевания – коккомикоза (возбудитель – *Coccomyces hiemalis* Higgins, *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx). Болезнь поражает листья, плоды и побеги растений, вызывает преждевременный листопад, что ведет к ослаблению растений перед зимовкой и гибели при низких отрицательных температурах. В питомниководстве патоген поражает подвои, которые становятся непригодными для проведения прививок.

Наиболее экологичный путь борьбы с заболеванием – поиск, создание, расширение генетического разнообразия устойчивого к возбудителю сортимента черешни и вишни.

Начальный этап создания устойчивых сортов – это выявление источников устойчивости, т.е. форм с минимальным количеством поражения коккомикозом. Поиск новых резистентных форм со временем все возрастает вследствие утраты эффективности выделенных ранее источников устойчивости. Выделение устойчивых образцов невозможно без знания биологии возбудителя болезни, разработки и совершенствования методов изучения устойчивости.

Представленный метод является многостадийным алгоритмом выделения возбудителя коккомикоза в чистую культуру, оценки устойчивости образцов черешни и вишни к патогену в полевых и лабораторных условиях.

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ

СЕЛЕКЦИЯ МЕЛКОПЛОДНЫХ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР

Метод выделения образцов с полигенным типом устойчивости к коккомикозу

Selection small-fruited stone crops

Method of isolation of samples with polygenic type of resistance to coccomycosis

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на метод выделения образцов мелкоплодных косточковых культур с полигенным типом устойчивости к коккомикозу, используемый для изучения и выделения устойчивых к коккомикозу сортов черешни и вишни, сакур и подвоев для них.

Предложенный метод позволит точно определить потенциал устойчивости растений к болезни. Это даст возможность создать устойчивые во времени и пространстве к болезни сорта мелкоплодных культур для последующей закладки садов посадочным материалом, адаптивным к условиям Северного Кавказа и снизить издержки производства посадочного материала при возделывании промышленных садов, а также повысить рентабельность выращивания сельскохозяйственной продукции.

2 Нормативные ссылки

ГОСТ Р 530044-2008 Материал плодовых и ягодных культур посадочный. Термины и определения

ГОСТ 34231-2017 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Термины и определения

ГОСТ 59653-2021 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ Р 530044, ГОСТ 34231, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 коккомикоз: Болезнь, вызываемая сумчатым грибом *Blumeriella jaarii* (Rehm) Arch. (*Coccomyces hiemalis* Higgins), поражающая в основном листья косточковых плодовых деревьев.

3.2 полигенный тип устойчивости (полевая, расонеспецифическая, горизонтальная): Определяется наличием у растений комплекса свойств (наличием полигенов), снижающих скорость инфекции и ослабляющих агрессивность патогенов, что приводит к незначительному развитию болезни даже в благоприятные для заражения годы и сохраняется у растений дольше чем более расоспецифическая.

3.3 расоспецифическая устойчивость (вертикальная): Обеспечивает непоражаемость растений определенными расами возбудителя, но допускает поражение другими, контролируется одним или несколькими генами (моногенная или олигогенная).

3.4 палетка: Прозрачная сеточка разграфованная перпендикулярными линиями, образующими обычно квадратики со сторонами десять на десять миллиметров (1 см.), предназначена для определения площади.

4 Сокращения

- 4.1 ВНУ – высокая неспецифическая устойчивость.
- 4.2 ВС – восприимчивый сорт.
- 4.3 ОВНУ – очень высокая неспецифическая устойчивость.
- 4.4 СНУ –слабая неспецифическая устойчивость.
- 4.5 УНУ – умеренная неспецифическая устойчивость.
- 4.6 R – Устойчивый образец.
- 4.7 S – Восприимчивый образец.
- 4.8 Max. б. пор. – максимальный балл поражения.
- 4.9. гг. – года.

5 Сущность метода

Метод включает детальный анализ косточковых культур по критериям полигенной (расонеспецифической) устойчивости: степени поражения листа, количеству спор с 1 см² листа, количеству пустул на 1 см² листа и индексу устойчивости сортов.

6 Изучение полигенной устойчивости мелкоплодных косточковых культур к коккомикозу

Устойчивость подразделяется на вертикальный (расоспецифический) и горизонтальный (расонеспецифический) типы по [1]. Эти два типа устойчивости различаются по способу проявления, генетическому контролю и по влиянию на развитие эпифитотий.

Сорта с вертикальной устойчивостью теряют резистентность в связи с появлением и адаптацией на них новых, более вирулентных форм патогена. Расонеспецифической устойчивостью обладают сорта, характеризующиеся частичной устойчивостью или обладающие неполной устойчивостью. Сортам, обладающим расонеспецифической (полевой, горизонтальной) устойчивостью, в соответствии с [2]-[4] свойственно пониженное образование количества пустул гриба по сравнению с восприимчивым сортом, увеличение продолжительности латентного периода, ограничение спорообразующей способности гриба.

Изучение устойчивости включают в себя полевые и лабораторные исследования.

6.1 Отбор растительного материала

6.1.1 Вспомогательное оборудование и материалы

Для проведения испытания применяют:

- лупу,
- емкости для переноса и хранения образцов;
- сумку-холодильник;
- этикетки;
- секатор (ножницы).

6.1.2 Проведение отборов

Для детального обследования растений на предмет заражения коккомикозом в саду с двух или более деревьев каждого сорта черешни или вишни отбирают по 10-12 молодых листьев на приростах текущего года в средней части дерева с четырех сторон. Для оценки также необходимо произвести отбор с деревьев сортов, различающихся по степени поражения (контрольных). Пробы собирают

(срезают с черешком) рано утром, этикируют, кладут в специальные пакеты и в сумку холодильник, переносят в лабораторию. Лучше всего проводить отбор образцов в период развития болезни, вызываемой грибом *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx. (*Coccomyces hiemalis* Higgins).

Примечания:

1. В качестве устойчивого контроля используются образцы вида *Cerasus serrulata* (Lindl.) G. Don. (непоражаемая форма) и вишня Южанка (ВНУ);

2. В Краснодарском крае восприимчивые сорта вишни Любская и Konserwen, черешни – Лучезарная, Валерий Чкалов, Французская черная.

6.2 Проведение лабораторных исследований

6.2.1 Вспомогательное оборудование и материалы

Для проведения испытания применяют:

- камеру Горяева,
- палетку.

6.2.2 Проведение исследования

В лабораторных условиях оценку проводят по критериям расонеспецифической устойчивости - по следующим показателям:

- степень поражения листа,
- количество спор с 1 см² листа,
- количество пустул на 1 см² листа,
- индекс устойчивости сортов,
- генеративная активность гриба.

Учеты проводят на 10-12 листьях одного сорта.

У форм со слабым поражением листьев количество пустул подсчитывают с обеих сторон листовой пластинки. Учеты проводят в шахматном порядке на 1 см² в среднем по 8-15 квадратов в зависимости от размера листа, в итоге от 80 до 180 квадратов на сорт. Определяют среднее количество пустул на листе и затем определяют среднее количество пустул по сорту. При подсчете количества спор с 1 см² листа также споры считают в шахматном порядке с 1 см² листа с нижней стороны листовых пластинок в среднем по 8-15 квадратов в зависимости от размера листа. Учет проводят на 10-12 листьях одного сорта, используя камеру Горяева с помощью которой подсчитывают среднее количество спор на 1 см² листа и в среднем с 8-15 квадратов. Подсчет количества спор проводят в камере Горяева по диагонали в 10-12 клетках в 2-х повторностях и вычисляют среднее количество спор на 1 квадрате листа.

На средне- и сильнопоражаемых сортах подсчет спор с 1 см² листа проводят по методу «со всей площади листа». Его отличия заключается в том, что споры берут не с единицы площади листа, а со всей поверхности листа. Определяют площадь листа по [5], подсчитывают в камере Горяева количество спор. Количество спор делят на площадь листа и получают количество спор с 1 см² листа. Там, где пятна сильно сливающиеся, определяют только число спор с 1 см² листа. Таким образом на одном сорте (10-12 листьях сорта) отмечают процент поражения листа, определяют средний процент поражения, подсчитывают количество спор с 1 см² и количество пустул на 1 см². Определяют среднее количество спор и пустул.

На образцах, где поражение на листе неравномерное, проводят учет числа спор и количества пустул на всем листе. Затем определяют площадь листа и переводят в показатель с 1 см² листа.

На образцах без спороношения учитывают процент поражения листа и количество пустул на 1 см² листа. Со спороношением учитывают процент поражения листа, количество пустул на 1 см², количество спор на 1 см² листа,

количество спор в 1 пестуле (генеративная активность гриба). Далее среднее количество спор в одной пестуле вычисляют по формуле:

$$\frac{\text{среднее количество спор в одной пестуле}}{\text{среднее количество спор с } 1 \text{ см}^2} = \frac{\text{среднее количество спор с } 1 \text{ см}^2}{\text{среднее количество пестул на } 1 \text{ см}^2 \text{ листа}} \quad (1)$$

Индекс устойчивости или количество спор с 1 см² листа вычисляют по формуле:

$$\text{среднее кол-во спор в одной пестуле} \times \text{среднее кол-во пестул на } 1 \text{ см}^2 \text{ листа} \quad (2)$$

6.2.3 Обработка результатов исследований

Классификация образцов черешни, вишни, сакур, подвоев и гибридов мелкокосточковых проводится по установленным критериям устойчивости (таблица).

Таблица

Степень устойчивости сортов (СУС)	Индекс устойчивости (ИУ)	Генеративная активность гриба (ГАГ)	Среднее количество пестул на 1 см ² листа (СКП)
Восприимчивый сорт (ВС)	Более 50×105 -106	1+104-105	более 17
Слабая неспецифическая устойчивость (СНУ)	Более 1+30×104-105	1+103-104	более 10
Умеренная неспецифическая устойчивость (УНУ)	1+15-30×103-104	1+102-103	5-10
Высокая неспецифическая устойчивость (ВНУ)	1+30-150×10-102	1+10-102	1-5
Очень высокая неспецифическая устойчивость (ОВНУ)	0-3×10-102	0-10	0-1

Для селекции и производства наибольший интерес представляют формы, которые сочетают в себе устойчивость к заражению и подавлению инфекции.

Пример проведения исследований приведен в Приложении А.

7 Технолого-экономические эффекты и эффективность

При использовании методики выделения генотипов с полигенным типом устойчивости к коккомикозу в сравнении с классической схемой оценки наблюдается:

- повышение точности выполнения исследований по выделению растений с расонеспецифической устойчивостью на 30-100% (улучшение качества продукции).
- сокращение времени на оценку устойчивости образцов к коккомикозу в среднем на 3 года (ресурсоэнергосбережение).
- сокращение трудовых затрат в 3 раза (ресурсоэнергосбережение)
- сокращение материальных и трудовых затрат в среднем на 620 руб./образец или в 4,2 раза (технолого-экономические эффекты и эффективность).

При использовании устойчивых к коккомикозу форм наблюдается:

- повышение продуктивного потенциала агроценоза и уровня его реализации за счет биологической эффективности фунгицидов нехимического класса для контроля коккомикоза, которая составляет 40-100 % и увеличение урожайности черешни и вишни на 30 %.

- улучшение качества продукции за счет повышения стандартности саженцев вишни, черешни до 95 %, повышения стандартности плодов до 90 %.

- ресурсоэнергосбережение за счет снижения издержек на защитные мероприятия на 15 %.

- природоохранность и экологическая безопасность (экологическая эффективность) на основе снижения токсичной нагрузки на 15 %, за счет использования пестицидов нехимического класса.

- технолого-экономические эффекты и эффективность: дополнительная прибыль от продаж – 329,6 тыс. руб./га, увеличение рентабельности производства – на 23,1 п.п.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(рекомендуемое)

Дифференциация косточковых культур по показателям неспецифической устойчивости к коккомикозу

А.1. На первом этапе проводят изучение на листьях, взятых с растений, показателей полигенной устойчивости согласно 6.2.2: среднее количество пустул на 1 см² листа, генеративная активность гриба, индекс устойчивости.

Результаты изучения полигенной устойчивости за 2016-2022 гг. приведены в таблице А.1.

Таблица А.1.

Название образца	2016-2022 гг Мах.б. пор деревьев	Показатели неспецифической устойчивости								
		Среднее количество пустул на 1 см ² листа			Генеративная активность гриба			Индекс устойчивости		
		2016	2017	2018	2016	2017	2018	2016	2017	2018
Чудо вишня	4	7±1,6	6,1±1,1	1,4±1,3	5714	32787	17855	12×10 ⁵	6×10 ⁶	7×10 ⁴
Бигарро Оратовского	3	2±1,6	14±1,9	0,05±1,6	1250	7142	85000	8×10 ⁴	3×10 ⁶	12×10 ⁴
Космическая клон	2	2±1,6	0,5±1,9	0,1±1,1	1000	0	7500	6×10 ⁴	0	2×10 ⁴
Мак	4	16±1,7	5±1,4	7,7±1,4	100	1×10 ⁵	8441	48×10 ³	1×10 ⁷	19×10 ⁵
Вишня декор. СТ	0	-	1,2±1,2	0	-	41666	0	-	2×10 ²	0
Молодежная	3	4±1,7	4±1,4	-	5000	37500 0	-	6×10 ⁵	4×10 ⁷	-
Крупноплодная	3	8±1,3	10±1,3	-	25000	3431	-	6×10 ⁶	1×10 ⁶	-
3-33-34	0,1	-	1,7±1,6	0,16±1,4	-	2717	0	-	4619	0
Южанка	0,1	-	5,2±1,3	0,08±1,1	-	2629	0	-	13671	0
6/4К	1	-	0,7±1,3	0	-	1298	0			
БИ 43 II	0									
6/8 К	0,1									
Французская Черная	4	17±1,6	10±1,9	6,9±1,6	11764	75000	4096	6×10 ⁶	2×10 ⁷	8×10 ⁵

А.2. На втором этапе проводят классификацию образцов черешни, вишни, сакур, подвоев и гибридов мелкокосточковых по установленным критериям устойчивости согласно 6.2.3.

Результаты по распределению образцов черешни и вишни по степени расонеспецифической устойчивости к коккомикозу за 2016-2021 гг. приведены в таблице А.2.

Таблица А.2.

Название образца	Показатели неспецифической устойчивости		
	Среднее количество пустул на 1 см ² листа (СКП)	Генеративная активность гриба (ГАГ)	Индекс устойчивости (ИУ)
Чудо вишня	УНУ	СНУ	ВС
Бигарро Оратовского	СНУ	ВС	ВС
Клон Космическая	ВНУ	СНУ	УНУ
Мак	ВС	ВС	ВС
Вишня декор. СТ	ВНУ	СНУ	ВНУ
Молодежная	УНУ	ВС	ВС
Крупноплодная	СНУ	ВС	СНУ
Сашенька	ВС	ВНУ	УНУ
3-33-34	ВНУ	УНУ	УНУ
Южанка	ВНУ	ВНУ	ВНУ
6/4К	ВНУ	ОВНУ	ОВНУ
БИ 43 II	ОВНУ	ОВНУ	ОВНУ
6/8 К	ОВНУ	ОВНУ	ОВНУ
БИ 43 I	ОВНУ	ОВНУ	ОВНУ
Французская Черная (контроль)	ВС	ВС	ВС

А.3. На третьем этапе выделяют лучшие формы по устойчивости с полигенным контролем.

В данном примере - это вишни 3-33-34, Южанка, формы подвоев 6/4К, БИ 43 II, 6/8 К, БИ 43 I, сакура Вишня декор. СТ и среди сортов черешни –Космическая.

Библиография

- [1] Ван дер Планк Я. Ван дер Планк Я. Устойчивость растений к болезням. М.: Колос, 1972. 254 с.
- [2] Одинцова, И. Г. Лабораторный метод определения неспецифической устойчивости пшеницы к бурой ржавчине / И. Г. Одинцова, Л. А. Михайлова //Сельскохозяйственная биология. – 1981. – Т. 16, № 1. – С. 137 – 141.
- [3] Дьяков Ю. Т., Озерецковская О. Л., Джавахия В. Г., Багирова С. Ф. Общая и молекулярная фитопатология. — М.: Общество фитопатологов, 2001. — 301 с.
- [4] Сюков В.В., Тырышкин Л.Г., Захаров В.Г. Доноры полевой устойчивости яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) к листовой бурой ржавчине (*Puccinia recondite* Rob. Ex Desm.) // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, т. 16, №5(3), 2014. С. 1166-1172.
- [5] Курьянов С. А., Гордеев А. С. Методика массовых измерений площади листьев растений //Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. – 2015. – №. 3. – С. 193-202.

Ключевые слова: изучение устойчивости, черешня, вишня, коккомикоз, расоспецифическая и расонеспецифическая устойчивость, методы изучения устойчивости

Разработано:

Селекционно-семеноводческим (питомниководческим) центром в сфере плодово-ягодных культур и винограда

Зав. лабораторией
питомниководства,
канд. биол. наук



А.П. Кузнецова

Согласовано:

Зав. Селекционно-семеноводческим
(питомниководческим) центром в сфере
плодово-ягодных культур и винограда,
канд. биол. наук



И.И. Супрун

Зам. директора по НИР,
д-р техн. наук, профессор



И.А. Ильина

Эксперт по стандартизации,
канд. техн. наук



Л.Э. Чемисова

Ст. науч. сотр. УНИР, маркетолог-патентовед
канд. с.-х. наук



И.А. Мачнева

Приложение В

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
САДОВОДСТВА, ВИНОГРАДАРСТВА, ВИНОДЕЛИЯ»
(ФГБНУ СКФНЦСВВ)



СТАНДАРТ
ОРГАНИЗАЦИИ

СТО
00668034-142-
2022

ВИРУСЫ ВИНОГРАДА

МЕТОДИКА ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА СКРУЧИВАНИЯ
ЛИСТЬЕВ ВИНОГРАДНОЙ ЛОЗЫ 1
(GLRaV-1) С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Краснодар
2022

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 года №184-ФЗ «О техническом регулировании» и Федеральным законом от 29 июня 2015 года № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации»

Сведения о стандарте

4. РАЗРАБОТАН сектором бактериологии и вирусологии ФГБНУ СКФНЦСВВ, в рамках **соглашения Министерства науки и высшего образования РФ №075-15-2021-536 от 31.05.2021**
5. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом директора ФГБНУ СКФНЦСВВ № 145 от 15.09.2022 г.
6. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального документа без разрешения ФГБНУ СКФНЦСВВ

Содержание

1 Область применения.....	5
2 Нормативные ссылки.....	5
3 Термины и определения.....	5
4 Средства измерения, оборудование и реактивы.....	6
4.1 Средства измерения, оборудование.....	6
4.2 Лабораторная посуда и материалы.....	6
4.3 Реактивы.....	6
5 Организация работы.....	6
6 Сущность методики.....	7
7 Подготовка к проведению испытаний	7
7.1 Пробоподготовка.....	7
7.2 Проведение реакции обратной транскрипции.....	7
7.3 Проведение ПЦР в реальном времени	7
7.4 Учет и интерпретация результатов.....	8
Приложение А (рекомендуемое) Праймеры, используемые для детекции-- вируса скручивания листьев виноградной лозы 1.....	9
Приложение Б (рекомендуемое) Результаты детекции вируса скручивания-- листьев виноградной лозы 1	10
БИБЛИОГРАФИЯ	11
ЛИСТ РЕГИСТРАЦИИ ИЗМЕНЕНИЙ	12

Введение

На современном этапе развития молекулярно-генетических исследований в отрасли виноградарства, в частности развития селекции и питомниководства, все большую актуальность приобретает внедрение методов идентификации вирусных фитопатогенов, имеющих возрастающее экономическое значение для производства винограда. Одними из наиболее эффективных являются методы, основанные на использовании полимеразной цепной реакции.

Предлагаемая методика идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 (GLRaV-1) основана на применении полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием красителя SYBR.

Методика основана на использовании реакции обратной транскрипции и последующей амплификации фрагментов генома вируса с помощью ПЦР в реальном времени.

Разработанная методика позволяет эффективно выполнять идентификацию вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 и может быть использована для оценки посадочного материала и/или фитосанитарного мониторинга виноградных насаждений.

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ

МЕТОДИКА ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ ВИНОГРАДНОЙ ЛОЗЫ 1 (GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUS 1) С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUS 1 USING REAL-TIME PCR

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на вирусы винограда и позволяет идентифицировать вирус скручивания листьев виноградной лозы 1 (далее – вирус скручивания листьев) методом полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР).

Настоящий стандарт предназначен для применения специализированными учреждениями, занимающимися селекционно-генетическими исследованиями, селекцией, выращиванием винограда, контролем и подтверждением качества растений винограда.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие национальные стандарты:

ГОСТ Р 52833-2007 Метод полимеразной цепной реакции для определения патогенных микроорганизмов

ГОСТ Р 53214-2008 Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины (сокращения) с соответствующим определением:

6.1 **вирус скручивания листьев виноградной лозы 1**, GLRaV-1: один из наиболее экономически важных вирусов винограда

6.2 **комплементарная ДНК**, кДНК – ДНК, синтезированная на матрице РНК с помощью фермента обратная транскриптаза

6.3 **обратная транскрипция**: синтез двуцепочечной ДНК на матрице одноцепочечной РНК.

6.4 **полимеразная цепная реакция**; ПЦР: циклический ферментативный процесс, результатом которого является получение многочисленных копий определенного участка молекулы ДНК.

6.5 **полимеразная цепная реакция в режиме реального времени**: полимеразная цепная реакция, проводимая по специальной технологии, которая позволяет регистрировать накопление ПЦР-продуктов в процессе амплификации.

4 Средства измерения, оборудование и реактивы

4.1 Средства измерения, оборудование

Амплификатор для проведения ПЦР в режиме реального времени LightCycler 96 (Roche Diagnostics), амплификатор ДТ Прайм 5М1 (ДНК-Технология), или модель, не уступающая данным по характеристикам скорости нагрева/охлаждения реакционного блока.

Детектирующий амплификатор должен иметь оптический канал измерения флуоресценции в диапазоне 494 нм – 521 нм, что соответствует максимумам поглощения и испускания SYBR Green I.

Детектирующий амплификатор должен иметь программное обеспечение, позволяющее выполнять запуск прибора, сбор, хранение и анализ полученных данных.

Микроцентрифуга настольная типа эппендорф (частота вращения не менее 13000 об./мин).

Термостат твердотельный для пробирок типа эппендорф вместимостью 1,5 см³, диапазон температур от 25 до 100°C.

Дозаторы пипеточные автоматические с переменным объемом дозирования от 0,1 до 1000 мм³ с точностью ±0,8 %.

4.2 Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Наконечники одноразовые с фильтром для дозаторов с переменным объемом дозирования от 0,1 до 1000 мм³.

Пробирки типа эппендорф вместимостью 0,5 и 1,5 см³.

Халаты, шапочки, маски, бахилы одноразовые, перчатки резиновые или латексные неопудренные.

4.3 Реактивы

Набор БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) для проведения количественного ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I¹.

Набор реактивов MMLV RT kit для синтеза первой цепи ДНК².

Олигонуклеотиды, специфичные к геному вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 и к гену внутреннего контроля - актина (Приложение А) [1].

5 Организация работы

При организации работы в лаборатории для детекции вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 в образцах винограда необходимо руководствоваться правилами организации работы в ПЦР лаборатории (ГОСТ Р 52833, ГОСТ Р 53214). Следует разделять этапы анализа (пробоподготовка, постановка реакции обратной транскрипции и проведение ПЦР в реальном времени) и соблюдать принцип однонаправленности перемещения образцов в лаборатории от пробоподготовки к ПЦР в реальном времени.

¹ Например, производства ООО «Биолабмикс», кат. № МНС030-2040.

² Например, производства ЗАО «Евроген», кат. № SK021.

6 Сущность методики

Методика идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 основана на применении метода ПЦР в реальном времени с использованием красителя SYBR. На первой стадии идентификации на матрице тотальной РНК проводится реакция обратной транскрипции, на второй – ПЦР в реальном времени со специфичными к вирусному геному праймерами. В качестве эндогенного контроля используется реакция с праймерами на ген актина.

7 Подготовка к проведению испытаний

7.1 Пробоподготовка

Экстракция проб тотальной растительной РНК, необходимых для идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1, проводится как описано ранее [2].

7.2 Проведение реакции обратной транскрипции

Синтез кДНК на матрице РНК осуществляется с помощью набора реактивов MMLV RT по протоколу производителя³.

Состав реакционной смеси готовят по следующей прописи, смешивая компоненты:

праймер (Random Hexamer): 1 мкл из рабочего раствора с концентрацией 10 мМ;

РНК матрица: 1 мкг;

5X буфер для синтеза первой цепи: 4 мкл;

dNTP: 2 мкл из смеси с концентрацией 10 мМ каждого нуклеотида;

DTT: 2 мкл (20мМ);

MMLV ревертаза: 0,5 мкл (50 ед.);

вода MQ: до общего объема 20 мкл.

7.3 Проведение ПЦР в реальном времени

7.3.1 Состав реакционной смеси:

- БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2x): 12,5 мкл;
- праймеры: по 1 мкл прямого и обратного праймера на ген актина или геном вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 из рабочего раствора с концентрацией 10 мМ;
- кДНК: 1 мкл;
- стерильная вода: 9,5 мкл.

Параметры прохождения реакции обратной транскрипции устанавливаются согласно прилагающейся к набору инструкции.

³ Например, ЗАО «Евроген».

⁴ Например, производства ООО «Биолабмикс», кат. № МНС030-2040.

Проведение ПЦР в реальном времени для идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 осуществляется по протоколу производителя реактивов HS-qPCR SYBR Blue⁴.

При проведении ПЦР в реальном времени необходимо установить следующие параметры амплификации:

начальная денатурация – 5 мин. при 95°C;

следующие 40 циклов:

денатурация – 10 с. при 95°C,

отжиг праймеров – 15 с. при 55°C,

элонгация – 20 с. при 72°C;

плавление – 55-97°C.

7.4 Учет и интерпретация результатов

7.4.1 Результаты оценивают по каждой анализируемой пробе отдельно.

7.4.2 По завершении ПЦР в реальном времени полученные данные обрабатывают с помощью программного обеспечения амплификатора (Приложение Б). Для верификации продуктов амплификации осуществляют анализ кривых плавления, что позволяет идентифицировать продукты ПЦР, различающиеся по содержанию GC и длине.

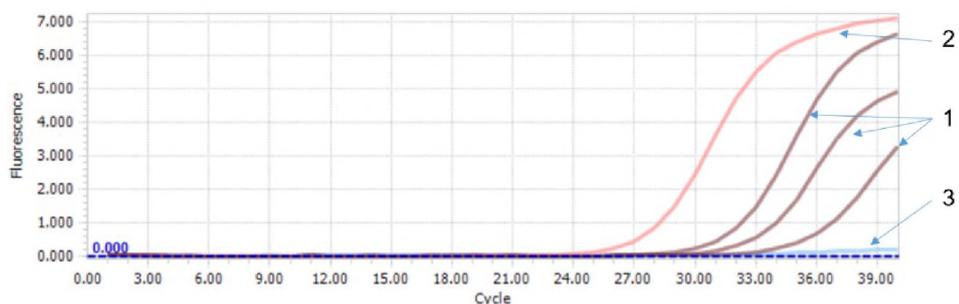
Приложение А
(рекомендуемое)
Праймеры, используемые для детекции вируса скручивания листьев
виноградной лозы 1

Таблица А.1

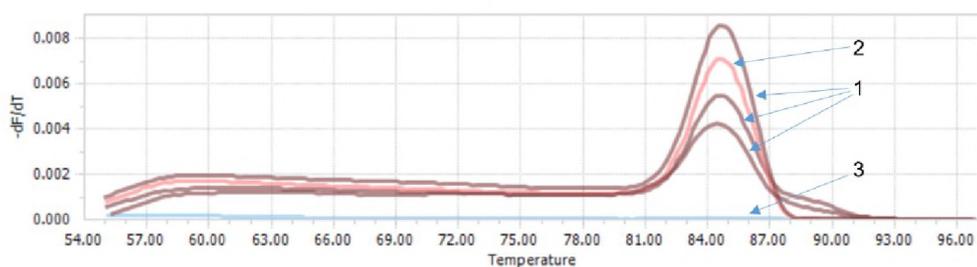
Целевой вирус / ген	Название праймера	Последовательность нуклеотидов	Размер ПЦР продукта, пн	Температура отжига, °С
GLRaV-1	GLRaV1_F2	AAAYTRACTTATGAGAAGGT	380	55
	GLRaV1_R2	ATAGGAGCCACTAACGCCGT		
актин	Vvactin601s	ACTGGTATTGTGCTGGATTC	599	55
	Vvactin1200as	GGATGCAAGAATTGATCCTC		

Приложение Б
(рекомендуемое)

Результаты детекции вируса скручивания листьев виноградной лозы 1



а)



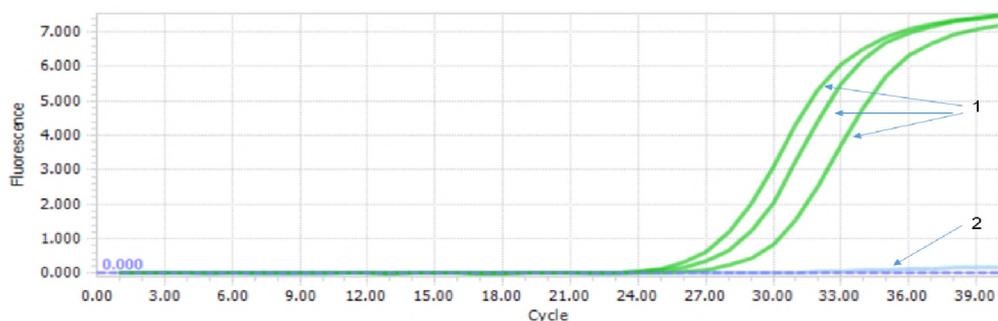
б)

Примечания:

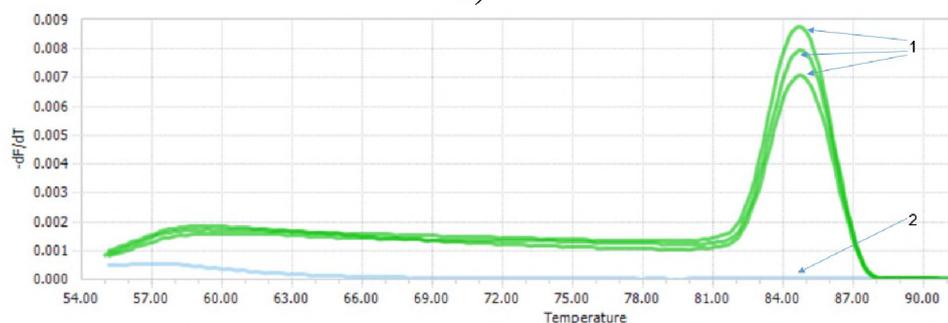
а) кривые амплификации кДНК в анализируемых образцах;

б) кривые плавления амплифицированных фрагментов кДНК; 1 – исследуемые образцы; 2 – положительный контроль на вирус скручивания листьев виноградной лозы 1; 3 – отрицательный контроль.

Рисунок Б.1



а)



б)

Примечания:

а) кривые амплификации анализируемых образцов;

б) кривые плавления амплифицированных фрагментов в исследуемых образцах; 1 – амплификация гена актина; 2 – отрицательный контроль.

Рисунок Б.2

Библиография

- [1] H. Fakhreddine, Virus Diagnostic Survey of Grapevine Rootstock Varieties from the Stock Collection of Pécs: MSc Plant biotechnology at the Institute of Genetics and Biotechnology / H. Fakhreddine : Szent Istvan University. – Godollo, 2016. – 54 p.
- [2] M. Rott, W. Jelkmann, Characterization and Detection of Several Filamentous Viruses of Cherry: Adaptation of an Alternative Cloning Method (DOP-PCR), and Modification of an RNA Extraction Protocol // European Journal of Plant Pathology. – 2001. – V. 107. – P. 411–420.

Ключевые слова: вирусы винограда, вирус скручивания листьев виноградной лозы 1, обратная транскрипция, ПЦР в реальном времени

Разработано:

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

Е.Г. Юрченко

Зав. сектора бактериологии и вирусологии,
канд. биол. наук

С.В. Виноградова

Младший научный сотрудник
сектора бактериологии и вирусологии

Д.В. Карпова

Согласовано:

Зам. директора по НИР,
д-р техн. наук, профессор

И.А. Ильина

Ст. науч. сотр. научного центра «Виноделие»,
эксперт по стандартизации,
канд. техн. наук

Л.Э. Чемисова

Ст. науч. сотр. УНИР, маркетолог-патентовед,
канд. с.-х. наук

И.А. Мачнева

Приложение Г

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
"Северо-Кавказский федеральный научный центр
садоводства, виноградарства, виноделия"
(ФГБНУ СКФНЦСВВ)

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ СКФНЦСВВ


Егоров Е.А.
« 4 » сентября 2022 г.

ТИ 01.30.10.132 – 176 – 00668034-2022

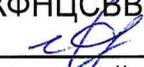


ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ по способу укоренения микрорастений подвоя сливы домашней

Дата введения «15» сентября 2022 г.

РАЗРАБОТАНО:

зав. ФНЦ «Селекции и питомниководства»
ФГБНУ СКФНЦСВВ


И.И. Супрун

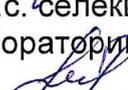
зав. лабораторией вирусологии
ФГБНУ СКФНЦСВВ


М.А. Амосова

м.н.с. лаборатории вирусологии
ФГБНУ СКФНЦСВВ


С.В. Федорович

м.н.с. селекционно-биотехнологической
лаборатории ФГБНУ СКФНЦСВВ


Е.В. Лободина

м.н.с. селекционно-биотехнологической
лаборатории ФГБНУ СКФНЦСВВ


А.О. Авакимян

м.н.с. селекционно-биотехнологической
лаборатории ФГБНУ СКФНЦСВВ


Е.А. Аль-Накиб

Краснодар 2022

1 Область применения

Настоящая технологическая инструкция распространяется на процесс клонально-микроразмножения подвоя сливы домашней ПК СК 1. Предназначена для научных и производственных учреждений, занимающихся производством посадочного материала плодовых культур высших категорий качества с использованием метода клонально-размножения растений.

Держателем данного документа является Селекционно-семеноводческий (питомниководческий) центр в сфере плодово-ягодных культур и винограда ФГБНУ СКФНЦСВВ, созданный в рамках соглашения Министерства науки и высшего образования РФ №075-15-2021-536 от 31.05.2021

Настоящая технологическая инструкция может быть разработана для сторонних организаций только по согласованию с руководством **ФГБНУ СКФНЦСВВ**.

2 Технологическая схема производства микрорастений подвоя сливы домашней

2.1 Подготовка растительного материала, стерилизация эксплантов

Для введения в культуру отбираются активно верхушки побегов здоровых, протестированных на вирусы маточных растений. Время отбора май-июнь, период активного роста.

Основную стерилизацию эксплантов подвоя проводят раствором «ОКА-ТАБ». Преимущество использования этого стерилизующего средства заключается в большей безопасности для человека, экологичности для окружающей среды и меньшей фитотоксичности для растений.

2.2 Мультипликация микропобегов

Для введения и на этапе мультипликации микропобегов применяют питательную среду Мурасиге-Скуга, с полным содержанием макро- и микросолей, витаминов, сахарозы, агар-агара. Концентрация цитокинина 6-БАП - 0,5-1,0 мг/л. Каждые 30 суток проводится субкультивирование (пассаж) регенерированных микропобегов на свежую питательную среду. Максимальное количество пассажей – 10.

2.3 Этап ризогенеза

Развитие корневой системы в культуре *in vitro* определяется, в первую очередь, генотипом растений. Этап укоренения является сложным процессом в размножении культуры тканей многих плодовых деревьев, в особенности сортов и подвоев рода *Prunus*. Разработан способ, повышающий выход укорененных микрорастений подвоя сливы домашней.

3 Способ укоренения микрорастений подвоя сливы домашней

На процесс корнеобразования оказывает влияние состав питательной среды: минеральные компоненты на этапе укоренения и в предыдущих пассажах; тип углеводов и их концентрация; консистенция среды; концентрация и соотношение биологически активных веществ. Методика укоренения *invitro* позволяет контролировать физические факторы, гормональный и солевой состав питательной среды.

3.1 Состав питательной среды для укоренения

Этап ризогенеза микропобегов клоновых подвоев проводят на среде Мурасиге-Скуга с половинным составом макросолей (мг/л): NH_4NO_3 – 825; KNO_3 – 950; KH_2PO_4 ·85; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 185, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 220; мезоэлементы: Fe-EDDHA (6%) – 100; микроэлементы: H_3BO_3 - 6,2; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 22,3; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 8,6; KJ - 0,83; Na_2MoO_4 - 0,25; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,0225; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,025; мезоинозит – 50; тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота – по 0,5; сахароза – 20000; агар-агар – 6700; остальное бидистиллированная вода до 1000; pH - 5,6÷5,8.

Fe-EDDHA(6 %) (этилендиамин ди-2-гидроксифенилацетата железа) - высокоэффективная хелатная форма железа, применяемая в качестве источника железа в удобрениях или для лечения и профилактики хлороза, вызванного дефицитом железа. Железо в данной форме легко усваивается. Его применение нормализуется уровень хлорофилла в растениях, улучшатся фотосинтез и дыхательная функция, стимулируется рост вегетативной массы растений. Кроме того, данная форма железа устойчиво в широком диапазоне pH от 3.0 до 9.0.

Приготовленная среда разливается в культивационные сосуды и автоклавируется под давлением 1 атм, при температуре 120°C 20 минут.

3.2. Условия культивирования

Культивирование микропобегов осуществляется в культуральной комнате в условиях стандартного фотопериода 16/8 (день - 16 часов, ночь - 8 часов), освещенности 2500-3000 люкс, температуре +24±2 °C и влажности 50-60 %.

Технологический эффект

Технологический эффект достигается за счет использования высокой эффективности укоренения, качества корней микрорастений подвоя, при снижении финансовых затрат и минимизации лабораторных процедур (действий) в процессе приготовления питательной среды, что важно при массовом размножении растений с использованием метода клонального размножения.

Fe-EDDHA выпускается в виде порошка (в отличие от 2х компонентного Fe-EDTA, маточный раствор которого готовится в два этапа), поэтому необходимо только отмерить необходимое количество порошка и добавить его непосредственно в питательную среду, таким образом трудовые затраты снижаются на 6 %.

Среда с Fe-EDDHA позволяет заметно снизить количество микропобегов, отбракованных из-за некроза, улучшить состояние растений за счет увеличивающейся вегетативной массы (побегов, листьев). Даже без использования индукторов корнеобразования, образование корней начинается на 7 сутки. Корни образуются качественные, не хрящеватые, что положительно сказывается на процессе адаптации.

Экономический эффект

Замена формы хелата железа Fe-ЭДТА на Fe-EDDHA(6 %) на этапе укоренения способствует повышению эффективности укоренения на 26,9 % и повышению качества микрорастений. Себестоимость производства регенерантов *in vitro* снижается в на 25 %.

4 ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

На этапе введения эксплантов в культуру *invitro* работе со стерилизующим средством не допускаются лица с повышенной чувствительностью к хлорсодержащим препаратам.

Все работы с раствором проводят с защитой кожи рук резиновыми перчатками.

При попадании средства на кожу смыть его проточной водой.

При попадании средства в глаза следует промыть их под проточной водой в течение нескольких минут. При раздражении слизистых оболочек закапать в глаза 20 % или 30 % раствор сульфацила натрия.

При появлении первых признаков острого раздражения органов дыхания необходимо выйти на свежий воздух или в хорошо проветриваемое помещение, прополоскать горло, рот, нос, выпить теплое питье или молоко.

Работать в лаборатории необходимо в халате, защищая одежду и кожу от попадания едких реактивов и обсемененности микроорганизмами.

Рабочее место следует поддерживать в чистоте, не загромождать его посудой и побочными вещами.

По окончании работы следует привести в порядок свое рабочее место: помыть посуду, протереть поверхность рабочего лабораторного стола, закрыть водопроводные краны, выключить электрические приборы.

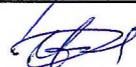
СПИСОК ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

неограниченное пользование

(перечень структурных подразделений и/или Ф.И.О. допущенных к ознакомлению

и/или пользованию документом)

ЛИСТ СОГЛАСОВАНИЙ

Должность, наименование подразделения	ФИО	Запись о наличии или отсутствии замечаний (есть/нет)	Подпись	Дата
Председатель Совета по стандартизации	Ильина И.А.			
Член Совета по стандартизации	Чемисова Л.Э.			
Патентовед-маркетолог, Управление НИР	Мачнева И.А.			

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ ПРИКАЗОМ № 145 от 15 сентября 2022 г.

РАЗРАБОТАН Селекционно-семеноводческим (питомниководческим) центром в сфере плодово-ягодных культур и винограда ФГБНУ СКФНЦСВВ

СОГЛАСОВАН:

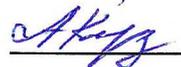
Заведующий лабораторией селекционно-биотехнологической канд. биол. наук

14.09.2022 С.В. Токмаков
дата



Заведующая лабораторией питомниководства, канд. биол. наук

14.09.2022 А.П. Кузнецова
дата



ЗАРЕГИСТРИРОВАН за № _____ от _____

Приложение Д

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
"Северо-Кавказский федеральный научный центр
садоводства, виноградарства, виноделия"
(ФГБНУ СКФНЦСВВ)

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ СКФНЦСВВ
Егоров Е.А.
« 14 » _____ 2022 г.

ТИ 01.60.10.290 – 181 – 00668034-2022

Технологическая инструкция по оптимизации минерального питания тиражированных маточных растений в ампелоценозе

Дата введения «15» сентября 2022 г.

РАЗРАБОТАНО:

Зав. ФНЦ «Виноградарство и виноделие»,
старший научный сотрудник, канд. с.-х. наук
Д.Э. Руссо _____

Старший научный сотрудник лаборатории
управления воспроизводством ампелоценозах
и экосистемах, канд. с.-х. наук
А.А. Красильников _____

Краснодар 2022

1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая технологическая инструкция (ТИ) распространяется на технологию возделывания тиражированных⁴ (клоновых) маточных растений винограда, заложенных элитным посадочным материалом второго поколения для производства репродукционных (стандартных) черенков (для производственных насаждений винограда), и устанавливает общие требования, регламентирующие применение биологизированной системы удобрения растений в условиях юга России. ТИ предназначена для специализированных виноградовинодельческих предприятий и фермерских хозяйств, занимающихся производством посадочного материала винограда.

Держателем данного документа является Селекционно-семеноводческий (питомниководческий) центр в сфере плодово-ягодных культур и винограда ФГБНУ СКФНЦСВВ, созданный в рамках соглашения Министерства науки и высшего образования РФ №075-15-2021-536 от 31.05.2021.

Настоящая технологическая инструкция может быть разработана для сторонних организаций только по согласованию с руководством ФГБНУ СКФНЦСВВ.

2 ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей технологической инструкции применены термины по ГОСТ Р 52681, ГОСТ 20432, ГОСТ 33380, ГОСТ EN 13535

Растение винограда	Растение, относящееся к роду <i>Vitis</i> семейства <i>Vitaceae</i> Juss
Сила роста куста винограда	Внешнее изменение куста винограда, проявляющееся через прирост суммарной длины, объема или массы побегов в единицу времени
Побег винограда	Орган куста винограда, включающий стебель с расположенными на нем листьями, глазками, гроздьями, пасынками, усиками
Вегетационный период винограда	Период календарного года с устойчивой среднесуточной температурой воздуха выше 10 °С
Пластичность	Способность сортов, клонов и популяции приспосабливаться к разнообразным почвенно-климатическим, погодным и агротехническим условиям
Засухоустойчивость	Способность куста винограда противостоять обезвоживанию и перегреву без значительного ущерба для его роста и развития
Маточник винограда	Виноградник, заложенный и возделываемый по специальной технологии с целью получения чистосортных, высококачественных черенков, используемых для выращивания саженцев винограда
Регенерация винограда	Свойство растения винограда восстанавливать утраченные части.
Безвирусный маточник винограда	Виноградник оздоровленных кустов винограда, выращиваемый для заготовки черенков, свободных от вирусной и микоплазменной инфекций

⁴ Тиражированных – воспроизводимых, размноженных, реплицированных, репродуцированных.

Клоновый маточник винограда	Виноградник, заложенный посадочным материалом, полученным от отдельных растений, отобранных в результате клоновой селекции
Выход черенков винограда	Количество стандартных черенков винограда, полученных с единицы площади маточника винограда или одного маточного куста
Апробация виноградников	Обследование виноградника с целью установления сортового состава и оценки общего состояния растений по урожайности, силе роста, пораженности болезнями и заселенности вредителями
Показатели качества посадочного материала винограда	Совокупность визуальных, линейных, количественных, анатомических, селекционных и фитосанитарных характеристик посадочного материала винограда, которые регламентированы требованиями нормативных документов и должны удостоверяться сопроводительными документами
Черенок винограда репродукционный	Отрезок однолетнего вызревшего или зеленого побега винограда различной длины, предназначенный для вегетативного размножения, происходящий из маточников биологической категории «Репродукционный», свободный от болезнетворных организмов, предназначенный для закладки производственных виноградников
Агротехника	Совокупность мероприятий и технологических приемов, используемых для выращивания винограда
Минеральное питание растений	Поглощение и усвоение питательных элементов растениями в минеральной форме
Некорневое питание растений	Поступление питательных элементов в растения через надземные органы
Питательный элемент	Элемент удобрения, необходимый для роста и развития растений
Биологически активные вещества; БАВ (biologically active substance; BAS)	Группа веществ, имеющих выраженную физиологическую активность
Агрехимикаты:	
Органоминеральное (биоминеральное) удобрение	Продукты, в которых декларированные питательные вещества как органического, так и неорганического происхождения получены смешиванием и/или химическим соединением органических удобрений и неорганических удобрений.
Удобрения на органической основе	Продукты, в которых декларированы питательные вещества неорганического происхождения, но которые смешаны с органическими материалами, такими как торф или лигнин
Эффлюент	Органическое удобрение, полученное в результате метангенерации навоза (помета), т.е. анаэробной переработки навоза (помета) в ферментерах-метантенках с образованием биогаза и эффлюента
Биогаз (biogas)	Газ, получаемый метановым брожением биомассы (смесь CH ₄ и CO ₂)

Доза удобрения	Количество удобрения, вносимого под сельскохозяйственную культуру за один прием
Технология внесения удобрения	Комплекс последовательных производственных операций по внесению удобрения
Способ внесения удобрения	Прием внесения удобрения под сельскохозяйственную культуру
Некорневая подкормка растений	Подкормка растений удобрениями опрыскиванием или опыливанием надземной части растений

3 ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ СПОСОБА ОПТИМИЗАЦИИ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ ТИРАЖИРОВАННЫХ МАТОЧНЫХ РАСТЕНИЙ В АМПЕЛОЦЕНОЗЕ МАТОЧНИКА

Основной задачей оптимизации питания растений винограда в маточнике промышленного питомника по производству саженцев является поддержание необходимого уровня интенсивности обменных процессов, связанных с накоплением и передвижением солей, активности ассимиляционной деятельности, метаболических реакций, формирования пластичности. При этом важным аспектом оптимизации режима питания растений в ампелоценозе маточника является усиление роли биологизированной системы удобрения пролонгированного действия, а также снижение техногенной нагрузки на почву. Биологизация системы удобрения маточника предполагает также разработку комплекса мероприятий, дополняющих технологическую схему применения удобрений визуальной и химической диагностикой состояния растений и почвы, а также внедрением биоминеральных, биомодифицированных удобрений пролонгированного действия, эффлюентов для основного внесения в почву и некорневых подкормок. Проведенные экспериментальные исследования подтверждают эффективность биологизированной системы оптимизации режима питания растений, стимулирующей силу роста и регенерацию маточных кустов винограда, качество и выход стандартных черенков, повышающей уровень эффективного плодородия почвы, доступность минеральных элементов для растений. Эколого-экономическая целесообразность внедрения биологизированной системы удобрения виноградного маточника обусловлена снижением антропогенной нагрузки на почву, сокращением объемов применяемых удобрений за счет эффекта пролонгации их действия, сохранением средообразующей функции почвы и индуцированием почвенной супрессивности, обогащением почвы гетеротрофной микрофлорой, повышением устойчивости растений к заболеваниям, увеличением у черенков энергии каллусо- и корнеобразования в период стратификации за счет роста показателей качества и, соответственно, возрастающими объемами стандартного посадочного материала.

3 ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЗИРОВАННОЙ СИСТЕМЫ УДОБРЕНИЯ МАТОЧНЫХ НАСАЖДЕНИЙ ВИНОГРАДА

3.1. Последовательность проведения технологических операций

3.1.1. Основное внесение биоминеральных удобрений в виноградном маточнике

Технологическая схема основного внесения удобрений базируется на:

- экологическом мониторинге почв ампелоценоза;

- системном анализе уровня эффективного плодородия почвы виноградного питомника и картировании почвы маточника в соответствии с выявленными показателями функционального состояния;
- визуальной и химической диагностике вегетирующих растений винограда;
- аэробации виноградника

Предпосадочная заправка почв органическими (навоз, норма 80 т/га) и минеральными (до 4 т/га) удобрениями, согласно СОП 00668034-02-2021, обеспечивает благоприятный режим питания молодых маточных растений винограда до начала заготовки черенков. Это обусловлено тем, что с 80 т/га навоза в почву поступает ~ 400 кг/га азота, ~ 200 кг/га пятиоксида фосфора, ~ 600 кг/га окиси калия.

Начиная с 3^х-летнего возраста маточных растений, начинается заготовка черенков, что предполагает системно осуществлять химический анализ состояния почвы в ампелоценозе маточника и внесение удобрений с учетом показателей эффективного плодородия почвы.

Системное внесение основной дозы удобрений предполагает:

- Разработку системы удобрения на основе картограммы обеспеченности участка подвижными соединениями макро-, мезо- и микроэлементов в почве участка (до глубины 60-90 см);
- Выбор наиболее оптимального способа внесения удобрений (локальное глубокое внесение удобрений (ОМУ «Универсал», ОМУ «Виноградное» и др.), поверхностный разбросной метод с последующей заделкой в почву);
- Выбор технологической схемы применения удобрений (прямочная или перегрузочная)

Наиболее эффективным способом внесения основной дозы удобрений в ампелоценозе маточника является *локальное*, обеспечивающее размещение питательных веществ в зоне максимального развития активной корневой системы растений винограда (от 40 см).

Для внесения в почву гранулированных удобрений локальным (ленточным) способом на виноградниках используют машины УОМ и приспособлений ПРВН-17, ПРВМ-14000, ПУХ-2, совмещая глубокое рыхление почвы, внесение удобрений и омолаживание корневой системы растений. Для нарезки борозд с внесением удобрений на всех типах почв (кроме каменистых) применяют культиватор-рыхлитель виноградниковый КРВ-4, оснащенный секциями для междустовой обработки с гидравлической системой автоматического управления и внесения удобрений. Для основного внесения удобрений используют также плуг-рыхлитель для виноградников ПРВМ-3Х, комплектуемый с приспособлением ПРВМ 14.000-01. Агрегатируется система с тракторами Т-54В, Т-70В, ДТ-75, ДТ-75М.

Сроки основного внесения удобрений

Способ внесения, глубина заделки удобрений, см	Сроки внесения удобрений	Доза внесения удобрений (РК), кг д.в./га
Локально в борозды вдоль ряда, на глубине до 20-25 см	Фосфорно-калийные удобрения ввиду их слабой подвижности по профилю почвы не вымываются, и	Доза удобрений корректируется в соответствии с результатами химической диагностики и

	сравнительно долго остаются в доступной форме, поэтому сроки их внесения могут быть растянутыми от осени до ранней весны (до начала вегетации)	вегетативным ростом побегов. Ориентировочные: при сильном росте побегов – 60; среднем – 90; слабом – 120.
--	--	--

3.1.2. Биологизированная система подкормок биоминеральными удобрениями маточных растений винограда

Биологизированная система подкормок виноградного маточника основана на визуальной и химической диагностике потребности растений в дополнительном минеральном питании. Диагностирование состояния растений осуществляется параллельно с апробацией маточника, т.е. обследованием виноградника с целью установления сортового состава и оценки общего состояния растений по урожайности, силе роста, пораженности болезнями и заселенности вредителями.

Подкормки прикорневые и некорневые приурочиваются ко времени наибольшей потребности растения в элементах питания – начало вегетации, периоды наибольшей ростовой активности.

Так, период наивысшей активности ростовых процессов у винограда (побеги, корни) совпадает с максимально высокими значениями весенней среднесуточной температуры воздуха, обильными осадками и, соответственно повышенной влажностью воздуха. В начале периода ростовой активности, весной, проводят корневые подкормки биоминеральными удобрениями пролонгированного действия. В этот период наблюдается интенсивное поступление воды в растения. Активное поступление воды по проводящим тканям на узлах побегов и у почек способствует активации дыхания и ферментов, переводящих органические соединения (крахмал) в растворимые (сахара). В этот период питательные вещества способствуют усилению энергии деления клеток, происходит энергичный рост верхушки и междоузлий эмбрионального побега. Этот период рассматривается как один наиболее критических периодов развития растений винограда, требующий усиления минерального питания, что обуславливает необходимость проведения подкормки. Пролонгированный характер биоминеральных удобрений обеспечивает постепенное высвобождение элементов питания, обеспечивая оптимизацию питательного режима растений в течение вегетационного периода, в том числе для накопления запаса питательных веществ в многолетних частях виноградного куста и побегах, что повышает их зимостойкость.

Весенняя корневая подкормка обуславливает быстрый рост побегов, которые уже к началу цветения отрастают уже более чем на 50 % своей полной длины.

Продолжительность роста побегов – от 2,5 до 3 месяцев и наиболее активный период – май-июнь. В этот период прирост вегетативной массы, построение новых тканей обеспечивает фотосинтетический аппарат – основная рабочая единица растения – лист. В листьях активно происходят процессы транспирации, дыхания, ассимиляции, метаболизма, расходуются питательные вещества, снижается запас углеводов в побегах. Это является обоснованием проведения листовых подкормок в маточнике.

Система применения биоминеральных препаратов в соответствии с этапами вегетационного периода растений винограда

Фазы малого цикла развития растений винограда	Препарат	Расход препарата, л/га
В процессе вегетации: – конец 2-й фазы вегетации – середина 3-й фазы вегетации	Комплекс препаратов, содержащих экстракт водорослей <i>Ascophyllum nodosum</i> и аминокислоты, питательные соли (N, P, K + микроэлементы) для обеспечения потребностей растений в различных элементах и повышения устойчивости на всех стадиях развития (препараты линии «Максифол», «Биорост М» (0,25 %-ный водный раствор), «Суфлер», «Нормат Л», «Биоконцентрат-Z» и др.	1-2

Для некорневых обработок растений: Опрыскиватели прицепные вентиляторные ОПВ с соответствующей шириной захвата и производительностью труда или малообъемные типа ОНС-600.

3.2. Характеристика агрохимикатов, разрешенных к применению в РФ, а также указанных в перечне средств производства для применения в системе органического и биологизированного земледелия

3.2.1. Органоминеральные (биоминеральные) удобрения (ОМУ)

Органоминеральные удобрения (органоминеральные, органоминеральные + микроэлементы и БАВ) для основного внесения в почву, внутрпочвенных и некорневых подкормок растений. Согласно нормативной терминологии, это продукты, в которых декларированные питательные вещества как органического, так и неорганического происхождения получены смешиванием и/или химическим соединением органических удобрений и неорганических удобрений.

Для основного внесения используются гранулированные и жидкие удобрения:

- ОМУ «Виноградное» - гранулированное удобрение для основного внесения в почву и подкормок, абсолютно безопасно для растений, так как минеральные компоненты равномерно распределены в органической грануле, благодаря чему ОМУ постепенно отдает питание в течение одного или двух вегетационных периодов, т.е. является удобрением пролонгированного действия. Растение способно самостоятельно регулировать поступление питательных веществ в необходимых для него концентрациях.
- Жидкие органоминеральные удобрения на основе гуминовых кислот различных марок для внесения в почву и некорневых подкормок растений (гумат калия Суфлер марки ВР 20 и др.)
- Органоминеральные (жидкие) удобрения для некорневых обработок растений «Максифол», «Аминофол» различных маток, содержащие в различных сочетаниях экстракт водорослей *Ascophyllum nodosum*, высокий процент свободных аминокислот, макро- и микроэлементы. Препараты «Биорост М», «Нормат Л» и др.

3.2.2. Биомодифицированные удобрения

Биомодифицированные ОМУ различных видов на органической основе содержат биомодификатор на основе штамма *Bacillus subtilis* Ч-13 (нанесенный на гранулы). Этот штамм обладает рядом полезных свойств, улучшает минеральное

питание растений, снижает пораженность их болезнями, повышает усвоение элементов питания из удобрений и почвы. Биомодификатор «БисолбиФит» стимулирует рост растений, фунгицидную и бактерицидную активность, обладает антистрессовым действием, фиксирует молекулярный азот и мобилизует активность фосфатов, что актуально для маточника.

Органоминеральное удобрение «Универсал» модифицировано микробиологическим препаратом на основе ризосферных бактерий (внешний вид: гранулы темно-серого цвета, диаметр: 1- 5 мм, содержание полезной микрофлоры: *Bacillus Subtilis*– 700 тыс. КОЕ/г, *Bacillus Mucilaginosus* – 300тыс. КОЕ/г, не содержит хлор). Удобрение содержит 40% органического вещества, азот, фосфор, калий, магний и микроэлементы, гуминовые соединения. Удобрение обеспечивает увеличение вегетативной продуктивности культуры и восстановление плодородия почвы (N-P-K+Mg+S+Mэ+Гум.).

3.2.3. Удобрения на органической основе

Удобрения на органической основе (навоз, помет, торф и др.) для основного внесения в почву, для внутрпочвенных и некорневых подкормок, содержащие преимущественно питательные веществ в виде органических соединений, т.е. это продукты, в которых декларированы питательные вещества неорганического происхождения, но которые смешаны с органическими материалами, такими как торф или лигнин.

3.2.4. Эффлюенты

Эффлюенты – шлам, побочная продукция, полученная в результате функционирования биогазовой установки в различных режимах (термофильного и мезофильного) методом анаэробного сбраживания и применяемая в качестве удобрений на различных типах почв. Субстратами, используемыми для переработки, являются: полужидкий навоз КРС, жидкий свиной навоз, жидкий птичий помет и др., т.е. исключительно вещества органического происхождения. Полученные таким образом удобрения содержат гуминовые и фульвокислоты, фитогормоны, пептиды, аминокислоты и др. Важной характеристикой эффлюентов (в сравнении с исходными субстратами) является отсутствие тяжелых металлов, их солей, радионуклидов, живых семян сорных растений, патогенной микрофлоры. Удобрения используются преимущественно для некорневой подкормки растений. Одним из типичным представителей эффлюентов является препарат «Биоконцентрат-Z».

4 ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Применение технологии позволяет:

- Улучшить качество и увеличить выход репродукционных черенков винограда;
- Усилить ферментативные процессы, радиус проводящих тканей в репродукционных черенках, снизить отношение диаметра сердцевины к древесине, увеличить содержание углеводов в черенках;
- Повысить способность маточных растений винограда к усвоению элементов питания;
- Снизить техногенную нагрузку на почву;
- Поддерживать оптимальный уровень экономического плодородия почвы ампелоценоза маточника при регулярном выносе питательных веществ из почвы отчуждаемым однолетним приростом;
- Повысить устойчивость маточных растений винограда к негативному действию абиотических факторов

Использование почвенно-растительной диагностики для оптимизации питания растений винограда в маточнике способствует рациональному применению удобрений, своевременному восстановлению баланса питательных веществ в растениях, поддержанию необходимого уровня эффективного плодородия почв в ампелоценозе.

Пролонгированный характер используемых биоминеральных удобрений позволяет снизить кратность их основного внесения, экономя ресурсы и снижая техногенную нагрузку на почву.

Преимущественное использование биоминеральных удобрений в жидком виде упрощает процесс приготовления рабочих растворов препаратов и позволяет совмещать опрыскивание растений с обработкой виноградника средствами защиты растений.

Комплексные многофункциональные составы органоминеральных удобрений способствуют повышению устойчивости растений к негативным абиотическим факторам среды.

Применяемая биологизированная система удобрения маточных растений винограда обеспечивает увеличение количества побегов на куст на 7,7-13,0 %. Средняя длина побегов возрастает в среднем на 16,8-36,3 % в зависимости от сорта.

5 ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

1. Биоминеральные препараты должны быть зарегистрированы в соответствующем каталоге разрешенных агрохимикатов для применения в РФ, перечне средств производства для применения в системе органического и биологизированного земледелия на основе международных стандартов и изготовлены согласно нормативно-технической документации (ТУ), регламентирующей рецептуру и технологический процесс производства с соблюдением требований, установленных нормативными правовыми актами Российской Федерации, которая содержится в сопроводительных документах и на этикетке упаковки.

2. Удобрения по токсикологическим, ветеринарно-санитарным и гигиеническим показателям должны соответствовать установленным нормам.

3. К применению в ампелоценозе подлежат только удобрения, имеющие маркировку типографским шрифтом, со следующей информацией:

- наименование удобрения;
- наименование страны-изготовителя;
- наименование предприятия-изготовителя, юридический адрес, товарный знак (товарная марка) изготовителя (при наличии);
- назначение (сведения об основных потребительских свойствах);
- способ применения;
- массовая доля питательных веществ (состав);
- правила и условия безопасного хранения, транспортирования, безопасного и эффективного использования, утилизации;
- срок хранения;
- дата изготовления;
- номер партии;
- масса нетто, кг. или величина объема, дм³;
- класс опасности;
- обозначение нормативного документа;
- информация об оценке соответствия (при необходимости);

- штриховой код продукции (при наличии);
 - регистрационный номер тарной этикетки.
4. Все, работающие с удобрениями, должны быть обеспечены спецодеждой и специальными защитными средствами (комбинезон или халат хлопчатобумажные; хлопчатобумажные, резиновые перчатки).
 5. Не допускается использование препарата позднее указанного производителем срока годности и в упаковке, соответствующего предписания.
 6. Непосредственно перед приготовлением рабочего раствора препаратов, выпускаемых промышленностью в жидком виде, содержимое упаковки необходимо тщательно взболтать.
 7. Для внесения рабочего раствора препаратов используют специально предназначенные для обработки виноградника опрыскиватели, характеризующиеся эксплуатационным удобством, вместимостью бака, высокой производительностью.
 8. Применение специальных биоминеральных удобрений в составе баковых смесей с СЗР должно осуществляться в определенные сроки в соответствии с фазами развития растений, указанными в СТО.
 9. К работам, связанным с механизированным внесением удобрений, а также с процессом подготовки удобрительных смесей и питательных растворов допускаются только рабочие не моложе 18 лет, прошедшие инструктаж.

СПИСОК ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

неограниченное пользование

(перечень структурных подразделений и/или Ф.И.О. допущенных к ознакомлению

и/или пользованию документом)

СОГЛАСОВАНО:

Зав. лабораторией управления воспроизводством
в ампелоценозах и экосистемах,
канд. с.-х. наук



Г.Ю. Алейникова

Рук. научного направления «Виноградарство»,
д-р с.-х.н.



В.С. Петров

Ведущий научный сотрудник лаборатории
управления воспроизводством
в ампелоценозах и экосистемах, д-р с.-х.н.



М.И. Панкин

ЛИСТ СОГЛАСОВАНИЙ

Должность, наименование подразделения	ФИО	Запись о наличии или отсутствии замечаний (есть/нет)	Подпись	Дата
Председатель Совета по стандартизации	Ильина И.А.			
Эксперт по стандартизации	Чемисова Л.Э.			
Патентовед- маркетолог, Управление НИР	Мачнева И.А.			

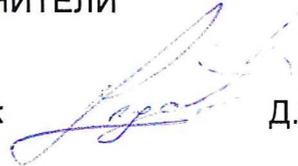
ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ ПРИКАЗОМ № _____ г.

РАЗРАБОТАН ФНЦ «Виноградарство и виноделие»,
лаборатория управления воспроизводством
в ампелоценозах и экосистемах

ИСПОЛНИТЕЛИ

Зав. ФНЦ «Виноградарство и виноделие»,
Старший научный сотрудник, канд. с.-х. наук



Д.Э. Руссо

Старший научный сотрудник
лаборатории управления воспроизводством
в ампелоценозах и экосистемах,
канд. с.-х. наук



А.А. Красильников

ЗАРЕГИСТРИРОВАН за № _____ от _____

Нормативные ссылки и литературные источники, использованные при разработке ТИ

- 1) ГОСТ Р 52681-2006 Виноградарство. Термины и определения
- 2) ГОСТ 20432-83 Удобрения. Термины и определения.
- 3) ГОСТ 33380-2015 «Удобрения органические. Эффлюент. Технические условия»
- 4) ГОСТ EN 13535-2013 «Удобрения и известковые материалы. Классификация».
- 5) ГОСТ 57079-2016 «Классификация биотехнологической продукции».
- 6) ГОСТ 31783-2012. Межгосударственный стандарт. Посадочный материал винограда (саженцы). Технические условия" (введен в действие Приказом Росстандарта от 29.11.2012 N 1738-ст)
- 7) ГОСТ Р 53050-2008. Национальный стандарт РФ. Материал для размножения винограда (черенки, побеги) / Технические условия. М.: Стандартинф., 2009. 8 с.
- 8) «Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов», разрешенных к применению на территории РФ (часть II Агрохимикаты). М.: МСХ РФ. 2022.
- 9) Федеральный закон от 19 июня 1997 г. № 109 «О безопасном обращении с пестицидами и агрохимикатами».
- 10) СП 92.13330.2012 «Склады сухих минеральных удобрений и химических средств защиты растений» (СНиП II-108-78, 01.01.2013 г.).
- 11) СанПиН 1.2.1077-01 «Гигиенические требования к хранению, применению и транспортировке пестицидов и агрохимикатов»
- 12) Малтабар Л.М., Казаченко Д.М. Виноградный питомник (Теория и практика). Краснодар. 2009. 235 с.
- 13) Чеботарь В.К., Завалин А.А., Ариткин А.Г. Применение биомодифицированных минеральных удобрений [монография]. 2014. М.: ВНИИА; Ульяновск: УлГУ, 2014. 142 с.
- 14) Перечень средств производства для применения в системе органического и биологизированного земледелия на основе международных стандартов органического сельского хозяйства (в соответствии с требованиями ГОСТ 33980-2016 «Продукция органического производства. Правила производства, переработки, маркировки и реализации»). 2022.
[https://depagro.tomsk.gov.ru/uploads/ckfinder/279/userfiles/files/perechen-sredstv-proizvodstva-vesna-2018%20\(1\).pdf](https://depagro.tomsk.gov.ru/uploads/ckfinder/279/userfiles/files/perechen-sredstv-proizvodstva-vesna-2018%20(1).pdf)
- 15) Система виноградарства Краснодарского края: методические рекомендации / Российская акад. с.-х. наук, Гос. науч. учреждение Северо-Кавказский зональный науч.-исслед. ин-т садоводства и виноградарства, Департамент сельского хоз-ва и перерабатывающей пром-сти Краснодарского края; [Е. А. Егоров и др.]. - Краснодар : СКЗНИИСиВ, 2007. - 125 с., [15] л. цв. ил. : ил., табл.; 21 см.; ISBN 978-5-98272-035-1 (В пер.).
- 16) Егоров Е.А., Петров В.С., Кузнецов Г.Я. Биологические способы организации земледелия в ампелоценозах.
http://new.kubansad.ru/media/uploads/files/nauchnye_trudy_skzniisiv/tom_pochva/petrov_egorov.pdf.
- 17) Петров В.С., Лукьянов А.А. Формирование экологически безопасных ампелоценозов при нарастании антропогенной нагрузки // Виноделие и виноградарство. 2009. № 5. С.23- 25.
- 18) Радчевский П.П. Инновационные технологии производства посадочного материала винограда: учебно-метод. Пособие. 20105. 88 с.
- 19) Красильников А.А., Руссо Д.Э., Хорошкин А.Б. Интенсификация минерального питания виноградников (методические рекомендации). ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия». Краснодар, 2019. 64 с.

Приложение Е

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
"Северо-Кавказский федеральный научный центр
садоводства, виноградарства, виноделия"
(ФГБНУ СКФНЦСВВ)

УТВЕРЖДАЮ
директор ФГБНУ СКФНЦСВВ

Егоров Е.А.

« 14 » _____ 2022 г.

ТИ 01.61.10.290-179-00668034-2022



ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ по совершенствованию технологии создания базисных маточников из оздоровленного *in vitro* посадочного материала винограда

Дата введения «_15_» сентября 2022 г.

РАЗРАБОТАНО:

ведущий научный сотрудник
ФГБНУ СКФНЦСВВ

М.И. Панкин М.И. Панкин

научный сотрудник
ФГБНУ СКФНЦСВВ

О.Л. Серет О.Л. Серет

научный сотрудник
АЗОСВиВ – филиал
ФГБНУ СКФНЦСВВ

А.А. Лукьянова А.А. Лукьянова

Краснодар 2022

1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая технологическая инструкция распространяется на модификацию этапа выращивания на питательных средах эксплантов при проведении микроклонального размножения в целях получения саженцев винограда из оздоровленного *in vitro* посадочного материала для создания базисных маточников. Предназначена для специализированных виноградарских, фермерских и личных хозяйств, занимающихся питомниководством винограда.

Держателем данного документа является Селекционно-семеноводческий (питомниководческий) центр в сфере плодово-ягодных культур и винограда ФГБНУ СКФНЦСВВ, созданный в рамках соглашения Министерства науки и высшего образования РФ №075-15-2021-536 от 31.05.2021.

Настоящая технологическая инструкция может быть разработана для сторонних организаций только по согласованию с руководством ФГБНУ СКФНЦСВВ.

2 Термины и определения

Микроклональное размножения растений – получение *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному растению (метод вегетативного размножения растений в культуре *in vitro*).

In vitro (с лат. – «в стекле») – выращивание живого материала «в пробирке», на искусственных питательных средах, в асептических условиях.

Базисный маточник – маточник подвойных и привойных сортов винограда, используемых для производства сертифицированного посадочного материала.

Сертифицированный посадочный материал – черенки и саженцы винограда, соответствующие принятым стандартам производства и качества и соответствующие нормативным требованиям сортовой, вирусной и фитосанитарной чистоты.

3 Общие положения создания базисных маточников винограда с использованием *in vitro*

Для получения посадочного материала высших категорий качества используются инновационные подходы, основанные на применении биотехнологических методов, а именно технологии клонального микроразмножения винограда *in vitro*, позволяющие в короткое время провести интенсивное размножение исходного первичного материала, который не имеет в себе инфекционных начал вирусного, бактериального и микоплазменного характера. Технология основана на культивировании тканей, клеток и частей растений винограда в стерильных условиях (*in vitro*) на искусственных питательных средах.

Для производства сертифицированного посадочного материала необходимо создание базисных маточников, свободных от карантинных болезней (грибных, вирусных, бактериальных, микоплазменных).

4 Технология оздоровления посадочного материала винограда методом *in vitro*

Процесс оздоровления растений винограда с помощью метода *in vitro* делится на три этапа:

Этап 1. *Отбор эксплантов и введение их в культуру.* В качестве исходного материала используются зеленые побеги, взятые с вегетирующих кустов винограда

и выращенные в лаборатории из вызревшей лозы, а также почки вызревших и невызревших побегов, из которых вычлняются меристематические ткани. На данном этапе необходимо добиться хорошо растущей стерильной культуры, что осуществляется путем стерилизации растительных тканей 0,5%-м хлорсодержащим раствором (таблетки ОКА-ТАБ, содержащие 50% активного хлора) в течение 5 минут с 3-х кратной промывкой дистиллированной водой.

Этап 2. *Микроразмножение*. Необходимо добиться получения максимального количества мериклонов. Культивирование проводится на питательной среде по прописи Мурасиге-Скуга, модифицированной Медведевой Н.И. и Реброва А.Н. в пробирках. Добавление в питательную среду цитокинина 6-БАП (в первом пассаже – 1,0 мг/л, со второго пассажа – 1,5 мг/л) индуцирует развитие многочисленных пазушных побегов. Культивирования первичных эксплантов в течение 20 – 30 дней в зависимости от генотипов в беспересадочной культуре показали, что повышенная регенерационная активность меристем винограда составила для сорта Цитронный Магарача – 100%, подвоя: Берландиери x Рипариа Кобер 5 ББ – 93,3%, Берландиери x Рупестрис Рюжери 140 – 88,9%.

Этап 3. *Укоренение полученных микропобегов*. Осуществляется на питательной среде Мурасиге-Скуга с уменьшенным содержанием (1/4) макроэлементов, сахарозы (10 г/л) + 0,1 мг/л ИУК. Микрорастения размещаются в культуральную комнату с соответствующими условиями: освещенность 3-4 тыс. люкс, температура 21 – 23 °С и относительная влажность воздуха 65 – 70%.

5 Эффективность

Практическое использование усовершенствованной технологии создания базисных маточников винограда из оздоровленных *in vitro* растений, позволит обеспечить высокий коэффициент размножения в 6,7 раза.

Снижение техногенной и пестицидной нагрузки на окружающую среду. Снижение дополнительных капитальных вложений на ремонт и перезакладку виноградных насаждений в 1,5 раза.

Прирост дохода от реализации в результате увеличение периода продуктивной эксплуатации насаждений в 1,3 раза.

СПИСОК ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

неограниченное пользование

(перечень структурных подразделений и/или Ф.И.О. допущенных к ознакомлению и/или пользованию документом)

Селекционно-семеноводческий (питомниководческий) центр в сфере плодово-ягодных культур и винограда ФГБНУ СКФНЦСВВ

СОГЛАСОВАНО:

Зав. ФНЦ "Виноградарство и виноделие",
канд. с.-х. наук



Д.Э. Руссо

Руководитель научного
направления по виноградарству,
д-р с.-х. наук



В.С. Петров

Зам. директора по НИР,
д-р техн. наук, профессор



И.А. Ильина

Эксперт по стандартизации,
канд. техн. наук



Л.Э. Чемисова

Маркетолог-патентовед,
канд. с.-х. наук



И.А. Мачнева

Приложение Ж

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
"Северо-Кавказский федеральный научный центр
садоводства, виноградарства, виноделия"
(ФГБНУ СКФНЦСВВ)

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ СКФНЦСВВ
Егоров Е.А.
« 15 » 2022 г.

ТИ 01.30.10.131-180-00668034-2022

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ по производству высококачественного посадочного материала с использованием механизма симбиоза растений и микроорганизмов

Дата введения «15» сентября 2022 г.

РАЗРАБОТАНО:

Н. с. лаборатории питомниководства
Ефимова И.Л. 

1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая технологическая инструкция распространяется на выращивание в питомнике посадочного материала яблони. Предназначена для специализированных плодовых, фермерских и личных хозяйств, занимающихся садовым питомниководством.

Держателем данного документа является **ФГБНУ СКФНЦСВВ**.

Настоящая технологическая инструкция может быть разработана для сторонних организаций только по согласованию с руководством **ФГБНУ СКФНЦСВВ**.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕХНОЛОГИИ ВЫРАЩИВАНИЯ

Новым способом управления качеством посадочного материала яблони по критериям устойчивости, эффективности природопользования, ресурсосбережения является инновационная биотехнология – применение биопрепарата на основе симбиотических грибов *Glomus sp.*, индуцирующая изменения ростовых и физиологических процессов у растений в питомнике.

Использование биопрепарата на основе симбиотических грибов *Glomus sp.* увеличивает биологический потенциал растений в питомнике, улучшает их рост и развитие, оказывает наибольшее влияние на формирование адаптационной устойчивости растений к абиотическим стрессам летнего периода в условиях увеличения амплитуды изменчивости метеофакторов (ростом средних и максимальных температур воздуха и увеличением длительности засушливых периодов), а в итоге – увеличивает выход высококачественного посадочного материала яблони.

2.1 ОСНОВНЫЕ ОБЪЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ БИОАКТИВНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ ГРИБОВ *GLOMUS SP.*

Главной целью всех агротехнических мероприятий, производимых в питомнике, является повышение выхода стандартного посадочного материала яблони, т.е. стимуляция у растений ростовых процессов для достижения размеров, соответствующих действующему национальному стандарту РФ – ГОСТ Р 59653-2021. В этой связи управление качеством посадочного материала яблони путем введения в технологию инновации – биопрепарата на основе симбиотических грибов *Glomus sp.*, повышает качество и выход стандартного посадочного материала яблони.

Объекты исследований – слаборослые подвои яблони СК 3 и СК 7, а также саженцы яблони сорта Прикубанское, выращенные на этих подвоях.

СК 3. Очень слаборослый подвой яблони для садов интенсивного типа. Выведен в СКФНЦСВВ в результате направленного скрещивания сорта яблони Боровинка и подвоя М8. Подвой включен в Госреестр селекционных достижений РФ с 2002 г. Весьма перспективен также для фермерского и любительского садоводства.

В маточнике куст слаборослый, корневая система мочковатая, при хорошем окулировании многоярусная, хрупкая. В саду деревья на этом подвое очень слаборослые – на 25-30 % ниже, чем на подвое М 9. Привитые деревья отличаются скороплодностью – плодовая почка образуется уже в питомнике, промышленное плодоношение наступает на 2-3-й год. Деревья высоко урожайные, с отличным качеством плодов. Установка опоры необходима уже с первого года жизни, так как

ранняя нагрузка плодами на фоне хрупкой корневой системы приводит к наклонам и поломкам деревьев, усложняет формирование кроны.

СК 7. Карликовый подвой, перспективный для садов интенсивного типа. Выделен в СКФНЦСВВ. Подвой включен в Госреестр РФ в 2005 г. В маточнике куст средней силы роста, раскидистый, корневая система: мочковатая, при хорошем окучивании многоярусная. В саду деревья на СК 7 по силе роста на 10-15% больше, чем на М 9. Значительно лучше закрепляются в почве: возможно безопорное ведение сада, достаточно установки посадочного кола. Сорто-подвойные комбинации с участием этого подвоя отличаются скороплодностью, обильной регулярной урожайностью при высокой стандартности плодов, хорошо адаптированы к засухе, достаточно зимостойки.

2.2 ХАРАКТЕРИСТИКА БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ ГРИБОВ *GLOMUS SP.*

Биопрепарат произведен на основе симбиотических грибов арбускулярной микоризы *Glomus sp.* (автор штамма – Юрков А.П.). Арбускулярная микориза представляет собой наиболее распространенный растительно-микробный симбиоз, обеспечивающий поступление в растение из почвы комплекса макро- и микроэлементов, особенно фосфора, а также повышающий устойчивость растений к корневым патогенам и усиливающий взаимодействие растений с азотфиксирующими микроорганизмами.

Применение биопрепарата повышает биологический потенциал самих растений на основе использования механизмов симбиотической эффективности грибов арбускулярной микоризы и древесного растения, обеспечивает лучшее развитие корневой системы растений, усиливает их засухоустойчивость и жароустойчивость, повышает эффективность использования минеральных удобрений, повышает урожайность плодоносящих насаждений, а в питомниководстве – качество производимого посадочного материала.

2.3 ТРЕБОВАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ ГРИБОВ *GLOMUS SP.*

Одноразовая обработка корней непосредственно перед посадкой. Перед приготовлением рабочего раствора следует проверить pH воды и обеспечить нейтральную, или же, что лучше - слегка кислую среду (pH 6-7). Рабочий раствор биологически активного препарата готовят непосредственно перед применением. Объемготавливаемых рабочих растворов должен соответствовать предполагаемому объему работ с целью исключения остатков неиспользованных растворов. Срок ожидания отсутствует. На обработанные площади для проведения ручных или механизированных работ можно выходить в день обработки. Поскольку биопрепарат на основе симбиотических грибов арбускулярной микоризы *Glomus sp.* не токсичен, после работы необходимо только вымыть руки и лицо. Методы дезинфекции и детоксикации не применяются.

2.4 ПОРЯДОК ОБРАБОТКИ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ БИОПРЕПАРАТОМ НА ОСНОВЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ ГРИБОВ *GLOMUS SP.*

Биопрепарат на основе симбиотических грибов арбускулярной микоризы *Glomus sp.* (автор штамма – Юрков А.П.) применяется в виде рабочего раствора препарата (болтушки).

Способ применения биопрепарата:

1. Ранней весной в первом поле питомника перед высадкой подвоев яблони в почву их корни обмакивают в емкость с рабочим раствором препарата (болтушкой - разведенным водой биопрепаратом)

2. Оптимальные дозы – 1,0 и 2,0 г/растение. Расход рабочего раствора – для достижения этой концентрации в расчете на обработку 100 подвоев используют емкость с 3-4 л воды, в которой растворено 100 или 200 г инокулята гриба арбускулярной микоризы *Glomus sp.*

3. При обработке необходимо постоянно помешивать препарат, чтобы взвесь оседала на корнях саженцев. С целью лучшего сцепления препарата с корнями, желательно применить прилипатель (КМЦ-20 г или глину-500 г).

4. Для повышения эффективности препарата исключить обсыхание корней подвоев до посадки в почву.

5. После высадки подвоев в первое поле необходимо провести полив всего участка для достижения глубины промокания 5-7см.

6. Условия хранения и транспортировки инокулята грибов арбускулярной микоризы: предпочитаемая температура воздуха +15-25 °С, темное место, предотвращать попадание прямых солнечных лучей, не хранить при отрицательной температуре, не оставлять инокулят вблизи нагревательных приборов, вблизи батарей.

3 ЭФФЕКТИВНОСТЬ

3.1 Технологический эффект

При исследовании влияния биопрепарата на основе симбиотических грибов арбускулярной микоризы *Glomus sp.* на биометрические параметры подвоев и саженцев яблони в плодовом питомнике было отмечено, что его применение активизировало обменные процессы у подвоев и саженцев яблони за счет механизмов симбиотического взаимодействия (АМ-симбиоза) грибов арбускулярной микоризы и растения, что привело к улучшению состояния и усилило ростовую активность растений клоновых подвоев и саженцев яблони.

Стимуляция ростовых процессов проявилась в увеличении биометрических параметров подвоев в первом поле: рост диаметра ствола подвоя на 9-16 %; увеличение высоты подвоев на 11-35 %. Во 2 поле питомника положительное пролонгированное влияние обработок биопрепаратом выразилось в усилении размера саженцев: диаметр штамба увеличился на 6-22 %, высота саженца на 9-12 %, количество боковых ветвей на 61-77 %.

Применение биопрепарата на основе симбиотических грибов *Glomus sp.* в питомнике улучшает физиологические процессы при формировании адаптационной устойчивости растений к абиотическим стрессам летнего периода: усиливает устойчивость подвоев и саженцев яблони к засухе в условиях повышенной температуры воздуха и недостаточного количества осадков. Пролонгированное действие биопрепарата повысило биологический потенциал растений и обеспечило увеличение уровня продуктивности насаждений яблони с микоризованной корневой системой на 23 %.

Предложены наиболее эффективные дозы биопрепарата на основе грибов *Glomus sp.* для усиления роста растений в питомнике: для обработки подвоев яблони СК 3 – 1,0 г/растение; для обработки подвоев яблони СК 7 – 1,0 и 2,0 г/растение.

3.2 Экономический эффект

При применении биопрепарата на основе симбиотических грибов арбускулярной микоризы *Glomus sp.* в плодовом питомнике достигнут следующий экономический эффект:

- увеличение стандартности саженцев яблони на 17 %
- снижение издержек относительно доходной части на 6,7 пунктов
- снижение себестоимости продукции на 8,8 % или 264 руб./ц
- рост рентабельность производства на 11,5 процентных пункта
- снижение техногенного прессинга в питомниководстве за счет использования природоподобных технологий.

4 ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

Препарат безвреден для человека, животных, птиц, насекомых, окружающей среды. Не обладает фитотоксичностью.

Хранить вещество требуется в оригинальной упаковке. Это рекомендуется делать в сухом и хорошо вентилируемом месте. При этом оно должно иметь защиту от прямых солнечных лучей. **Препарат должен находиться вне зоны доступа детей и животных.**

Поскольку биопрепарат на основе симбиотических грибов арбускулярной микоризы *Glomus sp.* не токсичен, после работы необходимо только вымыть руки и лицо. Методы дезинфекции и детоксикации не применяются.

Срок годности составляет 2 года.

СПИСОК ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

неограниченное пользование

(перечень структурных подразделений и/или Ф.И.О. допущенных к ознакомлению

и/или пользованию документом)

СОГЛАСОВАНО:

Зав. ФНЦ "Селекции и питомниководства",
канд. биол. наук



И.И. Супрун

Зам. директора по НИР,
д-р техн. наук, профессор



И.А. Ильина

Эксперт по стандартизации,
канд. техн. наук



Л.Э. Чемисова

Маркетолог-патентовед,
канд. с.-х. наук



И.А. Мачнева

Приложение 3
Паспорт технологии
Биотехнологический способ повышения устойчивости привитых саженцев винограда к биотическим стрессорам
(заявка на изобретение № 2022128897 от 07.11.2022)

Показатель	Характеристика технологии
Назначение технологии	Способ предназначен для оздоровления посадочного материала винограда от системных инфекций, что в свою очередь способствует росту устойчивости к другим биотическим стрессорам как при выращивании высококачественных привитых саженцев в школке, так и в эксплуатируемых виноградниках
Описание технологии	<p>Способ повышения устойчивости привитых саженцев винограда к биотическим стрессорам включает:</p> <ul style="list-style-type: none"> – замачивание черенков подвоя и привоя на 48-72 часа (в зависимости от исходной влажности черенков) в 0,5 %-ном водном растворе культуральной жидкости штамма гриба <i>T. viride</i> F-838 с титром не ниже 1×10^9 КОЕ/мл, в срок до изготовления прививок (соединения подвоя с привоем); – 1-2-кратное опрыскивание после парафинирования прививок, их хранения и стратификации (на воде) на этапе закалки 0,5 %-ным водным раствором культуральной жидкости штамма гриба <i>T. viride</i> F-838 с титром не ниже 1×10^9 КОЕ/мл; – замачивание перед посадкой в школку на 2-3 часа в смеси 1:1 0,5 %-ного водного раствора культуральной жидкости штамма гриба <i>T. viride</i> F-838 с титром не ниже 1×10^9 КОЕ/мл и 0,5 %-ного водного раствора культуральной жидкости штамма гриба <i>T. viride</i> 256 с титром не ниже 1×10^9 КОЕ/мл. <p>Новизна технологии заключается в том, что впервые для повышения устойчивости привитых виноградных саженцев к биотическим стрессорам используются специально подобранные (на основании скрининга на антимикотическую активность в отношении целевых патогенов) штаммы гриба <i>Trichoderma viride</i> Pers.: <i>T. viride</i> F-838; <i>T. viride</i> 256, путем 2-кратного замачивания и опрыскивания для подавления не только наружной, но и системной (сосудистой) инфекции. При этом штамм <i>T. viride</i> F-838 обладает выраженной антагонистической, гиперпаразитной и конкурентной активностью в том числе в отношении грибов рода <i>Fusarium</i> и возбудителя эски <i>Phomopsis viticola</i>, а штамм <i>T. viride</i> 256 наряду с антагонистической активностью обладает и эффективным рострегуляторным действием.</p>
Основные показатели технологии	<p>Технология характеризуется следующими основными показателями:</p> <ul style="list-style-type: none"> – увеличением приживаемости саженцев в школке в стрессовых средовых условиях на 11-14 %; – увеличением выхода саженцев на 21-35 %; – более высокой приживаемостью растений при закладке промышленных виноградников – на 15-18 % по сравнению с традиционной технологией.

	<p>Биологическая эффективность способа в оздоровлении от сосудистого некроза составляет 93,5-96,8 %, что на 35,5 % выше в среднем эффективности традиционной технологии с применением химического препарата.</p>
<p>Сведения об использованных при разработке технологии научно-технических заделах (собственных разработках) Получателя</p>	<p>Основой для выполненных исследований послужили результаты многолетней работы по изучению закономерностей формирования видовой и функциональной структуры микробиотических комплексов ампелоценозов и разработке биотехнологий в защите винограда от вредных организмов:</p> <ul style="list-style-type: none"> – на основе ступенчатого скрининга создана коллекция эффективных грибных и бактериальных штаммов/изолятов с антагонистической, гиперпаразитной и рострегуляторной активностью, среди которых выделены перспективные продуценты биопрепаратов; – разработан способ оптимизации производства привитых саженцев винограда на основе использования штамма гриба арбускулярной микоризы; – оценена биологическая эффективность широкого спектра микроорганизмов при выращивании привитых и корнесобственных саженцев винограда; – разработана методологическая база для использования биотехнологий в программах контроля заболеваний саженцев и плодоносящего винограда. <p>Полученные ранее результаты опубликованы в следующих научных публикациях:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Юрченко Е.Г., Якуба Г.В., Насонов А.И., Савчук Н.В., Астапчук И.Л., Буровинская М.В. АНАЛИЗ СКРИНИНГА АБОРИГЕННЫХ ШТАММОВ-АНТАГОНИСТОВ TRICHODERMA SPP. ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В BIOTEХНОЛОГИЯХ КОНТРОЛЯ НОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЯБЛОНИ И ВИНОГРАДА В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ / Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. 2022. Т. 34. С. 158-165. 2. Лукьянова А.А., Пучков В.Н., Юрченко Е.Г. ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА МИКРООРГАНИЗМОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ВИНОГРАДНЫХ САЖЕНЦЕВ / Научная жизнь. 2019. Т. 14. № 7 (95). С. 1115-1121. 3. Юрченко Е.Г., Кузнецова А.П. НОВЫЕ РОСТОВЫЕ ВЕЩЕСТВА И УДОБРЕНИЯ, БЕЗОПАСНЫЕ И ЭФФЕКТИВНЫЕ ПЕСТИЦИДЫ В ПИТОМНИКОВОДСТВЕ / В книге: Организация технологических процессов производства посадочного материала плодовых культур. Краснодар, 2019. С. 170-173. 4. Насонов А.И., Юрченко Е.Г., Подгорная М.Е., Супрун И.И. ДИАГНОСТИКА ПАТОГЕНОВ И ВРЕДИТЕЛЕЙ В ПИТОМНИКАХ / В книге: Организация технологических процессов производства посадочного материала плодовых культур. Краснодар, 2019. С. 173-178. 5. Юрченко Е.Г., Политова З.С. BIOTEХНОЛОГИЧЕСКАЯ ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВА ПРИВИТЫХ САЖЕНЦЕВ

	<p>ВИНОГРАДА / Садоводство и виноградарство. 2016. № 4. С. 21-32.</p> <p>6. Юрков А.П., Якоби Л.М., Юрченко Е.Г., Грачева Н.П., Политова З.С., Курило П.В., Мороз Н.Б. ОПТИМИЗАЦИЯ ПОЧВЕННО-БИОТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА ВИНОГРАДНЫХ ШКОЛОК НА ОСНОВЕ ОБРАБОТКИ ГРИБАМИ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ / Научные труды Государственного научного учреждения Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского института садоводства и виноградарства Российской академии сельскохозяйственных наук. 2013. Т. 3. С. 116-121.</p>
<p>Сведения об эффективности и конкурентоспособности технологии</p>	<p>Эффективность и конкурентоспособность технологии подтверждается следующими параметрами:</p> <ul style="list-style-type: none"> – возможностью сокращения издержек на защиту в среднем на 20 %, относительно доходной части на 20,5 пункта; – снижением себестоимости производства одного саженца на 32 % или на 24 руб/шт; – оптимизацией роста выручки от продаж на 52,3 %, роста прибыли от продаж – в 2,5 раза; роста рентабельности производства до 126 %. <p>В период выкопки готовых саженцев из школки наблюдается снижение общей численности плесневых грибов, ассоциированных с растениями, при этом отмечается полное отсутствие специфической трахеомикозной инфекции по сравнению с традиционной технологией, где в составе микрофлоры сохраняются патогенные виды возбудители трахеомикозов. При применении предлагаемого способа наряду с высокой фунгицидной активностью проявляется адаптивное регуляторное воздействие в целом на структуру микромицетов, нет резких колебаний численности отдельных групп грибов, появляются виды-антагонисты. Такой механизм влияния предполагает более пролонгированное подавляющее действие на системную инфекцию и снижает риски заражения патогенами при различных стрессах как на стадии производства саженцев в школке, так и в дальнейшем при закладке виноградников.</p>
<p>Сведения о результатах интеллектуальной деятельности, в том числе селекционных достижениях, использованных в технологии</p>	<p>1. <i>База данных по распространению и вредоносности альтернариоза винограда в насаждениях Западного Предкавказья /свидетельство № 2022620636 от 25.03.2022// Юрченко Е.Г., Буровинская М.В.</i> Отмечена восприимчивость к поражению альтернариозом у сортов межвидовых гибридов (евроамериканских) и устойчивость - у сортов европейского происхождения. Выявлены отличительные особенности патогенеза на листьях различных ярусов побегов. Разработана методика выявления некротической листовой пятнистости, и оценки полевой устойчивости сортов винограда. Установлены коэффициенты вредоносности заболевания в зависимости от устойчивости сорта.</p> <p>2. <i>База данных распространения и вредоносности фузариоза генеративных органов винограда в Западном Предкавказье/ свидетельство № 2019621830 от 21.10.2019// Юрченко Е.Г., Савчук Н.В.</i> Выявлены особенности патогенеза фузариоза на различных органах виноградного растения. Определена органотрофическая специализация фузариевых</p>

грибов. Разработана методика выявления фузариозов, усовершенствованы шкалы учетов болезни на различных органах винограда. Выявлены виды и штаммы, которые наиболее часто являются причиной фузариозов винограда в Западном Предкавказье. Отмечена вредоносность данных микопатогенов в зависимости от погодно-климатических условий конкретного года, агротехники и устойчивости сорта.

3. Биотехнологический способ оптимизации производства привитых саженцев винограда на основе применения гриба *GLOMUS INTRARADICES SHENCK & SMITH*, ШТАММ RCAM02146 /Юрченко Е.Г., Юрков А.П., Политова З.С. // Патент на изобретение RU 2672381 С2, 14.11.2018. Заявка № 2017115249 от 28.04.2017.

Руководитель



Егоров Е.А.