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
«15» января 2024 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ В РАМКАХ ВЫПОЛНЕНИЯ НИОКР, СООТВЕТСТВУЮЩЕЙ ПРОГРАММЕ СОЗДАНИЯ И РАЗВИТИЯ СЕЛЕКЦИОННО-ПИТОМНИКОВОДЧЕСКОГО ЦЕНТРА ФГБНУ СКФНЦСВВ НА ЭТАПЕ 3 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

15.01.2024 И.И. Супрун
подпись, дата

Краснодар 2024

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный руководитель НИР, зав. ФНЦ «Селекции и питомниководства», канд. биол. наук	12.01.2024 подпись, дата	И.И. Супрун (разделы 1, 2, 3)
Исполнители: Заместитель директора по науке, д-р техн. наук, проф.	12.01.2024 подпись, дата	И.А. Ильина (разделы 1, 3, заключение)
Науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур, канд. с.-х. наук	12.01.2024 подпись, дата	Т. В. Богданович (раздел 1)
Мл. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур, аспирант	12.01.2024 подпись, дата	Е.А. Чернуцкая (раздел 1)
Зав.сектором бактериологии и вирусологии НЦ «Защиты и биотехнологии растений», канд. с.-х. наук	12.01.2024 подпись, дата	С.В. Виноградова (раздел 3)
Зав. лаб. вирусологии, канд. с.-х. наук	12.01.24 подпись, дата	М.А. Амосова (раздел 3)
Науч. сотр. лаб. виноградарства и виноделия АЗОСВиВ – филиала ФГБНУ СКФНЦСВВ, канд. биол. наук	12.01.24. подпись, дата	И.В. Горбунов (разделы 1, 3)
Ст. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции косточковых культур, канд. с.-х. наук	12.01.2024 подпись, дата	Ю.А. Доля (раздел 1)
Мл. науч. сотр. лаб. питомниководства, аспирант	12.01.2024 подпись, дата	А.И. Дрыгина (разделы 1, 3)
Зав. лаб. сортоизучения и селекции косточковых культур, д-р с.-х. наук, проф.	12.01.2024. подпись, дата	Р.Ш. Заремук (разделы 1, 2)
Зав. лаб. сортоизучения и селекции винограда, канд. биол. наук	12.01.24 подпись, дата	Е.Т. Ильницкая (разделы 1, 2)
Ст. науч. сотр. лаборатории питомниководства, канд. с.-х. наук	12.01.24 подпись, дата	М.В. Карпушина (раздел 3)
Мл. науч. сотр. лаб. защиты и токсикологического мониторинга многолетних агроценозов, аспирант	Киек 12.01.24 подпись, дата	Д.А. Киек (раздел 3)
Мл. науч. сотр. лаб. защиты и токсикологического мониторинга многолетних агроценозов, аспирант	12.01.24 подпись, дата	А.И. Киек (раздел 1)
Науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции косточковых культур, канд. с.-х. наук	12.01.2024 подпись, дата	Т.А. Копнина (раздел 1)

Мл. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции винограда, аспирант	12.01.2024 подпись, дата	В.К. Котляр (разделы 2, 3)
Мл. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции косточковых культур, аспирант	12.01.2024 подпись, дата	А.А. Кочубей (раздел 1)
Зав. лаб. питомниководства, канд. биол. наук	12.01.2024 подпись, дата	А.П. Кузнецова (разделы 1, 3)
Мл. науч. сотр. селекционно-биотехнологической лаборатории	12.01.2024 подпись, дата	Е.В. Лободина (разделы 2, 3)
Директор АЗОСВиВ – филиала ФГБНУ СКФНЦСВВ, канд. с.-х. наук	12.01.24 подпись, дата	А.А. Лукьянов (разделы 1, 3)
Науч. сотр. лаб. виноградарства и виноделия АЗОСВиВ – филиала ФГБНУ СКФНЦСВВ, канд. биол. наук	12.01.24 подпись, дата	А.А. Лукьянова (разделы 1, 3)
Мл. науч. сотр. лаборатории сортоизучения и селекции винограда	12.01.24 подпись, дата	М.В. Макаркина (разделы 1, 2)
Мл. науч. сотр. селекционно-биотехнологической лаборатории, аспирант	12.01.24 подпись, дата	Е.А. Кожевников (раздел 2)
Мл. науч. сотр. лаборатории сортоизучения и селекции винограда, аспирант	12.01.2024 подпись, дата	Т.А. Козина (раздел 2)
Науч. сотр. лаборатории физиологии и биохимии растений	12.01.24 подпись, дата	А.Е. Мишко (раздел 3)
Зав. лаб. биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов, канд. биол. наук	12.01.24 подпись, дата	А.И. Насонов (раздел 1)
Зав. лаб. переработки и хранения плодов и ягод, д-р с.-х. наук, проф.	12.01.24 подпись, дата	Т.Г. Причко (раздел 1)
Мл. науч. сотр. лаб. биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов, канд. с.-х. наук	12.01.24 подпись, дата	Н.В. Савчук (раздел 1)
Мл. науч. сотр. селекционно-биотехнологической лаборатории	12.01.2024 подпись, дата	И.В. Степанов (разделы 2, 3)
Зав. лаб. физиологии и биохимии растений, канд. с.-х. наук	12.01.24 подпись, дата	М.А. Сундырева (раздел 3)
Зав. лаб. селекционно-биотехнологической, канд. биол. наук	12.01.24 подпись, дата	С.В. Токмаков (разделы 2, 3)

Ст. науч. сотр. НЦ «Виноделие», канд. техн. наук	12.01.24 подпись, дата	А.В. Прах (раздел 1)
Зам. директора по общим вопросам, канд. с.-х. наук	12.01.2024 подпись, дата	Д.Э. Руссо (разделы 1, 3)
Зав. лабораторией сортоизучения и селекции садовых культур, д-р с.-х. наук	12.01.2024 подпись, дата	Е.В. Ульяновская (разделы 1, 2)
Мл. науч. сотр. лаборатории вирусологии, аспирант	12.01.2024 подпись, дата	С.В. Федорович (разделы 2, 3)
Зав. научным центром «Защиты и биотехнологии растений», канд. с.-х. наук	12.01.24 подпись, дата	Е.Г. Юрченко (раздел 1)
Ст. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур, канд. с.-х. наук	12.01.24 подпись, дата	В.В. Яковенко (раздел 3)
Ст. науч. сотр. лаб. биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов, канд. биол. наук	12.01.24 подпись, дата	Г.В. Якуба (раздел 1)
Мл. науч. сотр. селекционно-биотехнологической лаборатории	12.01.2024 подпись, дата	Е.А. Аль-Накиб (разделы 2, 3)
Мл. науч. сотр. селекционно-биотехнологической лаборатории	12.01.2024 подпись, дата	А.О. Авакимян (раздел 3)
Ст. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур, канд. с.-х. наук	12.01.24 подпись, дата	Н.В. Можар (раздел 1)
Ст. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур, канд. биол. наук	12.01.24 подпись, дата	В.И. Лапшин (раздел 1)
Мл. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур	12.01.24. подпись, дата	Л.В. Артюхова (раздел 1)
Зав. лаб. защиты и токсикологического мониторинга многолетних агроценозов, канд. биол. наук	12.01.24. подпись, дата	М.Е. Подгорная (раздел 1)
Мл. науч. сотр. лаб. селекции и сортоизучения винограда	12.01.24 подпись, дата	Е.Г. Пята (раздел 1)
Науч. сотр. лаб. питомниководства	12.01.24 подпись, дата	И.Л. Ефимова (разделы 1, 3)
Науч. сотр. лаборатории управления воспроизводством в ампелоценозах и экосистемах, канд. с.-х. наук	12.01.24 подпись, дата	О.Л. Сегет (раздел 3)

Лаборант-исследователь лаборатории управления воспроизводством в ампелоценозах и экосистемах	12.01.2024 подпись, дата	А.К. Антонян (раздел 1)
Ст. науч. сотр. лаб. сортоизучения и селекции садовых культур, канд. с.-х. наук	12.01.2024 подпись, дата	Е.Л. Тыщенко (раздел 1)
Ст. науч. сотр. лаб. экологии почв канд. биол. наук	12.01.2024 подпись, дата	Я.В. Ушакова (раздел 1)
Зав. ФНЦ «Садоводство», канд. с.-х. наук	12.01.2024 подпись, дата	Т.Г. Фоменко (разделы 1, 3)
Зав. НЦ «Виноделие», вед. науч. сотр, д-р техн. наук, доц.	подпись, дата 12.01.2024 г	О.Н. Шелудько (раздел 1)
Нормоконтроль	12.01.2024 подпись, дата	Н.М. Запорожец

РЕФЕРАТ

Отчет 197 с., 72 рис., 25 табл., 129 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 состоит в выявлении закономерностей наследования селекционно-значимых признаков для выделения новых доноров и источников плодовых культур и винограда и создании сортов отечественной селекции нового поколения, а также в разработке эффективных протоколов размножения сортов и подвоев садовых культур и винограда в условиях *in vitro* и *in vivo* с учетом сортовой специфичности, информативных ДНК-маркеров, перспективных для анализа генетического разнообразия генофонда, ДНК-паспортизации сортов.

Задачи исследований:

- выполнить комплексное научное исследование, направленное на поиск, мобилизацию, сохранение и изучение генресурсов, выделение доноров и источников основных селекционно-ценных признаков семечковых, косточковых, культур и винограда, создание новых сортов и подвоев с комплексом хозяйственно ценных признаков: продуктивности, устойчивости

к био- и абиострессорам, соответствующих интенсивным ресурсосберегающим технологиям;

- выполнить молекулярно – генетическую идентификацию генов хозяйственно – ценных признаков, ДНК-паспортизацию генотипов, 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; выделены 3 донора, 8 источников хозяйственно ценных признаков, 6 элитных форм плодовых культур и винограда; создано и передано в государственное сортоиспытание 2 новых сорта: сорт яблони Эльф и сорт винограда Вагра (раздел 1).

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). Подана заявка на изобретение «Способ оценки генетической стабильности растений микроклонально размножаемых растений земляники». Разработана методика генотипирования сортов и идентификации генов хозяйственно-ценных признаков яблони на основе использования восьми микросателлитных ДНК-маркеров, оформленная в виде Стандарта организации (СТО 00668034-168-2023). Усовершенствованы методы идентификации вирусов и фитоплазм: «Методика идентификации вирусов яблони методом ПЦР», оформленная в

виде Стандарта организации (СТО 00668034-166-2023); «Методика идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 3 (Grapevine leafroll-associated virus 3) с помощью ПЦР в реальном времени», оформленная в виде Стандарта организации (СТО 0668034-167-2023).

Установлены оптимальные экспериментальные параметры микроклонального размножения садовых культур и винограда по этапам от введения в культуру *in vitro* до адаптации *ex vitro* полученных микрорастений (раздел 3). Подана заявка на изобретение «Способ повышения адаптивной способности микрорастений земляники садовой (Fragaria L.) к условиям ex vitro».

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

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 in vitro;
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 (in vitro = в стекле (лат.)
шт.	штук;
г	грамм;
кг	килограмм;
ц/га	центнеров с гектара;
т/га	тонн с гектара;
ГСИ	государственное сортоиспытание;
ГСУ	государственный сортоучасток;
ППК	привойно – подвойная комбинация;
MS	питательная среда по прописи Мурасиге-Скуга;
QL	питательная среда Кворина-Лепуавра;

DKW	питательная среда Driver and Kunjuki;
WPM	питательная среда Woody Plant Medium
6-БАП	6-бензиламинопурин
ИМК	индолилмасляная кислота
B1	тиамин
B6	пиридоксин
PP	никотиновая кислота
мг/л	миллиграмм/литр

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследований. Проблема ускоренного размножения ценных генотипов растений, их длительного сохранения в коллекциях *in vitro*, получения растений, свободных от вирусной инфекции, а также надежной идентификации генотипов является важной научной задачей, решение которой актуально для успешного сохранения и эффективного использования генетических ресурсов культурных растений.

Использование биотехнологических методов в питомниководстве позволяет получить здоровый, свободный от вредоносных вирусов посадочный материал. Однако эффективные протоколы микроклонального размножения плодовых культур и винограда с учетом сортовой специфичности и эффективных методических подходов к идентификации вирусных и фитоплазменных патогенов отсутствуют. В связи с этим высокую степень актуальности имеет направление усовершенствования методической базы в получение посадочного материала садовых культур и винограда, свободных от вирусов.

Необходимым звеном в улучшении фитосанитарного состояния отраслей садоводства и виноградарства является контроль за распространением вирусных и фитоплазменных инфекций. В связи с этим совершенствование методической базы по идентификации вирусных и фитоплазменных инфекций и выполнение мониторинга их распространения обладает высоким уровнем актуальности.

Кроме того, актуальность исследований обусловлена необходимостью перехода промышленного производства плодовой продукции и винограда к стратегии адаптивной интенсификации или адаптивного садоводства и виноградарства. В связи с этим создание и выделение сортов плодовых культур и винограда с заданным комплексом положительных хозяйственно-ценных признаков является актуальным.

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

Наиболее эффективное решение основных направлений и приоритетных задач отечественной и зарубежной селекции плодовых растений базируется на значительном биологическом разнообразии исходного материала. Селекционное использование наиболее ценных видовых и межвидовых форм плодовых растений и винограда остается важнейшим биологическим ресурсом для создания сортов с повышенными показателями адаптивности и устойчивости к абиотическим стрессорам (весенним заморозкам, морозам, засухе, недостаточной или излишней влагообеспеченности, неустойчивому режиму увлажнения, особенно в течении периода вегетации), устойчивости и иммунитета к основным и новым грибным патогенам, проявляющимся в последнее время все более активнее и агрессивнее по отношению к растению, продуктивности, улучшенных показателей качества и характеристик биохимического состава плодов и ягод; повышения экологической устойчивости новых сортов и перспективных гибридов на основе широкого использования генофонда местных сортов, а также ценных дикорастущих форм и видов.

Для научных направлений, связанных с комплексным изучением генетических ресурсов, изучением генетических взаимосвязей в коллекциях генофонда, сохранением генофонда, созданием новых форм растений, требуется широкое использование современных генетических методов исследований, примененние новых, эффективных мультилокусных ДНК маркеров, которые позволяют получать новые научные данные об уровне геномного полиморфизма на уровнях вид/род, изучать закономерности

возникновения сомаклональной изменчивости при культивировании растений in vitro.

Новые и усовершенствованные методы размножения растений в культуре тканей послужат основой как для повышения эффективности сохранения и мобилизации генетических ресурсов, так и для решения задач селекции и отрасли питомниководства плодовых культур и винограда. Эффективные методические подходы к идентификации вирусных фитопатогенов и фитоплазм также послужат основой для решения как практических задач питомниководства, так и для выполнения фундаментальных исследований, связанных с изучением путей распространения и динамики изменения частоты встречаемости вирусов и фитоплазм в популяциях растений.

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 состоит в выявлении закономерностей наследования селекционно-значимых признаков для выделения новых доноров и источников плодовых культур и винограда; создании 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 разработке эффективных протоколов размножения сортов и подвоев садовых культур и винограда в условиях *in vitro* и *in vivo* 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*.

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 абиострессорам, 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, является важным аспектом производственного потенциала и продовольственной безопасности страны. С этой целью необходима активная мобилизация и ускоренное изучение имеющихся генетических ресурсов, выделение и создание новых доноров и генетических источников целевых хозяйственно-ценных признаков. Также, немаловажное значение на этом этапе имеет 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* (*Malus* × *domestica* Borkh.) – одна из ведущих плодовых культур в мире. Это наиболее выращиваемая древесная культура умеренного пояса и широко выращиваемая во всей умеренной зоне, а в последнее время она распространена и в субтропических и тропических зонах. Широкое распространение этой важнейшей семечковой культуры и

популярность ее у потребителей обусловлены значительным сортовым варьированием яблони по форме, размеру, окраске, вкусовым достоинствам, возможностью круглогодичного использования плодов, хорошей их транспортабельностью, лежкостью, особенно зимних и позднезимних сортов, а также высокими показателями скороплодности, продуктивности, рентабельности и экономической эффективности.

Виды *Malus* обладают большим разнообразием признаков: высокой устойчивостью к климатическим стрессорам среды и к заболеваниям, различная окраска плодов, окраска мякоти (от темно-малиновой до белоснежной), форма кроны (от строго пирамидальной до плакучей), окраска цветков (от огненно-красного до снежно-белого), окраска и форма листьев и др. Селекционное использование наиболее ценных видовых и межвидовых форм плодовых растений, в том числе яблони, остается важнейшим биологическим ресурсом в настоящее время для создания сортов с повышенными показателями адаптивности и устойчивости к абиотическим стрессорам (весенним заморозкам, морозам, засухе, недостаточной или излишней влагообеспеченности, неустойчивому режиму увлажнения, особенно в течении периода вегетации), устойчивости и иммунитета к основным и новым грибным патогенам, проявляющимся в последнее время все более активнее и агрессивнее по отношению к растению, продуктивности, улучшенных показателей качества и характеристик биохимического состава плодов; повышения экологической устойчивости новых сортов и перспективных гибридов на основе широкого использования генофонда местных сортов, а также ценных дикорастущих форм и видов [4-8].

Парша – наиболее вредоносное заболевание яблони на всей территории возделывания, в том числе и на юге России. Возбудитель данного заболевания – гриб *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter). Применение химических средств защиты в садах против этой болезни приводит к загрязнению окружающей среды, уничтожению полезной энтомофауны, в ряде случаев к ослаблению защитных свойств самого растения, и зачастую небезопасно для здоровья

человека [9-13]. Мировое сельское хозяйство получает до 30 % прибыли от общей стоимости произведенной продукции за счет использования устойчивых к грибным патогенам сортов [2]. Поэтому, одно из приоритетных направлений в селекции яблони – создание и выделение иммунных и высокоустойчивых к парше сортов.

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

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

Решение задач мобилизации, сохранения и ускоренного изучения на основе комплекса современных и классических методов имеющихся генетических ресурсов, сосредоточенных в ФГБНУ СКФНЦСВВ, выделения и создания новых генетических источников целевых хозяйственных и адаптивно-значимых признаков необходимо для селекционного совершенствования и оптимизации регионального сортимента плодовых

культур, в том числе за счет создания высококачественных сортов отечественной селекции.

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

Особой популярностью в южных районах пользуется айва. Помимо положительных показателей (раннее вступление в плодоношение, пищевая ценность плодов) она имеет и существенные недостатки, ограничивающие ареал этой ценной культуры. Наиболее значительные из них – недостаточная пластичность и адаптивность большинства промышленных сортов, определившие основные районы ее промышленного возделывания на Северном Кавказе – Краснодарский край, Дагестан, Кабардино-Балкария. Но даже в этих районах периодически наблюдаются неблагоприятные отрицательные температурные факторы, влияющие на отдельные компоненты устойчивости в зимне-весенний период. В отдельные годы потери урожая у сортов айвы достигают значительных размеров.

Селекционными учреждениями России создано достаточное количество новых сортов груши и айвы. Из Госреестра исключены старые сорта,

произошло обновление районированного сортимента за счет сортов отечественной селекции. Новые сорта обладают многими достоинствами, но не получили пока достаточно широкого распространения в производстве. Промышленные насаждения айвы почти полностью отсутствуют.

В связи с этим стоит вопрос улучшения сортимента груши и айвы на основе поиска новых сортов и источников комплексной устойчивости к абиотическим и биотическим стрессам с высокой продуктивностью и качеством плодов.

Косточковые культуры по современной систематике включены в семейство Розоцветные (*Rosaceae*), подсемейство Сливовые (*Prunoideae*), род *Cerasus Mill.* К основным косточковым плодовым культурам относятся: вишня, черешня, слива, алыча, абрикос, персик и др. Все косточковые кроме близкого систематического родства объединяют общие биологические особенности, биолого-морфологические и хозяйственно-ценные признаки.

Плоды косточковых культур выращиваются во всем мире и на их долю приходится площадь около 5,07 млн. га. Ежегодно производится около 35,24 млн. т. ценных плодов этих культур.

В России под косточковыми культурами на сегодня занято 81,5 тыс. га. Больше всего выращивается плодов вишни – 240,4 тыс. га, сливы и алычи – 164,4 тыс. га. Основным производителем плодов косточковых являются Краснодарский край, республики Северного Кавказа.

В Краснодарском крае заложено около 42,7 тыс. га плодовых насаждений, из них 9,3 тыс. га или 18,9 % приходится на косточковые культуры. Анализ динамики площадей косточковых за последние 5 лет свидетельствует о тенденции их сокращения.

В Кабардино-Балкарии заложено 1,8 тыс. га, в Дагестане – 1,3 тыс. га, Крыму – 0,7 тыс. га и Ингушетии – 0,4 тыс. га.

В насаждениях косточковых культур в регионе превалируют слива домашняя (33%) и черешня (27%), значительно увеличиваются площади персика и нектарина (23%), сократились площади сливы русской и вишни.

На сегодняшний в Краснодарском крае активно реализуется политика импортозамещения, в том числе в отрасли садоводства. Очевидно, что назрела необходимость увеличения доли косточковых культур в структуре плодовых насаждений края до оптимальных 25-30 %, с учетом их востребованности на рынке, соответственно и увеличение посадочного материала.

Косточковые отличаются большим биопотенциалом, реализация которого тесно сопряжена с погодно-климатическими стрессорами, снижающими урожай. На снижение продуктивности косточковых в последние годы оказывает влияние – резкие перепады температур в зимний период, недостаток низких температур в период покоя, весенние заморозки, длительная засуха в период закладки цветковых почек.

В связи с обозначенными проблемами, ключевым аспектом обеспечения промышленного производства высокоценными косточковыми плодами, является создание и внедрение новых устойчивых к изменяющимся абиотическим факторам среды сортов, способных максимально реализовать биопотенциал продуктивности в условиях участившихся климатических стрессоров.

Одной из главных проблем в селекции косточковых растений – является необходимость совместить комплекс ценных признаков, прежде всего устойчивость к стрессовым факторам. Исходя из этого, приоритетными направлениями в селекции косточковых в течении последних лет неизменными остаются устойчивость к абиотическим стрессорам, в т.ч. к низким температурам в период органического покоя, к весенним заморозкам, длительной засухе; адаптивность к биотическим факторам, особенно к наиболее вредоносным для вишни, черешни – коккомикозу, сливы – шарке сливы); стабильная и высокая продуктивность, товарное качество плодов и технологичность (скороплодность, слаборослость и др.).

Наиболее эффективное решение селекционных задач возможно за счёт изучения и использования всего генетического материала находящего в генколлекциях, вовлечение в селекцию лучших генотипов, т.е. родительских

форм, обладающих уникальными признаками, позволяющими создать лучшие сорта косточковых культур.

Решение обозначенных селекционных проблем позволит создать сорта нового поколения косточковых культур, повысить биологический потенциал самих растений и заложить новые интенсивные насаждения в южном регионе.

Виноград. В Краснодарском крае сортимент винограда, в настоящее время, представлен техническими и столовыми сортами, которые, к сожалению, недостаточно соответствуют актуальным требованиям, предъявляемым производством, а именно: устойчивость к стресс-факторам окружающей среды, крупноягодность и бессемянность у столовых сортов, стабильно высокое качество виноматериалов, получаемых из технических сортов. В виноделии для производства качественного продукта традиционно возделывают технические сорта и клоны европейских сортов винограда (Каберне Совиньон, Пино нуар, Шардоне, Рислинг и др.), которые недостаточно адаптированы к местным условиям выращивания, в следствие чего, зачастую, проявляют себя малопродуктивно. В связи с этим, исследования, направленные на выведение новых сортов, обладающих высокой экологической пластичностью к местности возделывания, а именно устойчивых к абиотическим и биотическим факторам, обладающих повышенной урожайностью и высоким качеством, являются актуальными.

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 следствии этого 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 приемы, включая элементы питания растений, устойчивость к абиотическим и биотическим стрессовым факторам среды, а также обладающих улучшенными потребительскими

характеристиками плодов и получаемой из них продукции. Все это обусловливает актуальность поставленных задач:

– изучить фенотипическое и генотипическое разнообразие сортов, подвоев и гибридных форм садовых культур и винограда;

– 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»; подвои – груша кавказская, айва ВА-29, а также корнесобственные сеянцы и привитые в крону сорта и формы; схема посадки: 5×2; 4×1; кв. 26, 6, 17 (без орошения).

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

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

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

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

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

формы представлены корнесобственными и привитыми кустами, отборные формы – корнесобственные сеянцы.

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

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

Природные условия зоны благоприятны для развития плодоводства. Отрицательными факторами для произрастания плодовых культур в этой зоне являются возможные морозы до минус 37 °С, резкие колебания температуры в зимние и ранневесенние месяцы, весенние заморозки, ранние осенние морозы, засуха, неустойчивый режим естественного увлажнения, неравномерно распределение осадков в течение вегетации. Характерны сильные годовые колебания температуры. Амплитуда колебания температуры в течение года возможна в пределах от минус 37 °С до + 40 °С. Среднегодовое количество осадков от 630 до 760 мм. Средняя годовая температура составляет 10,4 – 10,8 °С. Зима с частыми, порой продолжительными оттепелями. Снеговой покров неустойчив. Лето жаркое, сухое. Среднегодовая сумма активных температур воздуха выше + 10 °С составляет 3300–3600 °С, длительность безморозного периода 185–195 дней.

В селекционной работе использованы усовершенствованный метод полиплоидии, а также классические методы: отдаленная межвидовая и географически отдаленная гибридизация, повторная гибридизация, инбридинг, мутагенез. Применяются методы ускорения и интенсификации

селекционного процесса: отбор гибридных сеянцев в школке по морфологическим признакам, отбор на искусственном инфекционном фоне на иммунитет (ген *Rvi6)* к парше (совместно с ВНИИСПК), совмещение во времени и пространстве первичного и конкурсного, конкурсного и государственного сортоиспытания.

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

- Программа Северо-Кавказского центра по селекции плодовых, ягодных, цветочно-декоративных культур и винограда на период до 2030 года [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

По данным многолетних исследований выделены 2 источника ценных хозяйственных признаков яблони – элитные формы 12/2-21-76 и 12/1-20-46.

Элитная форма 12/2-21-76 (из семьи Айдаред х Балсгард 0247Е) выделена как источник крупноплодности плодов (рис.1). Получена в СКФНЦСВВ совместно с ВНИИСПК на основе усовершенствованного метода полиплоидии. Триплоид (2n=3x).

Дерево среднерослое, крона широко-округлая, густо облиственная. Тип плодоношения смешанный. Элитная форма имеет ген иммунитета к парше *Rvi6,* высокую полевую устойчивость к монилиозу, устойчива к засухе, скороплодна (вступает в плодоношение на 3-й год после посадки), достаточно быстро наращивает урожайность в молодом возрасте, обладает высокой продуктивностью (до 30,66–53,32 т/га на подвое М9 при схеме 5×1,5). Срок созревания осенний.

Рисунок 1 – Источник крупноплодности плодов – элитная форма 12/2-21-76

Плоды крупные (средняя масса 207,7 г, диаметр плода 78,5 мм) (рис. 2), одномерные, округлые, эффектные, с ярко-красной, интенсивной, покровной окраской по всему или по большей части плода. Мякоть плода кремоватой окраски, мелкозернистая, сочная, кисло-сладкого десертного вкуса (4,6 балла), со слабым ароматом. Кожица плотная. Съемная зрелость плодов наступает в конце августа – начале первой декады сентября. В холодильнике плоды сохраняются в течении 2–2,5 месяцев. Транспортабельность плодов хорошая.

Основные достоинства: иммунитет к парше, морозо- и засухоустойчивость, скороплодность, крупноплодность, высокая продуктивность и хорошие вкусовые качества плодов. Недостатки сорта: срок хранения свежих плодов до 2–2,5 месяцев.

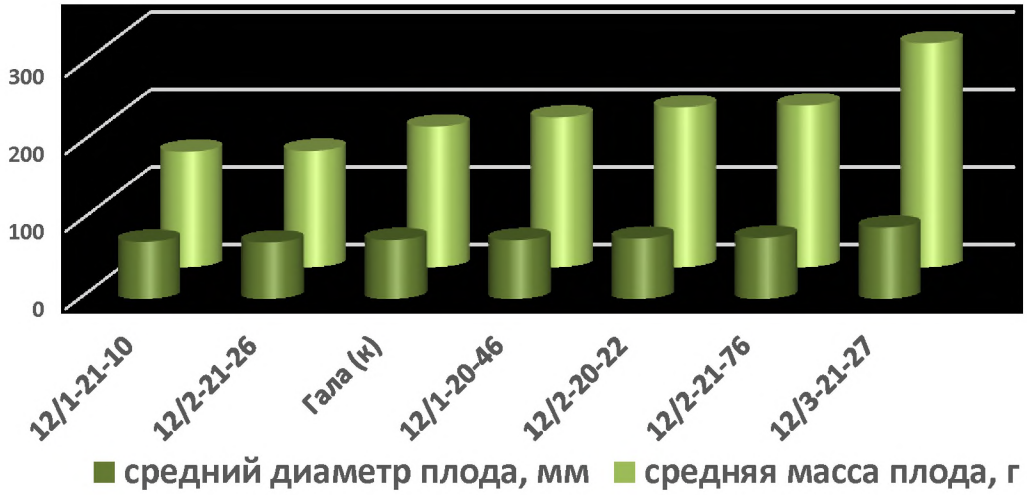


Рисунок 2 – Средняя масса и диаметр плода элитных форм яблони селекции СКФНЦСВВ совместно с ВНИИСПК, среднее за 2021–2023 гг.

Элитная форма 12/1-20-46 (из семьи Джонатан х Джайент Спай) выделена как источник темно-красной интенсивной окраски плодов (рис. 3). Получена в СКФНЦСВВ совместно с ВНИИСПК.

Рисунок 3 – Источник темно-красной интенсивной окраски плодов – элитная форма 12/1-20-46

Дерево сдержанного роста, крона округлая, густо облиственная. Тип плодоношения смешанный. Элитная форма имеет высокую полевую устойчивость к парше, монилиозу и филлостиктозу, устойчива к засухе, скороплодна (вступает в плодоношение на 2-3-й год после посадки), имеет урожайность до 23,99–33,32 т/га на подвое М9 при схеме 5×1,5. Срок созревания позднеосенний.

Плоды выше среднего размера и крупные (средняя масса 192,3 г, диаметр плода 75,5 мм), одномерные, округлые, эффектные, с темно-красной, интенсивной, покровной окраской по всему или по большей части плода. Мякоть плода кремоватой окраски, мелкозернистая, очень сочная, кисловато-сладкого десертного вкуса с преобладанием сладости (дегустационная оценка свежих плодов 4,7-4,8 балла), с ярким насыщенным ароматом. Кожица средней плотности. Съемная зрелость плодов наступает в первой декаде сентября. В холодильнике плоды сохраняются в течении 2–3-х месяцев. Транспортабельность плодов хорошая.

Основные достоинства: высокая устойчивость к грибным патогенам, засухоустойчивость, скороплодность, интенсивная темно-красная окраска и высокие вкусовые качества плодов. Недостатки сорта: срок хранения свежих плодов до 2–3-х месяцев.

В последние годы в регионе Северного Кавказа отмечено значительное усиление частоты и силы негативного воздействия на плодовое растение яблони абиотических стресс-факторов среды (засуха, высокие температуры воздуха и почвы, неустойчивый режим увлажнения, повреждающие факторы зимнего периода, весенние заморозки), что позволяет проводить отбор по устойчивости и адаптивности изучаемых сортов и форм.

В то же время, необходимо отметить, что агроклиматические условия Северо-Кавказского региона садоводства 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 процессе изучения генетического потенциала селекционных форм яблони в отчетном году выделена элитная форма селекции СКФНЦСВВ совместно с ВНИИСПК, превышающая стандартные сорта по комплексу хозяйственно ценных и адаптивно значимых признаков и свойств: 12/2-20-22 (рис. 4).

Элитная форма 12/2-20-22 (Корей × Прима) раннезимнего срока созревания. Дерево сдержанного роста, крона пирамидальная. Тип плодоношения смешанный.

Рисунок 4 – Элитная форма яблони 12/2-20-22 (Корей × Прима)

Вступает в плодоношение на 2–3-й год после посадки (на М9), быстро наращивает урожайность в молодом возрасте. Цветение в среднепоздние сроки, обильное. Урожайность высокая – до 37,3-50,6 т/га (на подвое М9 при схеме посадки 5×1,5). Диплоид (2n=2x).

Плоды выше среднего размера и крупные (средняя масса плода 205,3 г, диаметр – 77,6 мм), округло-конической удлиненной формы. Мякоть кремоватая, мелкозернистая, очень сочная, десертного вкуса (4,5–4,7 балла), с нежным ароматом. Съемная зрелость плодов наступает в начале второй декады сентября. В холодильнике плоды сохраняются до февраля месяца. Транспортабельность плодов хорошая.

Элитная форма имеет ген иммунитета к парше *Rvi6*, высокую полевую устойчивость к монилиозу и 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 осенний иммунный к парше сорт яблони Эльф совместной селекции СКФНЦСВВ и ВНИИСПК.

Сорт яблони Эльф осеннего срока созревания (рис. 5–6, прил. 1). Сорт получен от скрещивания сортов Голден Делишес тетраплоидный х [Вольф Ривер х (Вольф Ривер х M. atrosanguinea 804/240-57)] с использованием усовершенствованного метода полиплоидии. Диплоид (2n=2x=34).

Авторы сорта: Ульяновская Е.В., Седов Е.Н., Дутова Л.И., Жданов В.В., Серова З.М., Чернуцкая Е.А., Богданович Т.В., Причко Т.Г.

Рисунок 5 – Новый иммунный к парше сорт яблони Эльф

Дерево среднерослое, крона пирамидальная, средней густоты, хорошо облиственная. Тип плодовых образований – смешанный. Цветение обильное (рис. 7), в средние сроки.

Рисунок 6 – Морфологические особенности сорта яблони Эльф (дерево, органы плодоношения, лист, плоды)

Сорт Эльф 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 (поражение 0 баллов), поражение монилиозом в годы эпифитотий составляет 1-2 балла, филлостиктозом – 1-2 балла. Сорт имеет повышенную засухо- и морозоустойчивость в условиях Краснодарского края.

Рисунок 7 – Цветение сорта яблони Эльф

Сорт интенсивного типа, скороплоден, на подвое М9 вступает в плодоношение на 2-й год после посадки, быстро наращивает урожайность в молодом возрасте. Средняя урожайность нового сорта на подвое М9 при схеме 5х1,5 составляет – 25,4 т/га; максимальная – 37,8 т/га. Пригоден к интенсивным технологиям возделывания.

Плоды эффектные, выше среднего размера и крупные (средняя масса плода 190 г, максимальная – 279 г) (табл. 1, 2), округло-продолговатой формы,

с малиновым румянцем по всему или по большей части плода (оценка внешнего вида плодов 4,7 балла).

Мякоть кремоватая, мелкозернистая, сочная, десертного вкуса с нежным ароматом (дегустационная оценка вкуса 4,7–4,8 балла). Съемная зрелость плодов наступает в конце августа – первой декаде сентября. Плоды в хранении – до 2 месяцев.

Таблица 1 – Группировка сортов и элитных форм яблони по средней массе плода, среднее за 2021–2023 гг.

Сорт	Градации по размеру плодов	Средняя масса плода, г
Джерсимак, Красный янтарь, Пинк Леди, Пинова, Рассвет, Редфри, Фея, Эрли Мак	средние	111–150
Эльф, 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 2 – Характеристика основных показателей плодов нового сорта яблони Эльф, среднее за 2021–2023 гг.

Показатели	Единица измерения	Рекомендуемый сорт	Стандартный сорт
		Эльф	Гала
Масса плода: - средняя	г	190	172
- максимальная	г	279	190
Привлекательность внешнего вида	балл	4,7-4,8	4,7
Сочность и консистентность мякоти плода	-	сочная, мелкозернистая	сочная, мелкозернистая
Содержание в плодах: - сухого вещества	%	14,5	13,8
- сахара	%	10,2	9,7
- кислоты	%	0,22	0,39
- витамина Р	мг/100 г	141,0	78,2
- витамина С	мг/100 г	3,1	5,6
Дегустационная оценка свежих плодов	балл	4,7-4,8	4,7
Назначение сорта	-	универсальный	универсальный
Для каких видов переработки пригоден сорт	-	пюре, цукаты	пюре, цукаты

Транспортабельность плодов	-	хорошая	хорошая

Химический состав плодов: сухих веществ – 14,5 %, сахаров – 10,2 %, тируемых кислот – 0,22 %, сахаро-кислотный индекс – 46,1, витамина С – 3,1 мг/100 г, витамина Р – 141,0 мг/100 г.

Рекомендуемые расстояния при посадке 5(4,5) × 1,5 м на слаборослом подвое М9.

Основные достоинства нового сорта: совмещение иммунитета к парше, повышенной устойчивости к мучнистой росе, морозо- и засухоустойчивость в условиях Краснодарского края, скороплодность, высокое качество плодов (в том числе: привлекательный внешний вид и высокие вкусовые достоинства плодов, повышенное содержание сухих веществ, сахаров, витамина Р).

Новый отечественный сорт яблони Эльф 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 (25,4-37,8 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 Эльф перспективен для создания насаждений интенсивного типа в почвенно-климатических условиях

Северо-Кавказского региона. Культивирование нового осеннего сорта яблони Эльф, обладающего иммунитетом к парше позволит:

– снизить пестицидную нагрузку на окружающую среду;

– получать продукцию с повышенными показателями экологической чистоты и качества.

Груша, Айва

В отчетном году проводили комплексную оценку адаптивного и продуктивного потенциала груши и айвы, анализировали особенности роста и развития, определяли влияние среды на растения с последующим индивидуальным отбором на комплекс хозяйственно ценных и адаптивно-значимых признаков для конкретных агроэкологических условий.

Из-за частых дождей, недостатка тепла, отсутствия лета пчел, плохого созревания пыльцы в этом году, завязывание плодов у некоторых сортов груши отмечено слабое. С хорошей завязываемостью плодов за отчетный период выделены сорта: Краснодарская летняя Люберская, Малышка, элитная форма 17-3-9 селекции СКФНЦСВВ и интродуцированные сорта: Бере Клержо, Киффер и Кюре, которые были с урожаем от 8 кг/дер. и выше, (табл. 3).

Таблица 3 – Сроки, сила цветения и урожай сортов груши, 2023 год

Сорт	цветение			урожай, кг/дер
	начало	конец	балл	
Аббат Фетель	9.04	16.04	5,0	3,0
Бере Клержо	8.04	16.04	5,0	10,0
Вега	11.04	17.04	5,0	4,0
Вильямс	12.04	20.04	5,0	3,0
Гера	9.04	16.04	4,5	3,0
Дево	8.04	15.04	5,0	2,5
Зимняя млиевская	12.04	18.04	4,0	3,5
Киффер	14.04	20.04	4,0	10,0
Краснодарская летняя	12.04	18.04	5,0	15,5
Кюре	9.04	16.04	5,0	11,5
Люберская	13.04	19.04	5,0	8,0
Любимица Клаппа	14.04	22.04	4,0	3,0
Малышка	14.04	20.04	4,5	10,5
Молдавская ранняя	11.04	16.04	4,0	4,5
В-18-52	12.04	20..04	5,0	6,0
17-3-9	13.04	18.04	5,0	8,0

Качество плодов, и в особенности груши, находится в прямой зависимости от почвенных, климатических и других особенностей выращивания. Анализ биохимических показателей качества плодов груши проведен в лаборатории хранения и переработки СКФНЦСВВ у сортов в период полной зрелости, когда химический состав, формирующий вкус плодов, соответствует показателям данного сорта.

Сравнительная оценка плодов по биохимическому составу показала, что в плодах представленных сортов груши содержится от 10,2 до 15,0 % сухих веществ; 6,3 – 9,0 % сахаров; 0,21 –0,56 % органических кислот; от 5,5 до 11,0 мг/100 г витамина С и от 13,3 до 55,3 мг/100 г витамина Р. Содержание аскорбиновой кислоты в плодах по годам значительно меняется, однако можно выделить сорта с высоким содержанием витамина С в отчетном году, это сорта: Гера, Фламенко и элитная форма 17-3-9 (табл. 4).

Таблица 4 - Биохимические показатели качества плодов груши, 2023 г

Помологический сорт	масса, г	Биохимические показатели качества				
		сухие вещества, %	сумма сахаров, %	общая кислотность, %	витамины, мг/100г	
					аскорбиновая кислота	витамин Р
Ассоль	82,6	13,1	7,9	0,23	5,5	13,3
Большая летняя	153,6	14,0	8,4	0,25	6,8	18,2
Велеса	149,2	14,7	8,9	0,32	7,9	41,8
Гера	126,8	13,6	8,2	0,21	11,0	17,1
Малышка	78,6	10,2	6,3	0,32	7,4	24,8
Самарская крас.	100,2	12,2	7,4	0,56	7,2	46,6
Фламенко	217,0	14,1	8,5	0,28	9,7	54,5
Элитная форма 60-2-2	102,3	13,4	8,1	0,25	10,6	28,8
Элитная форма 17-3-9	225,8	15,0	9,0	0,31	7,5	55,3

Айва — это одна из самых скороплодных, ежегодно и обильно плодоносящих культур. Основной целью исследований по айве являлось изучение по основным биологическим и хозяйственным признакам коллекционного и гибридного фонда айвы и получение на их основе новых

высокоурожайных, зимостойких сортов 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. Айва, как и груша, несмотря на то, что балл цветения в отчетном году у всех сортов был высокий: от 4 до 5 баллов, была со слабым урожаем. а у большей части сортов он вовсе отсутствовал (таблица 5).

Таблица 5– Сроки цветения сортов айвы, 2023 г

№ п/п	сорт, форма	цветение			урожай, кг/дер
		начало	конец	балл	
1.	Ароматная	25.04	30.04	5,0	0
2.	Благодатная	28.04	2.05	4,0	ед.
3.	Дербент 87	27.04	2.05	3,0	1,0
4.	Дюна	26.04	30.04	5,0	3,0
5.	Звездная	27.04	1.05	50,	0
6.	Золотистая (к)	29.04	3.05	5,0	0
7.	Кубаночка	27.04	1.05	4,0	4,0
8.	Новогодняя	30.04	4.05	5,0	4,0
9.	Подарочная	26.04	3.05	5,0	2,5
10.	Сорокская	28.04	1.05	5,0	1,0
11.	Софья	26.04	29.04	5,0	4,5
12.	Таманская	25.04	30.04	5,0	2,0
13.	15-4-28	25.04	30.04	5,0	1,0
14.	3-3-14	27.04	30.05	5,0	4,5
15.	8-16-12	26.04	2.05	5,0	2,0

За последние несколько лет в посадках айвы отмечается эпифитотия такого заболевания, как монилиоз (рисунок 8).

Рисунок 8 – Поражение айвы монилиозом

Развитию монилиоза способствует повышенная влажность воздуха, частые осадки во время цветения и благоприятные температуры для развития гриба. Выделены относительно устойчивые сорта: Дюна, Кубаночка, Новогодняя, Софья, Таманская и элитные формы: 3-3-14, 6-11-44.

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.

В результате проведенных научно-исследовательских работ выделен источник скороплодности – сорт айвы Кубаночка (3-17- 49) (Кубанская св. оп.). Дерево выше средней силы роста, крона с возрастом становится округлая, редкая. Засухоустойчивость и зимостойкость хорошая. Плоды крупные – 300 г, яблоковидной формы, окраска плодов золотисто-желтая. Мякоть кремовая, сочная, кисло-сладкая с ароматом. Плоды созревают в 3 декаде сентября – 1 декаде октября. Хранятся до декабря. Средняя урожайность – 30 т/га. Достоинства сорта: скороплодность, урожайность, высокие технологические качества плодов (рис. 9).

Рисунок 9 – Источник скороплодности – сорт айвы Кубаночка

Из гибридного потомства груши и айвы по результатам исследований в 2023 году выделены элиты, и на их основе создаются новые сорта с высокими хозяйственно ценными признаками продуктивности, устойчивости к био- и абиострессорам, пригодные для интенсивных, ресурсо-энергосберегающих технологий для юга России. Ниже дается хозяйственно-биологическая характеристика новых элитных форм груши и айвы:

– элитная форма груши 17-3-9. Дерево среднерослое, крона пирамидальная. Плоды выше среднего размера (200 г), удлиненно-грушевидной формы, с нежным румянцем, высоких вкусовых качеств. Элитная форма выделена за хорошую засухоустойчивость, скороплодность и товарные качества плодов (рис. 10).

Рисунок 10– Элитная форма груши 17-3-9

– элитная форма айвы 3-3-14 (Каунчи св. оп.) – дерево сдержанного роста, крона овальная. Основные ветви отходят под углом 90^0 средней толщины. Плоды среднего размера (250 г), грушевидной формы. Мякоть кремовая, сочная, кисло-сладкого вкуса. Урожайность до 20 т/га. Элитная форма выделена за скороплодность, хорошее качество плодов (рис. 11).

Рисунок 11 – Элитная форма айвы 3-3-14

Выделенные нами по признакам продуктивности и качества плодов элитные формы представляют собой качественно новые источники, которые будут использоваться в дальнейшем для получения новых сортов и в селекции.

1.3.2 Селекция и сортоизучение косточковых культур

Черешня – востребованная и коммерчески привлекательная косточковая культура в отрасли садоводства во всех странах мира. В настоящее время производство плодов черешни испытывает большие трудности, что связано в первую очередь с изменением погодно-климатических условий во всех точках планеты. В некоторых регионах на черешню оказывает влияние недостаток отрицательных температур в период покоя, в других – резкое понижение температуры после длительной оттепели, в южном регионе РФ урожай ценной культуры гибнет вследствие возвратных заморозков. Несмотря на то, что адаптивность к абиотическим факторам является первичным показателем при выборе сорта черешни, без высококачественных, крупных плодов она не

представляет интереса для производителя и потребителя. В этой связи крупноплодность – является одним из наиболее ценных хозяйственных и селекционно-биологических признака черешни.

Плоды черешни могут быть различными по размеру, что зависит от зоны возделывания, агротехнических условий и сортовых особенностей. Некоторые зарубежные сорта черешни (Sonata, Lory bloom, Fertard, Early Korvik, Kordia) могут достигать размеров до 14,0-15,0 г., средний размер украинских сортов (Джерелло, Прощальная Талисман, Василиса) колеблется от 10,0 до 12,0 г. В условиях Краснодарского края масса крупноплодных сортов черешни в отчетном 2023 г. составила 10,0-11,0 г. (табл. 6).

Таблица 6 – Биометрическая оценка плодов исследуемых сортов черешни, 2023 г.

Сорт	Масса плода, г			Параметры плода (Дл. х Шир.):
	min	max	среднее:	
Алая (к)	7,3	11,1	8,7	23,0 х 26,2
Василиса	6,9	9,7	8,2	22,4 х 25,0
Волшебница	7,2	9,2	8,0	21,0 х 24,5
Генеральская	7,4	9,7	8,9	23,4 х 26,0
Дилемма	7,1	9,9	8,1	22,0 х 24,0
Дар изобилия	10,2	5,4	8,5	22,0 х 24,5
Крупноплодная	5,8	11,3	9,2	24,5 х 25,0
Красна девица	6,0	9,1	7,9	21,6 х 25,0
Донецкий великан	6,3	10,4	9,1	23,0 х 27,0
Среднее:	**7,1**	**9,5**	**8,5**	**22,5 х 25,2**

Среди исследуемых сортов с крупноплодными плодами выделились сорта – Алая (к), Крупноплодная, Донецкий великан, Дилемма, Василиса, Генеральская с максимальной массой 9,7 – 11,3 г. Однако, с высоким средним показателем плодов выделен сорт **Крупноплодная**, с массой 9,2 г, максимальная составила – 11,3 г, параметры также были высокими 24,5 х 25,0 мм, что означает большую стабильность показателя и меньшее количество не стандартных плодов у данного сорта (рис. 12).

Рисунок 12 – Источник крупноплодности – сорт черешни Крупноплодная

Таким образом, проведенный анализ биометрических данных у исследуемых сортов черешни позволил выделить источник крупноплодности сорт Крупноплодная, который превзошел по показателю средней массы на 0,5 г контрольный сорт Алая.

Сорт **Крупноплодная** получен в Институте орошаемого садоводства УААН от опыления сорта Наполеон белая смесью пыльцы сортов Валерий Чкалов, Эльтон, Жабуле. Представляет интерес для промышленного выращивания в южных регионах. Включен в Государственный реестр по Северо-Кавказскому региону (6).

Дерево сильнорослое, быстрорастущее. Крона шаровидная, средней густоты, хорошо облиственная. Побеги прямые, коричневые с серым налетом. Лист среднего размера, узко-овальный, тёмно-зеленый. Зимостойкость высокая. Слабо поражается коккомикозом, поражается серой плодовой гнилью. Отличается засухоустойчивостью. Сорт самобесплодный.

Плоды созревают в средне-поздние сроки (конец II декады июня). Плоды крупные – средняя масса 8,5-9,0 г, максимальная может достигать 11, г, широко-округлые, покровная окраска тёмно-красная, а при полном созревании плодов почти чёрная. Мякоть тёмно-красная с белыми

прожилками, средней плотности, хрящеватая, сахаро-кислотный индекс равен 11,4, дегустационная оценка 4,6 балла. Транспортабельность плодов высокая.

Биохимический состав плодов: 15,9 % растворимых сухих веществ, 10,4 % сахаров, 0,93 % кислот, 7,6 мг/100 г витамина С, 50,0 мг/100 г витамина Р, 213,5 мг/100 г антоцианов.

Плоды универсального назначения, пригодны для современных видов технической переработки.

Достоинства: регулярная урожайность, высокая зимостойкость цветковых почек, крупный размер плодов.

Недостатки: склонность плодов к растрескиванию и поражению серой плодовой гнилью.

Выделение элитной формы. Региональный промышленный сортимент черешни постоянно обновляется современными сортами, с улучшенными биологическими и селекционными показателями, в том числе за счёт новых форм селекции СКФНЦСВВ. Госреестр насчитывает 14 сортов местной селекции, в т.ч. с 2022 г. включен новый сорт Ясно солнышко (селекции СКФНЦСВВ), однако при этом есть сорта, находящиеся в районировании более 50 лет (Краса Кубани, Краснодарская ранняя). В связи с этим, ведется непрерывная работа по выделению новых генотипов, полученных из гибридного потомства лучших отечественных и зарубежных сортов.

Одним их основных направлений в селекции черешни является адаптивность и качество плодов, что подразумевает высокую устойчивость к весенним заморозкам и крупноплодность плодов.

Совершенствование сортимента и постоянное его обновление улучшенными сортами невозможно без разработки и реализации селекционных задач, одной из которых является выделение элитных форм с ценными хозяйственными признаками.

Полевую и лабораторную оценку сортового и гибридного фонда генколлекции СКФНЦСВВ в 2023 г. осуществляли по нескольким

показателям – зимостойкости, продуктивности, устойчивости к коккомикозу и качеству плодов (табл. 7).

Таблица 7 – Характеристика сортов и элитных форм черешни по основным хозяйственно-биологическим показателям, 2023 г.

Сорт/Форма	Устойчивость к коккомикозу, балл	Урожай, кг/дер.	Масса плода, г	Зимостойкость, балл
Алая (к)	2	22,0	8,7	4
Василиса	2	20,0	8,2	3
Волшебница	1	15,0	8,0	4
Генеральская	3	5,0	8,9	3
Дилемма	2	20,0	8,1	4
Дар изобилия	2	10,5	8,5	5
Крупноплодная	3	15,0	9,2	3
Красна девица	2	12,0	7,9	3
Донецкий великан	2	10,0	9,1	3
12-5-2	1	25,0	8,0	4
12-15-2	2	13,5	6,5	2
12-12-10	2	5,5	6,2	3
12-12-9	1	12,0	7,0	2
12-14-22	3	4,0	6,7	2
Среднее:	**1**	**34,2**	**6,6**	**–**

В результате проведенных в 2023 г. учетов выделена 1 элитная форма черешни – **12-5-2**, которая имеет ряд положительных хозяйственных и селекционно-биологических показателей. Выделенная элитная форма по некоторым показателям (устойчивости к коккомикозу и урожайности) превосходит районированный сорт Алая. По массе плода немного уступает контрольному сорту Алая, зимостойкость на уровне районированного сорта.

Элитная форма **12-5-2** получена посредством межсортовой гибридизации лучших сортов черешни, исходные формы неизвестны. Дерево выше средней силы роста, с шаровидной кроной, средней густоты.

Созревание в условиях Краснодарского края – среднее (I-II декады июня). Средний размер плодов составляет – 7,5-8,0 г, максимальный размер может достигать 8,5 г, красные, при полном созревании тёмно-красные. Плоды

плотные, эффектные, одномерные. Форма плода – широко-сердцевидная, форма верхушки плода – слабовдавленная, мякоть 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: 15,5 % сухих веществ, 8,0 % сахаров, 0,9 % кислот, 8,5 мг/100 г. витамина С, 78,0 мг/100 г. витамина Р, 185,0 мг/100 г. антоцианов. Зимостойкость достаточно высокая для условий юга России. Устойчив к грибным заболеваниям. Урожайность до 30,0-35,0 кг с дерева или 12,5-14,6 т/га.

Достоинства: урожайность, высокая зимостойкость, качество плодов.

Недостатки: склонность плодов к растрескиванию в годы с обильными осадками (рис. 13).

Рисунок 13 – Элитная форма черешни 12-5-2

Вишня. В России вишня является одной из самых распространенных плодовых косточковых культур. Она неприхотлива к условиям произрастания, регулярно плодоносит и достаточно высокоурожайна. Известно, что одним из основных признаком сорта, наряду с адаптивностью, продуктивностью и качеством плодов, является скороплодность, характеризующая технологичность сорта. Оценку скороплодности, осуществляют по нарастанию и количественным показателям урожайности.

Сорта вишни по сроку вступления в плодоношение делятся на 3 группы: 1) вступающие в плодоношение на 2-3-й год являются скороплодными; 2) на 4-й – среднеплодные (со средним сроком вступления в плодоношение); 3) на 5-6-й год – позднеплодные.

Исследования проводили в центре коллективного пользования генколлекции косточковых культур на перспективных сортах вишни. В результате оценки сортов вишни по данному признаку были выделены наиболее скороплодные сорта: Призвание, Элегия, Ивановна, Нефрис, Тамарис, Игрушка (рис. 14).

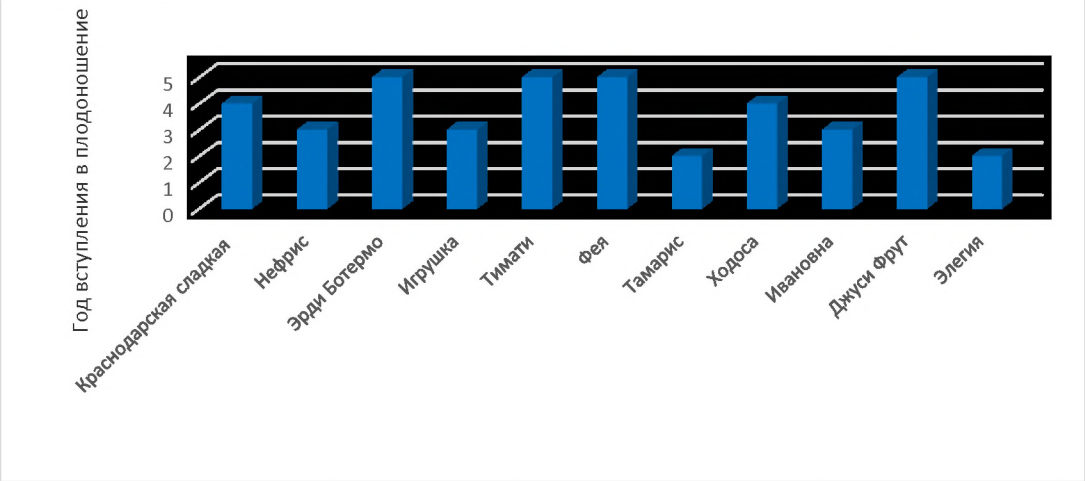


Рисунок 14 – Динамика наращивания урожая вишни в зависимости от продуктивного потенциала сорта

Таким образом, исходя из полученных данных в генколлекции СКФНЦСВВ, в качестве источника скороплодности выделен сорт вишни – **Элегия**, имеющий стабильную урожайность.

Сорт **Элегия** получен в результате скрещивания сортов 'Самсоновка' и 'Киевская 19'. Получена в Институте орошаемого садоводства. Принята на государственное испытание в 1983 году. Авторы: Н.И. Туровцев, В.А. Туровцева. Дерево среднерослое, крона шаровидная, средней густоты. Зимостойкость древесины высокая, зимостойкость почек ниже среднего, устойчивость к монилиозу и коккомикозу высокая. Среднего срока созревания.

Плоды крупные 4,9 - 5,5 г, плоскоогрулой формы, выравненные, темно-красные; мякоть плотная, сочная, кисло-сладкая. Косточка средняя хорошо отделяется от мякоти. Вкус кисло-сладкий. Плоды содержат растворимых сухих веществ - 14,6 %, сахаров - 8,22 %, кислотность - 0,86, витамина С 4,5 мг/100 г, витамина Р - 100,8 мг/100 г, антоцианов 69,5 мг/100 г. Урожайность средняя (рис. 15).

Рисунок 15 – Источник скороплодности – сорт вишни Элегия

В качестве элиты выделен гибридный сеянец **17-7-7** – получен в результате скрещивания сортов Тургеневки и Краснодарской сладкой. Дерево слаборослое – высота не более 2-х метров, скороплодное – на 3-й год после посадки. Тип плодоношения – преимущественно на букетных веточках. Среднего срока созревания. За годы исследований урожайность в среднем составила 12 кг/дер. или 4,9 т/га.

Плоды крупные 5,3-6,1 г, темно-красные, кисло-сладкие (рис. 16). Сок и мякоть красные. Плодоножка средней длинны, отрыв от плода сухой. Плоды универсального назначения используются как в свежем, так и переработанном виде (варенье, компоты). Засухоустойчивость высокая, устойчивость к

клястероспориозу и монилиозу достаточно высокая. Устойчивость к коккомикозу средняя. Засухоустойчивость достаточно высокая.

Достоинства: скороплодность, засухоустойчивость, крупный размер плодов, слаборослость, достаточно высокая устойчивость к монилиозу и клястероспориозу.

Недостатки: средняя устойчивость к коккомикозу.

Рисунок 16 – Элитная форма вишни **17-7-7**

Слива домашняя (*Prunus domestica L.*) занимает ведущее место среди плодовых косточковых культур, что связано с ее биологическими особенностями. Она обладает высоким адаптивным потенциалом, ежегодно плодоносит. Урожайность сливы в современных интенсивных насаждениях с плотной схемой посадки может достигать 30 т/га. Деревья сливы быстро восстанавливаются после зимних повреждений.

Слива – косточковая культура, обладающая комплексом биологических и хозяйственно-ценных признаков, позволяющих выращивать различные ее виды во многих регионах России. 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.). Содержание комплекса веществ повышает ценность и востребованность

этой культуры. Плоды сливы – ценный продукт питания. В них содержатся: сахара, витамины, биологически активные, пектиновые и минеральные вещества, а также кобальт, железо, калий, кальций, магний и другие микроэлементы. Плоды сливы также являются ценным продуктом для переработки.

Для решения проблемы импортозамещения возделываемых сортов плодовых культур, в т.ч. и сливы в садоводстве в последние годы популяризуется роль отечественных сортов и увеличение их доли в промышленных насаждениях.

Для создания новых высококачественных сортов сливы необходимо расширение базы исходного гибридного материала с привлечением новых сортов и гибридных форм, созданных в последние годы для дальнейшего выделения источников ценных признаков и получения отборных и элитных форм.

Проведенные в 2023 году исследования в центре коллективного пользования генколлекции косточковых культур позволили выделить 1 источник скороплодности и 1 элитную форму сливы.

Источник скороплодности сливы домашней – сорт Йо-йо

Дерево среднерослое, с густой кроной. Штамб серого цвета, прямой. Побеги неоколюченные, светло-коричневого цвета, опушение верхней трети побега слабое; междоузлия короткие. Вегетативные почки средние, слегка отклоненные, конусовидной формы, с тупой верхушкой.

Листья среднего размера, зеленого цвета, эллиптической формы, с острой верхушкой и тупым основанием; край листа пильчатый, глубина надреза – средняя. Глянцевитость верхней стороны листовой пластинки – слабая, нижняя сторона неопушенная. Черешки средней длины, зеленые. Железки среднего размера, зеленого цвета. Прилистники зеленые, средней длины, ланцетовидной формы.

Цветки средние, блюдцевидной формы. Лепестки средние, округлой формы, с округлой верхушкой и волнистыми краями, белой окраски, слегка сомкнутые. Бутоны белые.

Цветение проходит в средние сроки (2 декада апреля). Созревание плодов позднее – 1-2 декада сентября. В плодоношение сорт вступает рано, на 3 год после посадки в сад. Зимостойкость и засухоустойчивость средняя. Устойчивость к монилиозу и клястероспориозу средняя.

Плоды крупные (40-50 г), симметричные, эллипсовидной формы, с округлой верхушкой и вытянутым основанием, темно-синего цвета с сильным восковым налетом. Опушение отсутствует. Воронка неглубокая. Брюшной шов средний, выражен хорошо. Плодоножки средней толщины 0,3 см, длиной 1,5 см.

Косточки крупные (4-5 % от общего веса плода), эллиптической формы, с тупой верхушкой и широким основанием, светло-коричневой окраски, поверхность зернистая. Отделяемость от мякоти хорошая. Спинной шов среднеоткрытый. Центральное ребро выражено средне, боковые ребра хорошо заметны. Киль острый, размер – средний. Мякоть желтого цвета, средней плотности, ароматная, на вкус сладкая, сочность средняя. Дегустационная оценка вкусовых качеств сливы в свежем виде 4,7 балла. Биохимический состав плодов: сухие вещества – 16,5 %, сахара – 10,5 %, кислоты – 1,4 %.

Урожайность высокая (25-30 т/га) (рис. 17).

Рис. 17 – Сорт сливы домашней Йо-йо

Элитная форма сливы домашней 17-2-15. Дерево среднерослое (до 3,5 м), с редкой кроной. Штамб темно-серого цвета, прямой. Побеги неоколюченные, неопушенные, со слабой антоциановой окраской. Вегетативные почки мелкие, отклоненные, конусовидной формы, с острой верхушкой.

Листья крупные, темно-зеленого цвета, удлиненной формы, угол вершины острый, основание – выемчатое; надрезанность края листа и гороздчатая и зубчатая, глубина надрезанности – мелкая. Листовая пластинка с верхней стороны без опушения, с нижней – слабое опушение. 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 (1 декада апреля). Созревание плодов среднее – 3 декада августа. В плодоношение сорт вступает, на 5 год после посадки в сад. Зимостойкость средняя, засухоустойчивость высокая. Устойчивость к монилиозу и клястероспориозу средняя.

Плоды крупные (35-38 г), равнобокие, яйцевидной формы, со слегка вытянутой верхушкой и округлым основанием, темно-фиолетового цвета со средним количеством подкожных точек и сильным восковым налетом. Опушение отсутствует. Воронка средняя, брюшной шов выражен хорошо, не растрескивается.

Косточка средняя (масса 1,1 г; 3,0 % от общего веса мякоти), овальной формы, с тупой верхушкой и округлым основанием, светло-коричневая, поверхность бугорчатая. Отделяемость от мякоти хорошая. Мякоть светло-оранжевая, сочная. Плоды универсального назначения, транспортабельность хорошая.

Урожайность средняя (10-12 т/га при схеме посадки 4 х 2 м) (рис. 18, 19).

Рисунок 18 – Элитная форма 17-2-15

Рисунок 19 – Плоды элитной формы 17-2-15

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* – Курчанский, гена устойчивости **к милдью** *Rpv12* – Золотце, генов устойчивости к **оидиуму** *Ren3* и *Ren9* – Цитронный Магарача.

Курчанский (Мускат кубанский х Саперави северный) по ДНК-маркерам: (Варуссет х Гранатовый) – технический сорт винограда (рис. 20).

Рисунок 20 – Грозди сорта винограда Курчанский на кусте

Срок созревания сорта среднепоздний (135-150 дней после распускания почек). Гроздь коническая, средней плотности. Средняя масса грозди 170-185 г. Ягоды средние, округлые, сине-черные. Внутри ягод 2-3 семени. Мякоть сочная. Сахаристость сока ягод 21,5 г/100см3, кислотность 8,8 г/дм3. Морозоустойчивость высокая – выдерживает температуры до минус 27 °С. Достаточно устойчив к милдью (подтверждается данными ДНК-анализа – идентифицирован ген *Rpv3*). Согласно родословной, заявленной авторами (Мускат кубанский х Саперави северный), у сорта Курчанский не может быть гена устойчивости к милдью Rpv3, но была вероятность наличия гена Rpv10 (от Саперави северного). Однако, наличие гена Rpv10 не было подтверждено ДНК-анализом. В связи с чем с помощью 9 стандартных ДНК-маркеров (VVS2, VVMD5….VrZag79) мы реконструировали родословную сорта Курчанский и определили, что истинными родителями сорта являются - Варуссет и Гранатовый. Из чего следует, что устойчивость передалась от Варуссет (Сейв Виллар 23-657), имеющего в родословной северо-

американскую генплазму (источник устойчивости к милдью Rpv3). Также обладает повышенной устойчивостью к серой и белой гнили.

Урожайность высокая (до 9 килограммов с куста). Толерантен к филлоксере (2-3 балла).

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

Золотце (Талисман х Русбол улучшенный) – бессемянный сорт винограда ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко (рис. 21).

Рисунок 21– Гроздь сорта винограда Золотце

Срок созревания ранне-средний (120-130 дней). Кусты сильнорослые. Грозди средние и крупные, массой от 350 до 550 грамм, цилиндро-конические, плотные или очень плотные, реже средней плотности. Ягоды средние, массой около 3,9 грамм, округлые или слегка овальные, белого цвета. Кожица средней толщины, мякоть ягоды мясистая, вкус гармоничный, с легким мускатом. Сахаристость сока ягод 19-24 г/100 см3, кислотность 4,5-5,5 г/дм3. Класс

бессемянности – 3. Хорошо вызревает лоза. Сорт отличается высокой урожайностью и относительной устойчивостью к грибным болезням – оидиуму и милдью. Устойчивость к милдью подтверждается данными ДНК-анализа (определен ген *Rpv12*). Устойчивость, согласно родословной, передалась от сорта Талисман [Фрумоаса Албэ х Восторг ((Заря севера х Долорес) х Русский ранний)], имеющего в родословной ген плазму *V. amurensis*. Отличается высокой урожайностью. Морозоустойчивость до -25 °С. Сорт винограда Золотце по данным проведённого нами ДНК-маркерного анализа может быть использован в селекции бессемянных сортов винограда как донор гена устойчивости к милдью *Rpv12*.

Цитронный Магарача (Мадлен Анжевин х «Магарач 124-66-26 (Ркацители х Магарач 2-57-72) + Новоукраинский ранний») – технический сорт винограда ранне-среднего периода созревания (рис. 22).

Рисунок 22 – Гроздь сорта винограда Цитронный Магарача

Сила роста куста средняя или выше средней, цветки обоеполые. Грозди имеют цилиндро-коническую или коническую форму, обычно крылатые, среднего размера (300-400 грамм). Ягоды среднего размера, округлые, желто-зеленые или желтые. Вкус гармоничный, с сильно выраженным цитронно-мускатным ароматом. Внутри ягоды 3-4 овальных семени среднего размера. Сахаристость до 25-27 % при кислотности 5-7 г/л. Кожица тонкая и прочная,

мякоть сочная. Сорт устойчив к милдью, оидиуму, серой гнили, а также толерантен к филлоксере. По данным проведенного ДНК-анализа Цитронный Магарача является носителем двух генов устойчивости к оидиуму – *Ren3* и *Ren9*. Согласно родословной, сорт Мадлен Анжевин принадлежит к *V. vinifera*, соответственно, не может нести эти гены устойчивости. Исходя из этого, можно заключить, что гены передались от сорта Магарач 124-66-26 [(Ркацители х Магарач 2-57-72 (Мцване Кахури х Сочинский черный)) + Новоукраинский ранний], у которого в родословной есть сорт Сочинский черный неизвестного происхождения. По ампелографическим признакам этот сорт схож с представителями северо-американского вида, которые могут быть источниками генов устойчивости к оидиуму – *Ren3* и *Ren9*. Зимостойкость сорта составляет – минус 25 °С.

Сорт винограда Цитронный Магарача может быть использован как донор генов *Ren3* и *Ren9* в селекции на устойчивость к оидиуму, согласно по данным ДНК-маркерного анализа.

В 2023 году **выделена в элиту** гибридная форма винограда Тана 40 (рис. 23).

Рисунок 23 – Гроздь винограда элитной формы Тана 40

Гибридная форма винограда технического направления использования. Происхождение: получена от скрещивания сортов Мускат кубанский х

Саперави северный. Средне-позднего срока созревания, сила роста средняя, средняя масса грозди 200 гр., средней плотности, ветвистой формы, ягода яйцевидная, темно-синяя. Коэффициент плодоношения - 1,56, плодоносности - 1,63. Урожайность в среднем 6 кг с куста. Сахаристость сока ягод 24,2-25,9 г/100 см^3 при кислотности 5,7-6,4 г/дм^3. Форма выделяется по признакам урожайности, качества.Виноград используется для получения качественных столовых вин. Вина имеют темно-рубиновый цвет. Аромат яркий, ягодный, сложный с оттенками смородины, ежевики, шоколада и паслена. Вкус полный, танинный, свежий чистый, сложный с плодовыми и сливочными оттенками. Вкус полный, чистый, гармоничный. Дегустационная оценка 7,8 -7,9 балла. Рекомендуется по использованию в селекции для создания технических сортов винограда с высоким качеством урожая, повышенной устойчивостью к биотическим и абиотическим стресс-факторам.

В 2023 году **подана заявка на патент** и готовится передача в Госсортоиспытание сорта Вагра (селекционный номер Тана 24) – новый сорт винограда технического направления использования (рис.24).

Рисунок 24 – Гроздь винограда сорта Вагра

Происхождение: получен от скрещивания сортов Варусет х Гранатовый. Среднего срока созревания. Лист среднего размера, пятилопастный. С мелкими слегка перекрывающимися боковыми вырезками. Паутинистое и щетинистое опушение между главных жилок на нижней стороне листовой пластинки отсутствует. Средняя масса грозди 125 гр. Ягода темно-синяя, средняя или мелкая, округлая. Куст среднерослый. Вызревание побегов хорошее. Коэффициент плодоношения - 1,55, плодоносности - 1,71. Обладает повышенной устойчивость к милдью и оидиуму. Урожайность стабильная, в среднем 6 кг с куста. Сахаристость сока ягод 22,4-24,2 г/100 см^3 при кислотности 5,9-6,2 г/дм^3. Урожай используется для получения высококачественных столовых вин.

Вина характеризуются темно-рубиновой окраской, сложным ароматом красных ягод с оттенками паприки, паслена и мака. Вкус полный, свежий. Дегустационная оценка сухих вин наливом 7,8 балла.

Источники хозяйственно-ценных признаков винограда:

По устойчивости к антракнозу – гибридная форма винограда С3 столового направления использования, полученная от скрещивания сортов Низина и Кишмиш лучистый (рис.25). Гибридная форма раннего срока созревания, средней силы роста. Листья средние, округлые, средне или глубоко рассечённые, пятилопостные. Грозди рыхлой плотности, крылатой формы, средняя масса – 293 г. Ягода яйцевидная, розовая, кожица средней толщины. Форма выделяется ранним созреванием, нарядной гроздью, повышенной устойчивостью к листовой форме антракноза;

Рисунок 25 – Молодой куст гибридной формы С3

По морозостойкости – технический сорт винограда Северный сладкий неизвестного происхождения, среднего срока созревания (рис.26). Листья округлые, слабо и средне рассеченные, 3-5 лопастной. Грозди мелкие и средние, плотные и очень плотные, конической формы, иногда с крылом, массой от 80 до 200 г., ягода округлая, сине-черная, с пруиновым налетом. Сорт отличается сильнорослостью (лозы могут достигать 5-6 метров), высокой урожайностью, хорошим сахаронакоплением, морозостойкостью (-30 °С), устойчивостью к грибным заболеваниям. К недостаткам относят неравномерное созревание ягод в грозди.

Рисунок 26 – Молодой куст сорта винограда Северный сладкий

1.4 Выводы

В ходе выполнения исследований в отчетном 2023 году выполнены все поставленные задачи:

Получены новые знания о фенотипическом и генотипическом разнообразии образцов генофонда садовых культур и винограда ФГБНУ СКФНЦСВВ, включая основные адаптивно значимые и селекционно-ценные признаки.

Получены элитные формы, в том числе элитная форма яблони 12/2-20-22 (Корей × Прима), обладающая иммунитетом к парше; элитная форма груши 17-3-9, выделенная по комплексу ценных признаков: засухоустойчивость, скороплодность и товарные качества плодов; элитная форма айвы 3-3-14, выделена по признаку крупноплодности, имеет хорошее качество плодов; 3 элитные формы косточковых культур: элитная форма черешни – 12-5-2; элитная форма вишни – 17-7-7; элитная форма сливы – 17-2-15; элитная форма винограда Тана 40. 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.

Выделены источники хозяйственно ценных признаков, в том числе: яблони – 12/2-21-76 (источник крупноплодности плодов), 12/1-20-46 (источник темно-красной интенсивной окраски плодов); три источника скороплодности ¬ сорт айвы Кубаночка (3-17-49), сорт сливы Йо-Йо, сорт вишни Элегия; источник крупноплодности черешни – сорт Крупноплодная. Виноград: гибридная форма С3 – источник устойчивости к листовой форме антракноза; сорт Северный сладкий – источник морозостойкости. Выделенные источники ценных признаков рекомендуются для включения в дальнейший селекционный процесс по созданию сортов нового поколения с заданными признаками.

Создан и передан в государственное сортоиспытание 1 новый иммунный к парше (с геном Rvi6) сорт яблони Эльф осеннего срока созревания; подана заявка на патент и готовится передача в Госсортоиспытание сорт винограда Вагра технического направления использования. 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.

Выделены 3 донора ценных признаков винограда: гена устойчивости к милдью Rpv3 – Курчанский, гена устойчивости к милдью Rpv12 – Золотце, генов устойчивости к оидиуму Ren3 и Ren9 – Цитронный Магарача

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

Современные селекционно-генетические исследования направлены на решение многих селекционных задач, таких как методы ускоренной оценки и идентификации наиболее ценных образцов, обладающих комплексом хозяйственно-ценных признаков: устойчивостью к болезням или вредителям, с повышенной питательной ценностью или улучшенными вкусовыми характеристиками и повышенным качеством плодов. Развитие молекулярной генетики обусловило появление технологии ДНК-маркерного анализа, позволяющего напрямую оценивать геномный полиморфизм, а не через его фенотипические проявления.

Методы ДНК-маркерного анализа востребованы как для решения важных селекционных задач – идентификации генов хозяйственно-ценных признаков, диагностики вирусных и фитоплазменных патогенов, так и фундаментальных исследований, а именно анализа генетического разнообразия сортов и форм растений, что является важным аспектом для сохранения биоразнообразия и предотвращения потерь генетических ресурсов.

В целом, молекулярно-генетические методы в селекции растений значительно ускоряют процесс создания новых сортов. Они позволяют селекционерам работать более эффективно, что способствует повышению эффективности сельскохозяйственного производства и обеспечению продовольственной безопасности страны.

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. Генетическое разнообразие – это степень генетической изменчивости, присутствующая среди особей разновидности или популяции внутри вида. В условиях изменений окружающей среды различные сорта сельскохозяйственных культур выживают благодаря наличию генетических вариаций, которые позволяют сортам адаптироваться. Однако сорта с небольшим генетическим разнообразием или вообще без него могут стать восприимчивыми к биотическим и абиотическим стрессам. Генетическое разнообразие помогает селекционерам поддерживать гибридные сорта, что приводит к сохранению желаемых характеристик, таких как качество плодов и устойчивость к различным стрессам [33].

Основные направления применения молекулярных маркеров при работе с генетическими ресурсами растений можно представить следующим образом (рис. 25).

Рисунок 27 – Использование молекулярных маркеров в работе с генетическими ресурсами растений [34]

Среди методов ДНК-маркерного анализа можно выделить локусспецифичные (монолокусные) и мультилокусные ДНК-маркеры. Из локусспецифичных одними из наиболее востребованных являются микросателлитные ДНК-маркеры, которые кодоминантны, распределены по всему геному, обладают значительной аллельной изменчивостью. В настоящее время SSR-маркеры чаще всего используют для дифференцировки растений внутри вида, идентификации сортов, составлении генетических карт, в маркерной селекции, а также в работах по изучению генетического разнообразия и паспортизации сортов культурных растений. Микросателлитное 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 [35,36, 37].

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 [38, 39]. 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) [40]. 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 [41]. Данные методы предполагает постановку ПЦР с использование 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 паспортизацию, а также осуществлять идентификацию генотипов (сортов, гибридов и т.д). Низкая себестоимость выполнения анализа в сочетании высоким уровнем информативности и воспроизводимости результатов.

Помимо 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 обусловливает их несовместимость при опылении. [42].

В мировом генофонде яблони наиболее распространены 7-8 основных аллелей, из которых аллели S2, S3, S5, S7, S10 являются наиболее распространенными [43-46]. 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 прогнозирования степени совместимости сортов при опылении, что позволяет эффективно комбинировать сорта в садовых насаждениях, 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.

Одним из наиболее важных вопросом для яблони является идентификация гена устойчивости к парше – наиболее значимому фитопатогену этой садовой культуры, вызываемому аскомицетом *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter [47]. Данное заболевание является причиной существенного ухудшения качества плодов и снижения продуктивности садового агроценоза [48].

Большинство устойчивых сортов несут основной ген устойчивости *Rvi6 Vf* в старой номенклатуре), что привело к отбору вирулентных изолятов [49]. С использованием данного подхода возможно детерминировать ген устойчивости к парше на ранних этапах развития растения.

Также важное место в селекции яблони занимают признаки качества плодов, которые включают такие характеристики, как внешний вид, вкус плодов, структура мякоти, биохимический состав, лежкоспособность и транспортабельность, которые условно могут быть разделены на потребительские и технологические. Одним из наиболее важных признаков, влияющим одновременно как на потребительские, так и технологические качества, является лежкоспособность плодов, которая в значительной степени обеспечивается сохранением плотности мякоти плода на высоком уровне при длительном хранении [51]. Стоит отметить, что это сложный полигенный признак, который может быть обусловлен влиянием нескольких биохимических процессов в клетках плода [51-53].

Одним из наиболее важных факторов, влияющих на сохранность плотности мякоти плодов при хранении, является низкий уровень синтеза эндогенного этилена в плодах, который, который контролируется одним из ключевых генов – аминоацил-циклопропан-синтазы – Md-ACS1. Образцы, гомозиготные по аллелю 2 данного гена (MdACS1-2/2), имеют плоды со сниженным уровнем синтеза этилена при хранении и, соответственно, повышенную лежкоспособность [54]. Наряду с геном Md-ACS1, установлен

вклад в генетический контроль признака плотности мякоти и изменения ее структуры при хранении для таких генов, как MdACO1 [55]. Md-Exp7 [56], MdPG1[57], Md-ACS3a[58].

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 анализа генетического сходства генотипов (сортов, элитных форм, гибридов) и молекулярно-генетическую идентификацию генов хозяйственно-ценных признаков. В связи с этим, в отчетном 2023 году нами были поставлены следующие задачи:

– выполнить апробацию локусспецифичных и мультилокусных ДНК-маркеров и определить наиболее перспективные для выполнения генотипирования плодовых культур в том числе для анализа генетической стабильности растений, получаемых при микроклональном размножении;

– разработать и усовершенствовать методы ДНК-маркерной паспортизации образцов плодовых культур и идентификации генов хозяйсвтенно-ценных признаков, а также вирусных и фитоплазменных патогенов;

– с использованием ДНК-маркерного анализа выполнить генотипирование сортов и сортообразцов плодовых культур и винограда и установить генетические взаимосвязи между изученными генотипами.

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, генетический анализатор Нанофор 05, ДНК - амплификаторы Eppendorf Mastercycler gradient, BioRad T100, электрофоретические камеры SE1, SE2, трансиллюминатор Vilber Lourmat, центрифуги для микропробирок

Eppendorf Mini spin, Elmi, 5427R, термостаты для микропробирок, микродозаторы автоматические Thermo Labsystems и Biohit с переменным объемом. стерилизатор ВК-30, шкаф сушильный ШС-80 (0+200), дистиллятор ДЭ-10, термостаты с воздушным охлаждением ТСО-1/80, рециркуляторы воздуха бактерицидные ОБР-30, облучатель ОБН-1х30, весы аналитические Shinko HTR-220-E, мешалка магнитная C-MAG HS 7, ламинарные боксы С-1,2 (код 110.120), pH-метры pH-150И, люксметр ТКА-люкс.

В том числе оборудование, приобретенное за счет средств гранта: Генетический анализатор Нанофор 05; ДНК-амплификаторы MiniAmp Plus, GeneExplorer GE-96G; рефрактометр PAL-3; спектрофотометр Nano-500, 200-800 nm, Allsheng; низкотемпературный морозильник MDF-U880VH (861 л); -50С...-86С; весы Ohaus PR-224, Шкаф сушильный +200 С ШС-80-01 СПУ; термостат суховоздушный ТВ-80 и др. 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, dNTPs, буфер для ПЦР; реактивы для электрофореза: агароза, полимер «ПДМА-6», маркер «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 2024 год.

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

Для экстракции ДНК методом ЦТАБ использовали следующий протокол:

Образец вносили в микропробирки и растирали с прогретым до 60 °С 2×ЦТАВ буфером, содержащим 2 % ЦТАВ (цетилтриметиламмоний бромид), 1,4 М хлористого натрия, 0,1 М Трис-гидрохлорид, 20 мМ ЭДТА (этилендиаминотетраацетат). При этом соблюдали соотношение 500 мкл буфера на 0,1 г ткани. На следующем этапе образцы центрифугировали 10 минут при 5 тыс. об./мин., отбирали супернатант и добавляли к нему 0,2 V 5×ЦТАБ буфера, содержащего 5 % ЦТАВ и 350 мМ ЭДТА и инкубировали 10 минут при 60 °С, добавляли равный объем буфера для преципитации (1 % ЦТАВ, 50 мМ Трис-HCI, 10 мМ ЭДТА) и оставляли на ночь при комнатной температуре. После преципитации ДНК, осадок растворяли в 500 мкл солевого буфера (1 М NaCI, 10 мМ Трис-HCI, 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*ТЕ-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 $см^2$). 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*ТЕ-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 генов яблони, SSR-маркеры яблони, груши, черешни, абрикоса, а также мультилокусные ДНК маркеры ScOT, CDDP, ISSR [35, 38, 40, 41, 54-61].

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.

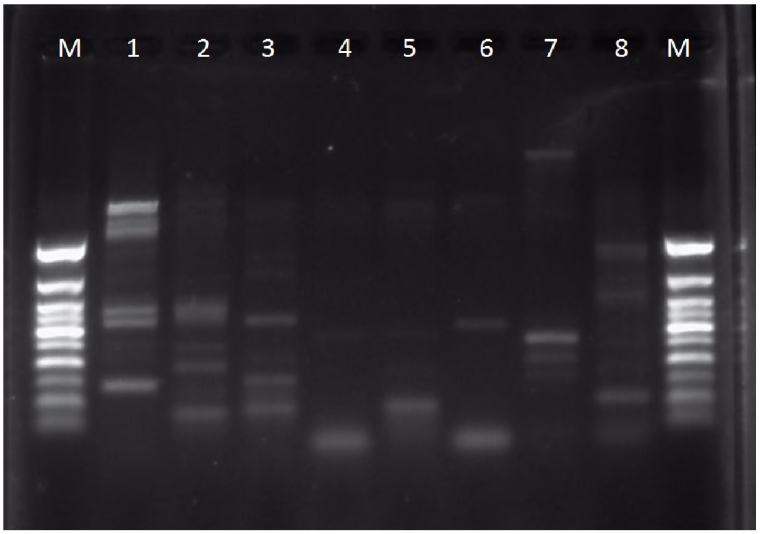
При оценке результатов микросателлитного анализа матрица генетических дистанций была построена с использованием коэффициентов (индексов) подобия по M. Nei и W. Li (1979) [62]. Кластерный анализ выполнен невзвешенным попарно-групповым методом на основе арифметических средних (UPGMA) с использованием программ 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 Апробация мультилокусных ДНК-маркеров для генотипирования айвы обыкновенной

В целях отбора наиболее перспективных для генотипирования образцов айвы обыкновенной была выполнена апробация и предварительная оценка уровня полиморфизма мультилокусных SCoT+CDDP маркеров. Для апробации били отобраны 16 SCoT+CDDP-маркеров. В ходе апробации использовали 8 генотипов айвы: 3-21-2, 3-17-49, Янтарная молдавская, Подарочная, Новогодняя, Таманская, Айвово-яблочный гибрид, Благодатная. В работе были задействованы следующие SCoT+CDDP - маркеры: SCoT19+ ERF1, SCoT19+ ERF2, SCoT19+ ERF3, SCoT19+ WRKYR1, SCoT19+

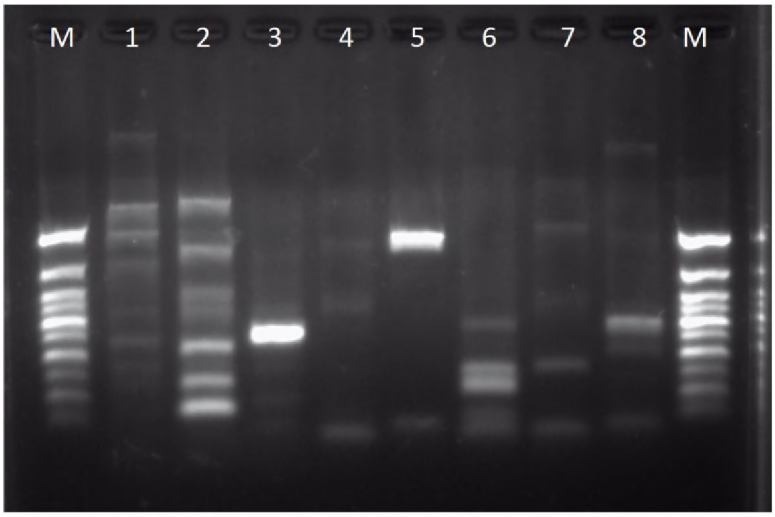
WRKYR2, SCoT19+ WRKYR3, SCoT19+ WRKYR2B, SCoT19+ WRKYR3B, SCoT20+ ERF1, SCoT20+ ERF2, SCoT20+ ERF3, SCoT20+ WRKYR1, SCoT20+ WRKYR2, SCoT20+ WRKYR3, SCoT20+ WRKYR2B, SCoT20+ WRKYR3B. Результаты представлены на рисунках 28 и 29.



Примечания: 1 - SCoT19+ ERF1, 2 - SCoT19+ ERF2, 3 - SCoT19+ ERF3, 4 - SCoT19+ WRKYR1, 5 - SCoT19+ WRKYR2, 6 - SCoT19+ WRKYR3, 7- SCoT19+ WRKYR2B, 8 - SCoT19+ WRKYR3B; M – маркер веса

Рисунок 28 – Апробация SCoT+CDDP маркеров на генотипах айвы обыкновенной

В качестве критериев отбора перспективных маркеров учитывались следующие характеристики ДНК-фингерпринтов (специфического ДНК-профиля характерного для генотипа): Количество амплифицированных ДНК-фрагментов, качество амплификации ДНК-фрагментов и их полиморфность между сортами. Характеристики использованных в работе маркеров представлены в таблице 8. Качество ДНК-фингерпринтов определялось исходя из степени выраженности ДНК-фрагментов на агарозном геле. Было выделено две группы: I – яркие, легко считываемые ДНК-фрагменты, II – тусклые ДНК-фрагменты.



Примечания: 1 – SCoT20+ ERF1, 2 - SCoT20+ ERF2, 3 - SCoT20+ ERF3, 4 - SCoT20+ WRKYR1, 5 - SCoT20+ WRKYR2, 6 - SCoT20+ WRKYR3, 7- SCoT20+ WRKYR2B, 8 - SCoT20+ WRKYR3B; M – маркер веса

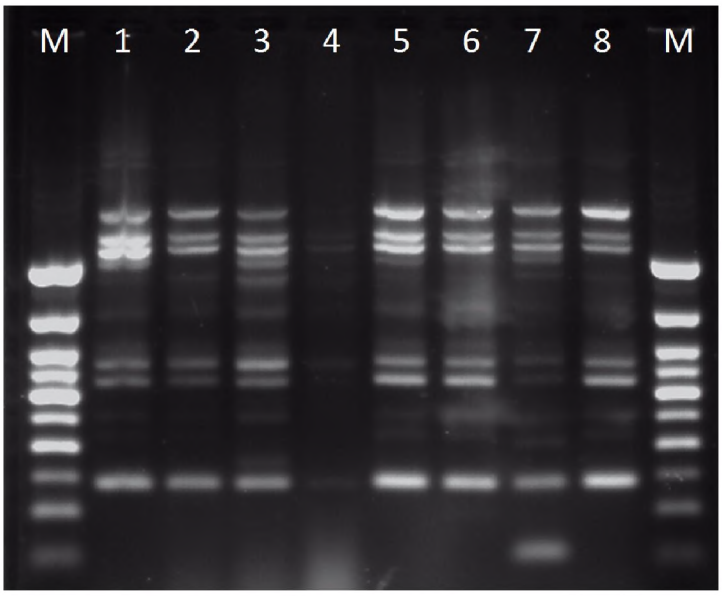
Рисунок 29 – Апробация SCoT+CDDP маркеров на генотипах айвы обыкновенной

Таблица 8 – Характеристики SCoT+CDDP -маркеров

№	SCoT+CDDP маркеры	Количество ДНК-фрагментов	ДНК-фингерпринты
1	SCoT19+ ERF1	6	I
2	SCoT19+ ERF2	4	II
3	SCoT19+ ERF3	4	II
4	SCoT19+ WRKYR1	2	II
5	SCoT19+ WRKYR2	2	II
6	SCoT19+ WRKYR3	2	II
7	SCoT19+ WRKYR2B	5	II
8	SCoT19+ WRKYR3B	6	II
9	SCoT20+ ERF1	9	II
10	SCoT20+ ERF2	8	I
11	SCoT20+ ERF3	1	I
12	SCoT20+ WRKYR1	4	II
13	SCoT20+ WRKYR2	2	I
14	SCoT20+ WRKYR3	5	II
15	SCoT20+ WRKYR2B	5	II
16	SCoT20+ WRKYR3B	5	II

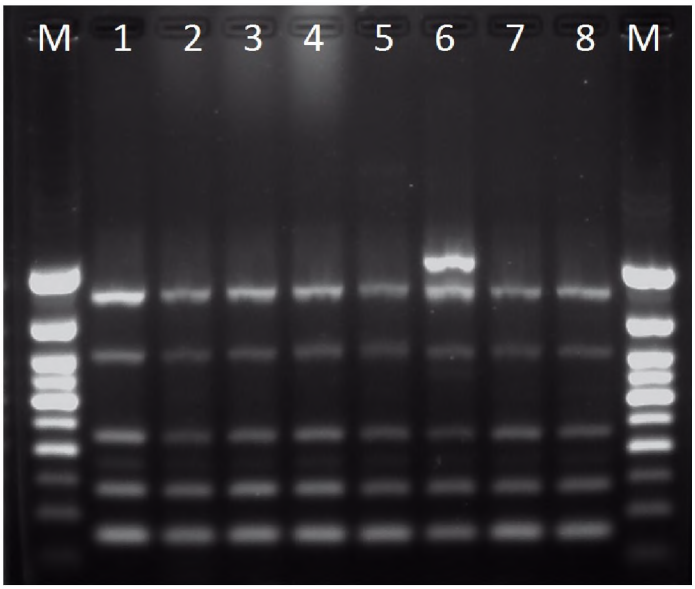
Исходя из сочетания количества ДНК-фрагментов и их качества, были выделены два маркера для оценки полиморфизма SCoT19+ ERF1 и SCoT20+ ERF2 (рис. 30, 31) для оценки полиморфизма на 8 сортах айвы обыкновенной. При оценке полиморфизма маркера SCoT19+ ERF1 на 8 сортах айвы обыкновенной было выявлено 11 ДНК-фрагментов, 9 из которых являлись полиморфными. Однако, для маркера SCoT20+ ERF2 из 6 установленных

ДНК-фрагментов, лишь один ДНК-фрагмент выявленный у сорта являлся полиморфным.



Примечания: 1 - 3-21-2, 2 - 3-17-49, 3 - Янтарная молдавская, 4 -Подарочная, 5 - Новогодняя, 6 -Таманская, 7 - Айвово-яблочный гибрид, 8 - Благодатная

Рисунок 30 – Полиморфизм маркера SCoT19+ ERF1 на 8 генотипах айвы обыкновенной



Примечания: 1 - 3-21-2, 2 - 3-17-49, 3 - Янтарная молдавская, 4 -Подарочная, 5 - Новогодняя, 6 -Таманская, 7 - Айвово-яблочный гибрид, 8 - Благодатная

Рисунок 31 – Полиморфизм маркера SCoT20+ ERF2 на 8 генотипах айвы обыкновенной

Таким образом, для дальнейшей работы по генотипированию сортов айвы обыкновенной был отобран один SCoT+CDDP маркер. Применение

SCoT19+ ERF1 в сочетании с другими полиморфными мультилокусными маркерами позволит осуществлять оценку генетической частоты посадочного материала.

2.3.2 Апробация SSR-маркеров на подвоях косточковых культур

Была осуществлена апробация 12 SSR маркеров на 4 генотипах подвоев косточковых культур (ПКСК-1, ПКСК-2, ВСЛ-1, Гизела Б). Были задействованы ранее разработанные мультиплексные наборы SSR-маркеров, позволяющие эффективно проводить генотипирование образцов.

Главной задачей при оптимизации параметров ПЦР было получение максимального синтеза целевых фрагментов при минимальном синтезе неспецифических амплификатов. Кроме того, с целью сокращения затрат времени при выполнении генотипирования большего количества образцов и упрощения алгоритма работы, проводилась разработка одного-двух унифицированных протоколов ПЦР для всех использованных в работе SSR-маркеров и, соответственно для всех мультиплексных наборов.

По результатам генотипирования были получены четкие, достоверно идентифицируемые SSR-фингерпринты для всех изученных генотипов. В таблице 9 представлена информация о типе флуоресцентного красителя, использованного для маркера, диапазон длин амплифицированных фрагментов, согласно с полученными нами данными.

Таблица 9 – Характеристики SSR –маркеров апробированных на подвоях косточковых культур

SSR-локусы	Мультиплексы	Флуорофор	Кол-во аллелей	Диапазон размера
BPCCT002	1	FAM	4	172-200
Ps12a02a	1	ROX	5	150-182
UDP98-409	1	R6G	4	124-130
CPPCT022	2	R6G	7	249-259
UDP98-407	2	TAMRA	5	184-200
UDP98-410	2	FAM	5	122-144
UDP98-022	3	FAM	4	82-140
EMPaS06	3	R6G	6	200-230
UDP96-018	3	ROX	7	245-273

Сочетания в мультиплексных наборах позволили эффективно проводить генотипирование одновременно по нескольким локусам. Данные мультиплексные наборы могут быть в дальнейшем использованы в идентификации подвойного материала.

2.3.3 Анализ генетических взаимосвязей абрикоса из разных эколого-географических групп и природных популяций Дагестана методом IRAP генотипирования

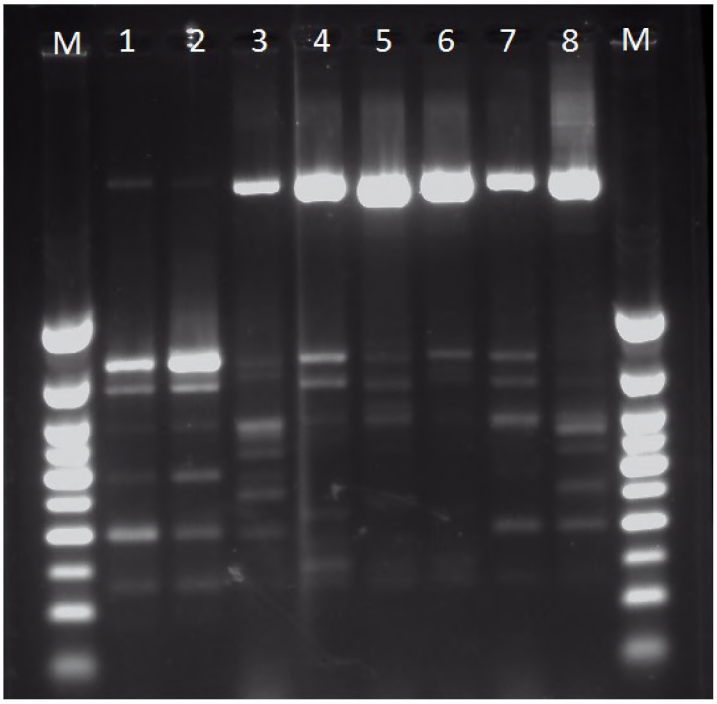
Для проведения оценки генетического родства было осуществлено генотипирование 32 образцов абрикоса. Выборка включала 20 образцов, отобранных в экспедиционных выездах в районе села Салта (Дагестан, административный центр Гунибского района), 6 образцов, отобранных в районе села Буртанимахи (Левашинский район Дагестана) и шесть культурных сортов различного экогеографичекого происхождения – Лескор, Краснощекий, Шиндахлан, Хекобарш, Хонобах и Hong Yu из коллекции Дагестанской опытной станции (табл. 10).

Таблица 10 – Отобранные для генотипирования образцы абрикоса обыкновенного

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

Для проведения генетического анализа указанной выборки сортов были использованы два IRAP маркера Cass1 и Cass2. На рисунке 32 показана электрофореграмма, отображающая ДНК-фингерпринты 8 образцов абрикоса генотипированных с применением IRAP маркера Cass2. На данном рисунке отображены ДНК-фингерпринты как двух образцов из природной популяции Республики Дагестана, так и ДНК-фингерпринты сортов различного

экогеографического происходения: Лескор, Краснощекий, Шиндахлан, Хекобарш, Хонобах, Hong Yu.



Примечания: 1 – Буртанимахи 5, 2 - Буртанимахи 6, 3 – Лескор, 4 - Краснощекий, 5 – Шиндахлан, 6 - Хекобарш,7 – Хонобах, 8 - Hong Yu

Рисунок 32 – ДНК-фингерпринты 8 образцов абрикоса по маркеру Cass2

Результаты ДНК-генотипирования образцов абрикоса позволили построить дендрограмму с использованием метода UPGMA. Созданная UPGMA методом дендрограмма распределения 32 образов винограда отображена на рисунке 33.

Исходя из структуры дендрограммы можно отметить отсутствие четкого разделения между отборами образцов абрикоса, произрастающими близ поселений Салта и Буртанимахи. Все образцы из отборов формируют единый кластер, исключение составил образец Салта 11 включенный в общий кластер с сортами Лесхор и Хонобах. В целом, культурные сорта задействованные в работе занимают внешнее, относительно отобранных образцов, положение, формируя несколько кластеров. Самым генетически отдаленным образцом является сорт китайского происхождения Hong Yu.

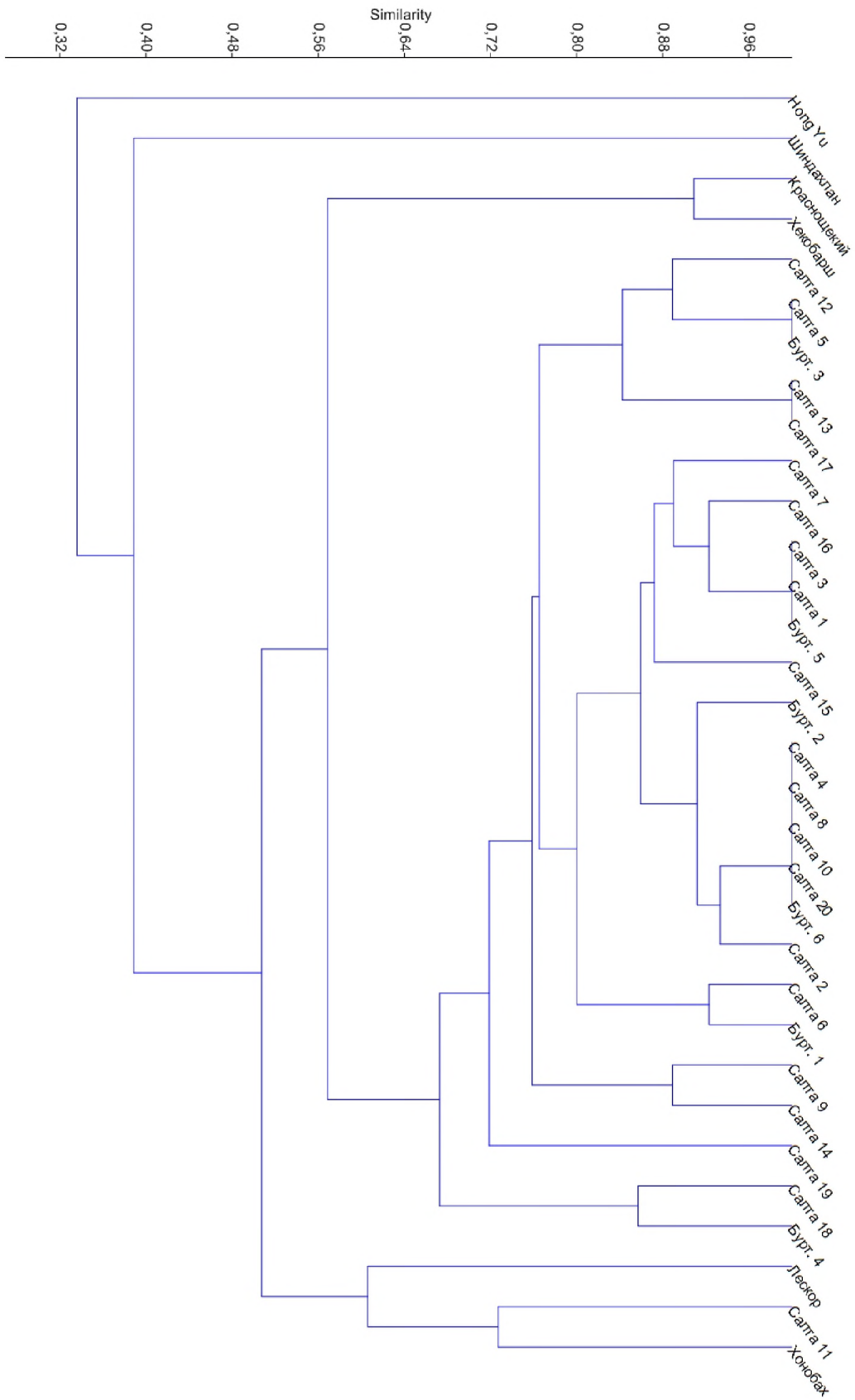


Рисунок 33 – Дендрограмма 32 образцов абрикоса обыкновенного, построенная методом UPGMA

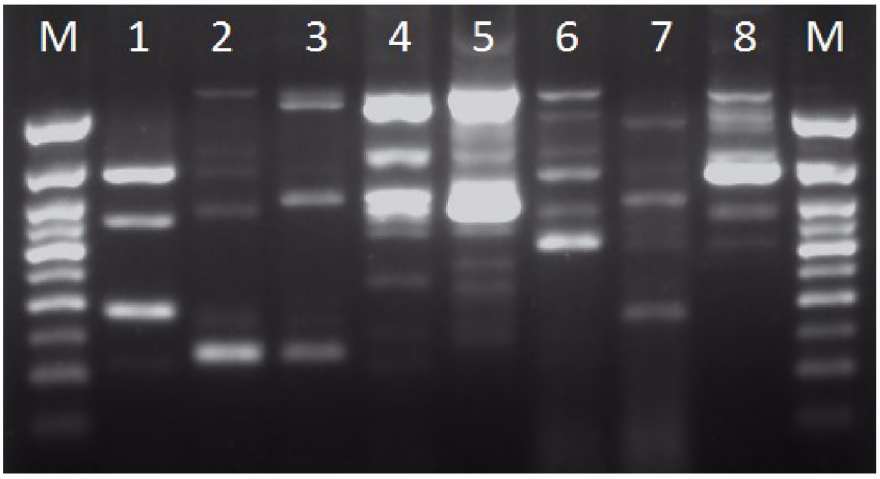
2.3.4 IRAP – генотипирование сортов винограда из разных эколого-географичеких групп

В качестве образцов для гентипирования представителей различных экогеографических групп винограда были отобраны 16 сортов винограда. Перечень сортов представлен в таблице 11.

Таблица 11 – Сорта винограда, отобранные для IRAP-генотипирования

№	Название	Эколого-географичекая группа
1	Шавраны	понтийская
2	Дмитрий	понтийская
3	Достойный	понтийская
4	Ркацители Магарача	понтийская
5	Цитронный Магарача	понтийская
6	Юбилей Молдавии	понтийская
7	Молдова	понтийская
8	Сенека	североамериканская
9	Восторг	понтийская
10	Красностоп золотовский	понтийская
11	Рислинг рейнский	западноевропейская
12	Конкорд	североамериканская
13	Шардоне	западноевропейская
14	Совиньон Блан	западноевропейская
15	Вионье	западноевропейская
16	Спитак Лернату	восточная

Для генотипирования были отобраны 4 IRAP маркера DKS007, DKS014, DKS019, DKS024. На рисунке 34 представлена электрофореграмма, отображающая ДНК-фингерпринты 8 сортов винограда по маркеру DKS19.



Примечания: 1- Восторг, 2- Красностоп золотовский, 3 - Рислинг рейнский, 4 – Конкорд, 5 – Шардоне, 6 - Совиньон Блан, 7 – Вионье, 8 - Спитак Лернату

Рисунок 34 – ДНК-фингерпринты 8 сортов винограда по маркеру DKS19

Полученные в ходе ДНК-генотипирования образцов винограда данные были использованы для построения дендрограммы с использованием метода UPGMA. Созданная UPGMA методом дендрограмма представлена на рисунке 35.

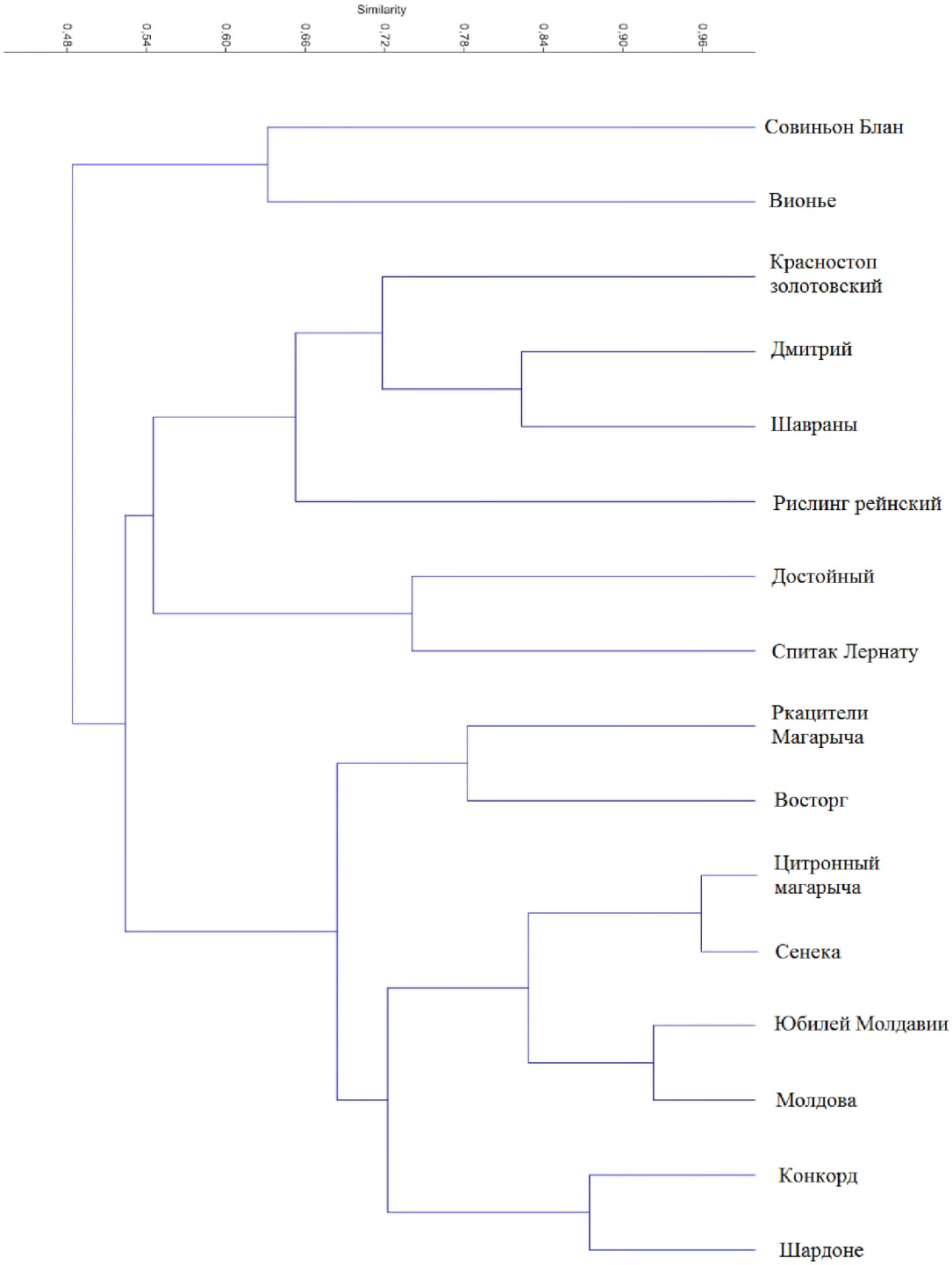


Рисунок 35 – Дендрограмма 16 сортов винограда, построенная методом UPGMA

На дендрограмме наиболее генетически удаленными генотипами выступают сорта западноевропейского происхождения: Совиньон Блан, Вионье. Первый и второй кластер сформированы ортами различного происхождения. Первый кластер: Красностоп золотовский, Дмитрий, Шавраны, Рислинг рейнский, Спитак Лернату. Второй кластер: Ркацители Магарача, Восторг, Цитронный Магарача, Сенека, Юбилей Молдавии, Молдова, Конкорд, Шардоне.

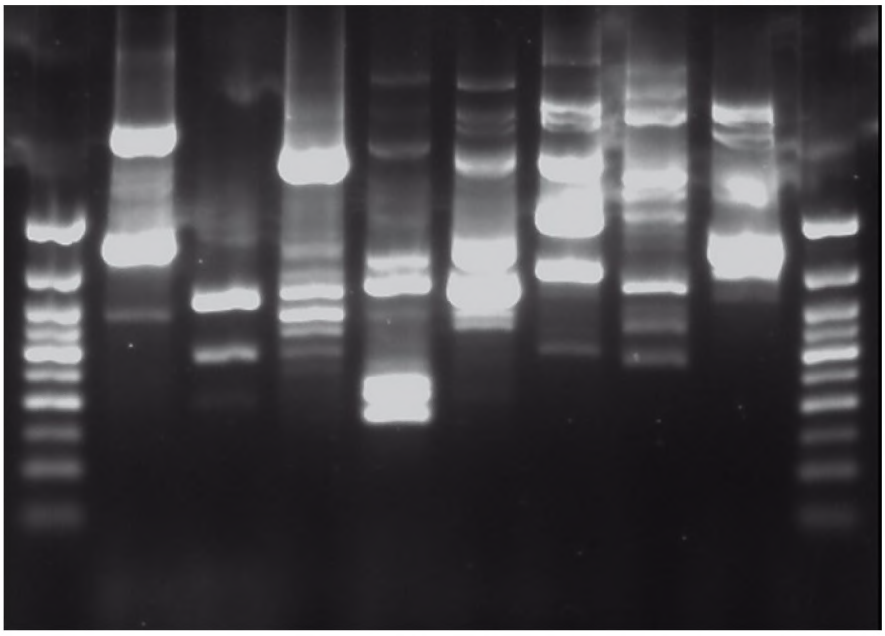
2.3.5 Апробация и поиск информативных IRAP и ISSR ДНК-маркеров для генотипирования и анализа генетической стабильности растений ежевики обыкновенной, получаемых при микроклональном размножении

Для определения генетической стабильности размножаемой *in vitro* садовой культуры ежевики обыкновенной нами были апробированы 10 ISSR маркеров и 6 IRAP маркеров. В качестве растительного материала были отобраны маточные растения и микроклонально размноженные регенеранты относящиеся к сорту ежевики.

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. 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 2 минута при 48 °С для ISSR и 55 °С для IRAP, элонгация 1,5 минуты при 72 °С, и финальный цикл синтеза при температуре 72 °С в течение 5 минут.

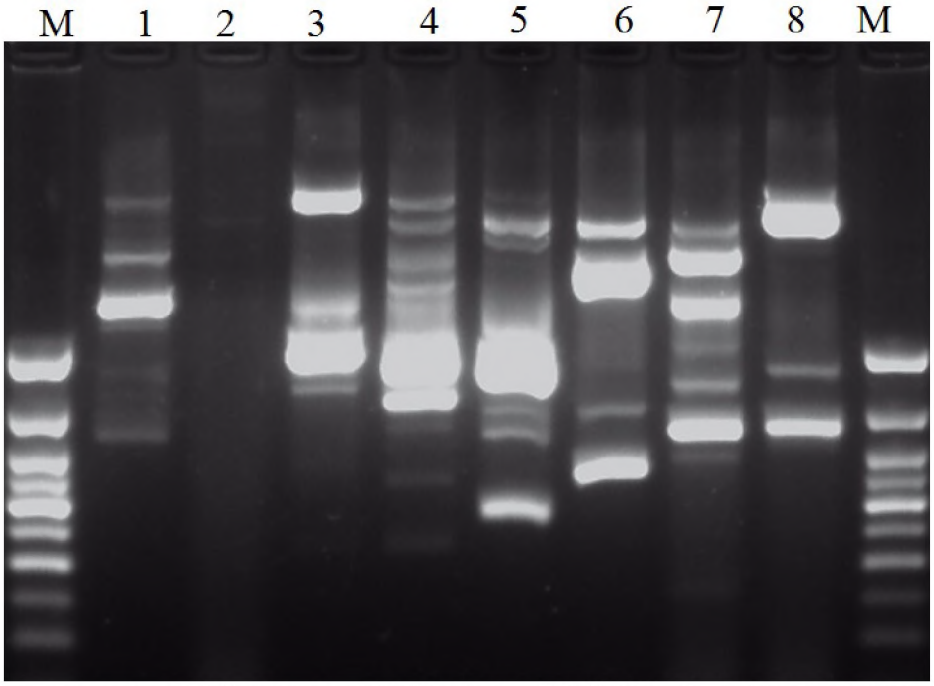
Отбор информативных ISSR и IRAP маркеров. ДНК анализ стабильности генетического материала в череде поколений микроклонально

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 маркеров. Всего в работе на культуре ежевики обыкновенной было апробировано 16 маркера. Сводные результаты апробации 16 маркеров отображены на рисунках 36, 37 и в таблице 12.



Примечания: 1 – Cass1, 2 – Cass2, 3 – DKS007, 4 - DKS014, 5 - DKS019, 6 - DKS024, 7 – UBC 810, 8 –UBC 849; M – маркер веса

Рисунок 36 – Апробация IRAP (1-6) и ISSR (7-8) маркеров на генотипах ежевики обыкновенной



Примечания: 1 – UBC 864, 2 – UBC 868, 3 – UBC 873, 4 – 3A37, 5 -3A39, 6 – 3A59, 7 – WAISSR, 8 – ASSR 29; M – маркер веса

Рисунок 37 – Апробация ISSR (1-8) маркеров на генотипах ежевики обыкновенной

Таблица 12 – Характеристики апробированных ДНК-маркеров

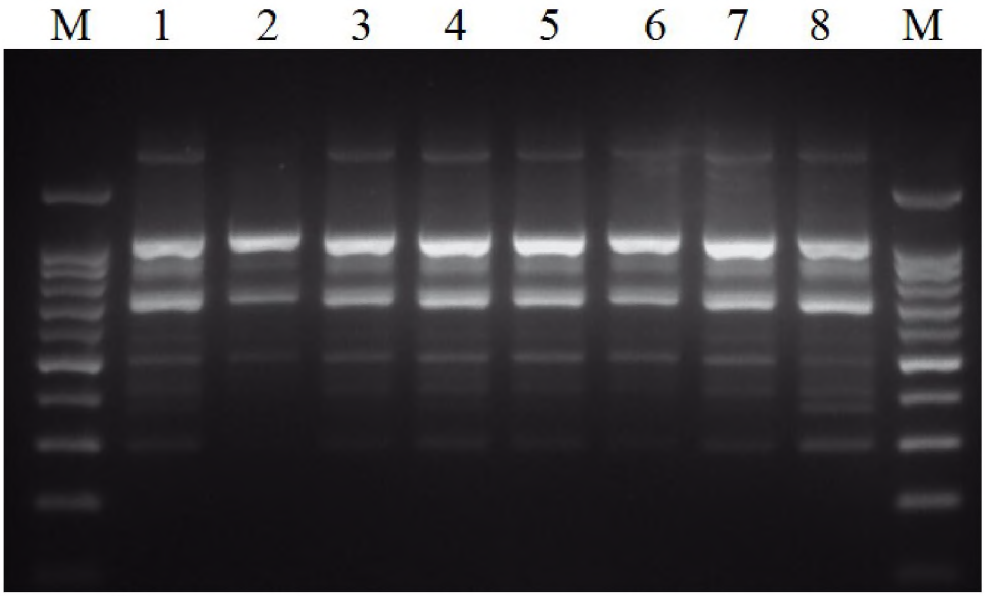
№	Маркер	Количество ДНК-фрагментов
1	Cass1	4
2	Cass2	2
3	DKS007	8
4	DKS014	8
5	DKS019	7
6	DKS024	7
7	UBC 810	10
8	UBC 849	6
9	UBC 864	5
10	UBC 868	-
11	UBC 873	4
12	3A37	11
13	3A39	7
14	3A59	6
15	WAISSR	7
16	ASSR 29	3

Для генотипирования регенерантов ежевики из 16 апробированных маркеров наиболее приоритетными рекомендуются маркеры DKS024 и UBC 810. Также, помимо маркеров UBC 810 и DKS024 в качестве инструментов

оценки генетической стабильности микроклонально размножаемых растений ежевики обыкновенной могут быть использованы ISSR маркеры 3A59, WAISSR и IRAP маркеры DKS007 и DKS014.

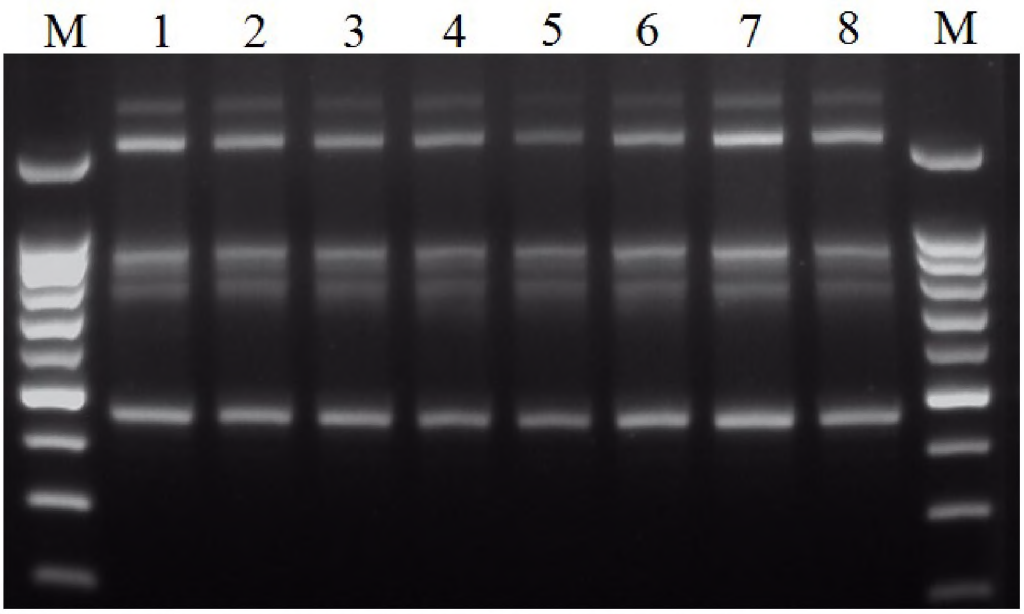
С использованием маркеров DKS024 и UBC 810 осуществлен анализ 7 регенерантов и маточного растения, из которого были получены регенеранты.

По всем маркерам наблюдались идентичные фингерпринты, как между регенерантами, так и у маточного растения. На рисунках 38 и 39 отображены фингерпринты по двум маркерам маточного растения и части регенерантов.



Примечание: 1 – маточное растение, 2-8 - регенеранты

Рисунок 38 – Оценка генетической стабильности регенерантов ежевики с использованием IRAP маркера DKS024



Примечания: 1 – маточное растение, 2-8 – регенеранты

Рисунок 39 – Оценка генетической стабильности регенерантов ежевики с использованием ISSR маркера UBC 810

Таким образом, нами была осуществлена апробация ДНК-маркеров с целью установления наиболее эффективных маркеров для определения генетической стабильности регенерантов. Из отобранных ДНК-маркеров два маркера были задействованы в определении генетической стабильности микроклонально размноженных регенерантов. 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.

Необходимо отметить, что на основе обобщения результатов аналогичного иследования, выполненного в 2022 году на землянике, подтвержденных результатами исследований 2023 года в рамках реализации проекта, подана заявка на объект интеллектуальной собственности: «Способ оценки генетической стабильности растения земляники садовой, полученного in vitro» - заявка на патент на изобретение №2023126641 от 17.10.2023.

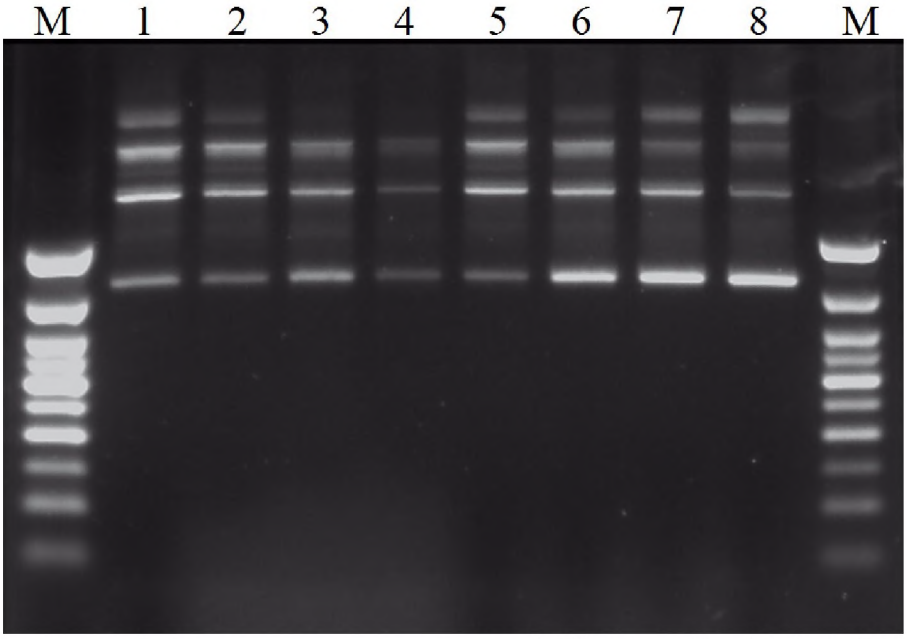
2.3.6 Оптимизация методики контроля генетической стабильности in vitro размножаемом посадочном материале подвоев косточковых

Нами была осуществлена оптимизация методики выявления генетических отклонений в череде поколений микроклонально размножаемых растений по параметрам концентрации компонентов реакционной смеси в процессе ПЦР. В качестве растительного материала был использован микроклонально выращенный подвой ПКСК2, были проанализированы маркеры Cass2 и UBC 864, для которых ранее была выявлена перспективность использования на косточковых культурах. Выполнялись исследования, направленные на оптимизацию экспериментальных параметров для повышения эффективности решения задачи по анализу генетической идентичности матоыных растений и растений-регенерантолв.

Были рассмотрены различные концентрации тотальной ДНК, Taq-полимеразы, праймеров и dNTP. Были использованы следующие температурные режимы ПЦР: 3 минуты предварительной денатурации при температуре 95 °С; последующие 35 циклов: денатурация 35 секунд при 95 °С, отжиг праймеров 2 минута при 48 °С для UBC 864 и 55 °С для Cass2, элонгация 2 минуты при 72 °С, и финальный цикл синтеза при температуре 72 °С в течение 5 минут.

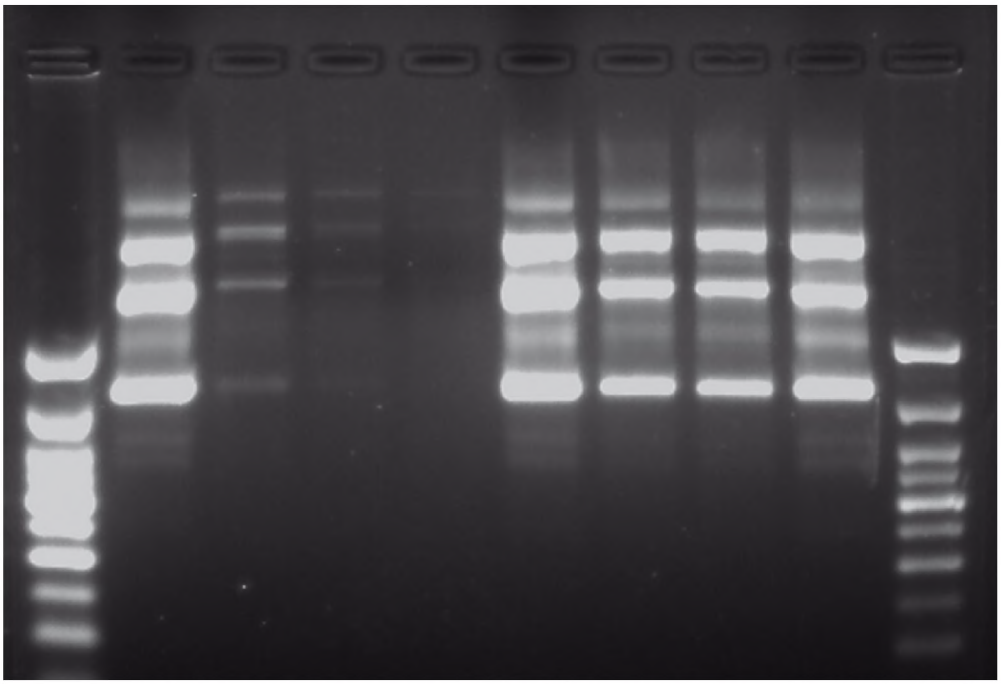
ДНК-фингерпринты полученные при вариации различных параметров представлены на рисунках 40, 41, 42, 43.

Оценивая качество прохождения ПЦР по полученным ДНК-фингерпринтам можно заключить, что генотипирование по маркеру Cass2 менее восприимчиво к вариациям концентрации компонентов реакционной смеси. При гентипировании с использованием маркера UBC 864 наибольшее влияние на качество ПЦР оказывает снижение концентрации фермента. Так же важное значение играет концентрация dNTP, так уже при значениях 0,16 mM заметно ухудшение качества ДНК-фингерпринта, вязаное с исчезновением крупного ДНК-фрагмента.



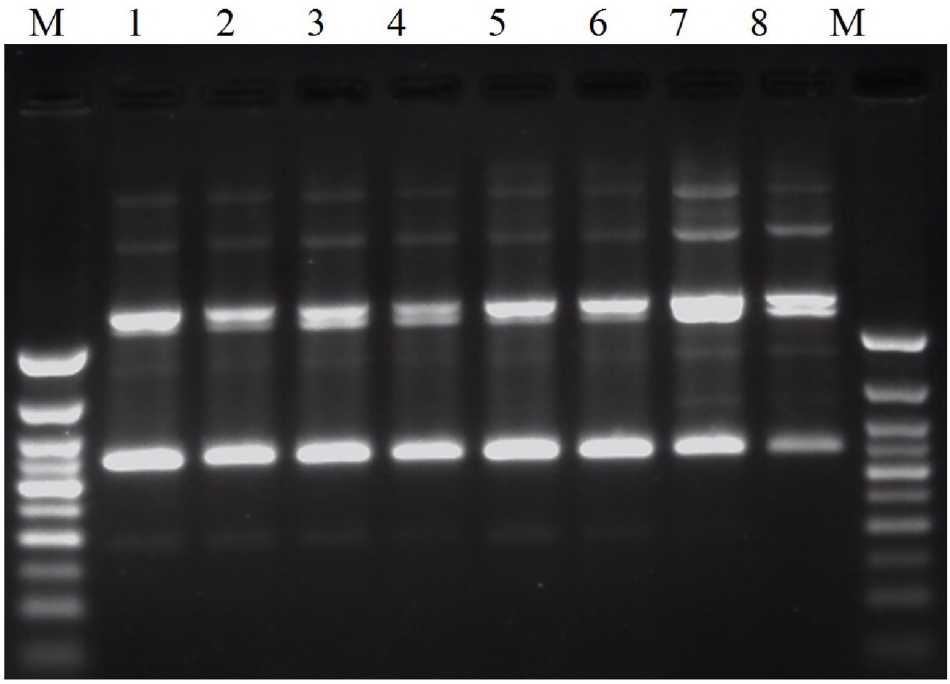
Примечания: 1-4 вариация концентрации dNTP: 1 - 0,32 mM, 2 - 0,24 mM, 3 - 0,16 mM, 4 - 0,08 mM; 5-8 вариация концентрации праймеров: 5 - 0,32 μM, 6 - 0,24 μM, 7 - 0,16 μM, 8 - 0,08 μM

Рисунок 40 – Вариация концентрации праймеров и dNTP при постановке ПЦР с использованием маркера UBC 864 на подвое ПКСК2



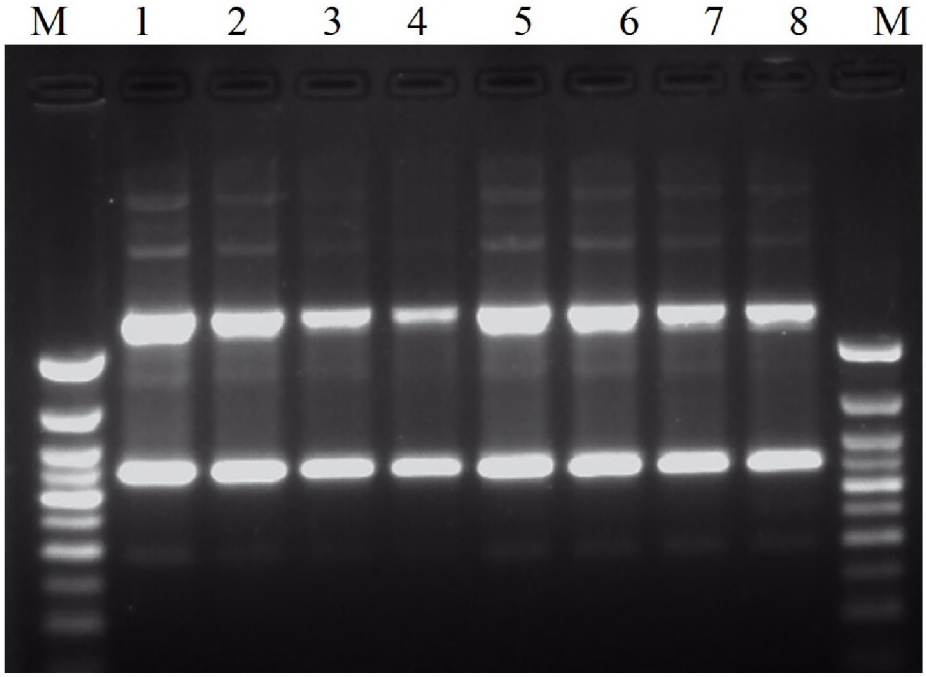
Примечания: 1-4 вариация концентрации Taq-полимеразы: 1 – 2 ед., 2 - 1 ед., 3 - 0,5 ед., 4 - 0,25 ед.; 5-8 вариация концентрации тотальной ДНК: 5 – 80 нг, 6 - 40 нг, 7 - 20 нг, 8 - 10 нг

Рисунок 41 – Вариация концентрации Taq-полимеразы и тотальной ДНК при постановке ПЦР с использованием маркера UBC 864 на подвое ПКСК2



Примечания: 1-4 вариация концентрации dNTP: 1 - 0,32 mM, 2 - 0,24 mM, 3 - 0,16 mM, 4 - 0,08 mM; 5-8 вариация концентрации праймеров: 5 - 0,32 μM, 6 - 0,24 μM, 7 - 0,16 μM, 8 - 0,08 μM

Рисунок 42 – Вариация концентрации праймера и dNTP при постановке ПЦР с использованием маркера Cass2 на подвое ПКСК2



Примечания: 1-4 вариация концентрации Taq-полимеразы: 1 – 2 ед., 2 - 1 ед., 3 - 0,5 ед., 4 - 0,25 ед.; 5-8 вариация концентрации тотальной ДНК: 5 – 80 нг, 6 - 40 нг, 7 - 20 нг, 8 - 10 нг

Рисунок 43 – Вариация концентрации Taq-полимеразы и тотальной ДНК при постановке ПЦР с использованием маркера Cass2 на подвое ПКСК2

Таким образом, исходя из результатов апробации различных концентраций компонентов ПЦР смеси, были осуществлены корректировки протоколов методики контроля генетической стабильности in vitro размножаемом подвойном материале косточковых культур для IRAP и ISSR маркеров. Для IRAP генотипирования косточковых подвоев предлагается снижение концентраций dNTP до 0,08 mM, снижение концентрации праймеров до 0,08 μM без потери качества ПЦР. В свою очередь, для ISSR генотипирования косточковых подвоев предлагается использовать концентрации dNTP 0,32 mM, а концентрации праймеров 0,08 μM без потери качества ПЦР. Полученные сведения позволяют более эффективно использовать компоненты ПЦР смеси для проведения оценки генетической стабильности in vitro.

По результатам исследований подана заявка на изобретение «Способ оценки генетической стабильности растения земляники садовой, полученного *in vitro*».

2.3.7 Методические рекомендации по использованию ДНК-маркерных систем ценных генов в селекционном процессе

ДНК-маркерный анализ, позволяющий напрямую идентифицировать целевые аллели генов хозяйственно-ценных признаков, является важным инструментом для ускорения достижения селекционного результата. Из плодовых культур для яблони достигнуты наибольшие успехи в идентификации генетических детерминант хозяйственно-ценных признаков, а также ДНК-маркеров, сцепленных с ними. В качестве приоритетных признаков в селекции и генетике яблони можно назвать устойчивость к парше, а также признаки качества плодов. Для данных признаков выявлен ряд генов, обеспечивающих высокий уровень вклада в фенотипическое проявление признаков. При этом для них идентифицированы ДНК-маркеры, позволяющие проводить ПЦР-детекцию селекционно-приоритетных аллелей. В таблице 13 приведена информация о наиболее востребованных в решении селекционных

задач генах и ДНК-маркерах, использование которых перспективно для целей их идентификации.

Таблица 13 ДНК-маркеры важных селекционно-ценных генов яблони

Признак	Ген	Маркер	Тип маркера
Устойчивость к парше	*Rvi-6*	VfC1+VfC2	SCAR
		CH-Vf	SSR
Плотность мякоти плодов, лежкоспособность	*Md-PG1; Md-Exp7*	Md-PG110kd	SSR
		Md-Exp7SSR	SSR
Лежкоспособность плодов	*Md-ACS1 Md-ACO1*	Md-ACS1	SCAR-InDel
		Md-ACO1	SCAR-InDel

Как видно из таблицы 13 имеющиеся для целевых селекционно-ценных генов ДНК-маркеры относятся к разным типам. При этом, для наиболее востребованного в настоящее время гена устойчивости яблони к парше *Rvi6*, имеются ДНК-маркеры одновременно двух типов: микросателлитный маркер CH-Vf и SCAR ДНК-маркер (VfC1+VfC2). Разные типы ДНК-маркеров обусловливают различия в методических подходах к идентификации аллелей целевых генов. Это обусловлено, в первую очередь в разнице размеров ПЦР-продуктов, получаемых для разных аллелей гена. Так, при использовании SCAR-маркеров генов *Rvi-6, Md-ACS1*и *Md-ACO1* возможно использование агарозного геля для электрофоретического разделения продуктов ПЦР, в то время как для эффективной детекции аллелей SSR-маркеров генов *Md-PG1* и *Md-Exp7* необходимо выполнение электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле, в том числе с использованием генетических анализаторов типа ABIprism3130 и Нанофор 05.

Наряду с методическими различиями в детекции продуктов амплификации, необходим тщательный подбор оптимальных условия непосредственно полимеразной цепной реакции, позволяющих получать максимальный уровень амплификации целевых продуктов при минимальном «выходе» неспецифически амплифицированных фрагментов. Данный аспект особенно важен при разработке методов мультиплексной ДНК-маркерной

идентификации, когда в одной реакции происходит детекция аллелей двух или более генов одновременно.

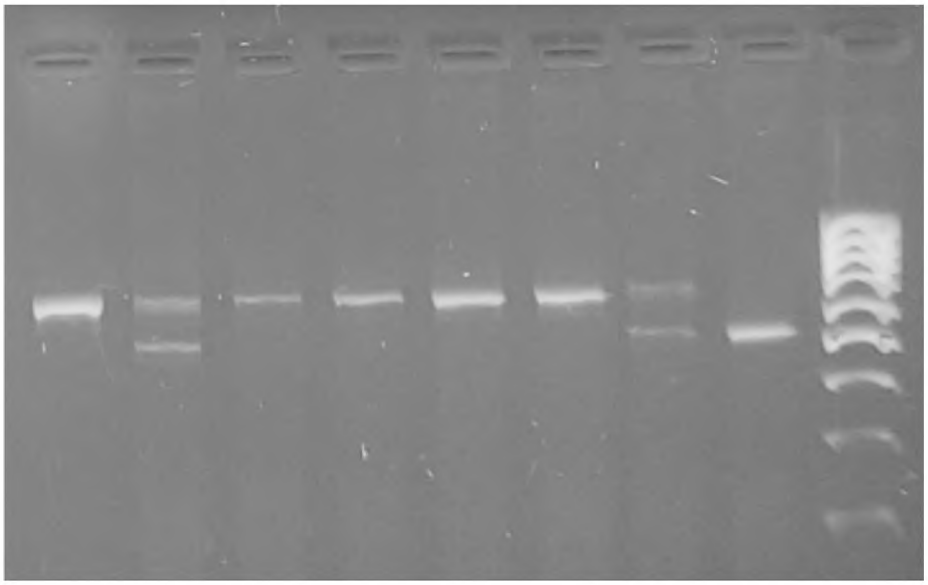
Нами выполнен комплекс научных исследований по ДНК-маркерной идентификации генов *Rvi-6*, *Md-PG1*; *Md-Exp7*, *Md-ACS1* и *Md-ACO1*, по результатам которых может быть рекомендован ряд элементов методологии, позволяющих эффективно проводить детекцию искомых генов.

Гены *Md-ACS1* и *Md-ACO1*.

Условия ПЦР: при проведении ПЦР в общем объеме 25 мкл используются следующие концентрации компонентов реакционной смеси: 0,05 мМ дезоксинуклеотидтрифосфатов, 0,3 мкМ каждого праймера, 2,5 мкл ПЦР-буфера, 1 ед. акт. ДНК-полимеразы, 50 нг ДНК. Амплификация проводится по следующей программе: 2 мин при 94°С; следующие 35 циклов: 45 с при 95°С, 50 с при 58°С для *Md-ACS1* и 65°С для *Md-ACO1* и 2 мин. элонгация при 72°С; финальный цикл синтеза 5 мин при 72°С, финальный цикл синтеза 5 мин при 72°С.

С учетом размеров целевых амплифицируемых фрагментов: (аллель Md-ACS1-1 – 489 пар оснований, аллель Md-ACS1-2 – 655 пар оснований; аллель Md-ACO1-1 и Md-ACO1-2 – 525 и 587 пар оснований соответственно) электрофоретический анализ целесообразно проводить в 1,5% агарозном геле. Рекомендуемое напряжение 150V, время электрофореза 45 минут. Для примера, на рисунке 44 приведены результаты электрофореза продуктов ПЦР по ДНК-маркеру гена *Md-ACS1*.

У образцов, представленных на рисунке 44, идентифицируются все три возможных аллельных варианта: Md-ACS1-2/2 (образцы 1, 3, 4, 5, 6), Md-ACS1-1/2 (образцы 2, 7) и Md-ACS1-1/1 (образец 8). Таким образом оптимальные экспериментальные параметры позволяют идентифицировать все аллельные варианты искомого гена.



1 2 3 4 5 6 7 8 M

Примечания: 1- сорт контроль Фуджи, 2-8 исследуемые образцы яблони, М – маркер молекулярной массы ДНК

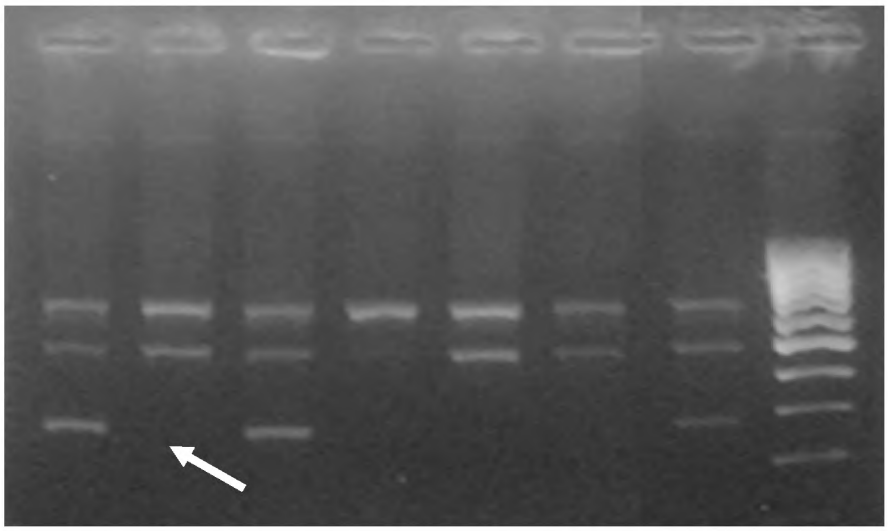
Рисунок 44 – Электрофоретический анализ продуктов ПЦР по ДНК-маркеру гена *Md-ACS1*

Ген *Rvi-6* (молекулярный маркер VfC1+VfC2)

Условия ПЦР: Концентрации компонентов реакционной смеси (идентичные для ДНК-маркеров целевых генов): 0,05 мМ дезоксинуклеотидтрифосфатов, 0,3 мкМ каждого праймера, 2,5 мкл ПЦР-буфера и 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (ООО «СибЭнзим»), 50 нг ДНК. ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл. Электрофоретический анализ целесообразно проводить в 2% агарозном геле. Рекомендуемое напряжение 150V, время электрофореза 45 минут. На рисунке 43 приведены результаты электрофореза продуктов ПЦР по ДНК-маркеру VfC1+VfC2.

У образцов, представленных на рисунке 45, выявляется амплификация, соответствующая как наличию, так и отсутствию доминантного аллеля гена устойчивости к парше *Rvi6*. У сорта контроля Флорина (образец №1), а также у образцов №3 и №7 идентифицируется ПЦР-продукт (отмечен стрелкой), специфичный доминантному аллелю данного гена, в то время как у образцов 2, 4, 5 и 6 данный ПЦР-фрагмент отсутствует, т.к. они не несут доминантного аллеля гена и являются восприимчивыми к парше. Оптимальные параметры

позволяют безошибочно идентифицировать целевой аллель гена *Rvi6* при использовании маркера VfC1+VfC2.



1 2 3 4 5 6 7 M

Примечания: 1- сорт контроль Флорина, 2-7 исследуемые образцы яблони, М – маркер молекулярной массы ДНК

Рисунок 45 – Электрофоретический анализ продуктов ПЦР по ДНК-маркеру VfC1+VfC2 гена *Rvi6*

Гены *Md-PG1* и *Md-Exp7*

При использовании ДНК-маркеров Md-PG110kd и Md-Exp7SSR амплифицируются продукты ПЦР в диапазонах размеров 190-214 пар нуклеотидов (Md-Exp7-SSR) и 296-308 пар нуклеотидов (Md-PG110kd). Учитывая, что диапазоны размеров не перекрываются нами предложено использование мультиплексной ПЦР для идентификации аллелей по данным ДНК-маркерам.

Условия мультиплексной ПЦР: реакционная смесь включала: 20 нг ДНК, 1,5 мМ dNTPs, 10 пМ каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы и 2,5 мМ 10× стандартного ПЦР-буфера, объем ПЦР смеси 25 мкл. ПЦР программа: 94 °С – 150 с, 32 цикла: 60 °С – 45 с, 72 °С – 60 с, 94 °С – 30 с; 1 цикл 72 °С – 10 мин. Электрофоретический анализ амплифицированных продуктов проводится на автоматическом генетическом анализаторе типа Нанофор 05.

На рисунке 46 приведены результаты фрагментного анализа генетическом анализаторе Нанофор 05.

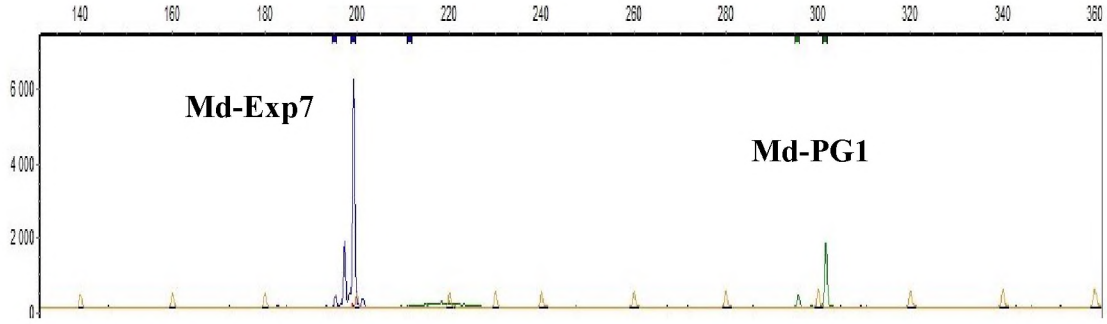


Рисунок 46 – Фрагментный анализ продуктов мультиплексной ПЦР по ДНК-маркерам генов *Md-PG1* и *Md-Exp7*

Как видно из рисунка 44 использование мультиплексной ПЦР с оптимальными параметрами позволяет проводить идентификацию аллелей одновременно двух ДНК-маркеров, сцепленных с искомыми генами *Md-PG1* и *Md-Exp7*.

Учитывая тот факт, что признаки качества плодов и устойчивость к парше являются одними из наиболее приоритетных признаков в селекции яблони, разработка методов, направленных на ускорение детекции генетических детерминант этих признаков, является важным вопросом. В связи с этим, нами, на основе имеющихся экспериментальных разработок, рекомендован метод мультиплексной ПЦР-идентификации генов, детерминирующих плотность мякоти плодов яблони - *Md-PG1* и *Md-Exp7*, а также гена устойчивости яблони к парше *Rvi6*. Это возможно с учетом того, что для данного гена, наряду со SCAR ДНК-маркером VfC1+VfC2 имеется также микросателлитный ДНК-маркер CH-Vf и, что немаловажно, размер ПЦР-продуктов, амплифицируемых с его использованием (130-170 пар нуклеотидов), не перекрывается с диапазонами размеров по ДНК-маркерам генов *Md-PG1* и *Md-Exp7*.

Для эффективной мультиплексной ПЦР-идентификации рекомендуются следующие условия ПЦР: состав ПЦР-смеси в объеме 25 мкл включал: 50 нг ДНК, 0,05 мМ dNTPs, 0,5 мкМ каждого праймера (для ДНК-маркеров CH-VF1

и Md-PG1- SSR10kd) и 0,3 мкМ (для праймеров ДНК-маркера Md-Exp7-SSR), 2,5 мкл 10xSE ПЦР-буфера (ООО «Сибэнзим»), 1 единица активности Taq-ДНК полимеразы, в общем объеме реакционной смеси 25 мкл. Постановку ПЦР проводили по следующей программе: 1 мин. при 94 °С для начальной денатурации; следующие 35 циклов: денатурация 30 сек. при 94 °С; 30 сек. отжиг праймеров 30 секунд при 58 °С; синтез 30 сек. при 72 °С. Финальный цикл синтеза при 72 °С - 5 мин.

Оптимальные условия ПЦР позволяют получать амплификацию целевых продуктов реакции одновременно для всех трех искомых генов. На рисунке 47 приведены результаты фрагментного анализа продуктов мультиплексной ПЦР на автоматическом генетическом анализаторе Нанофор 05.

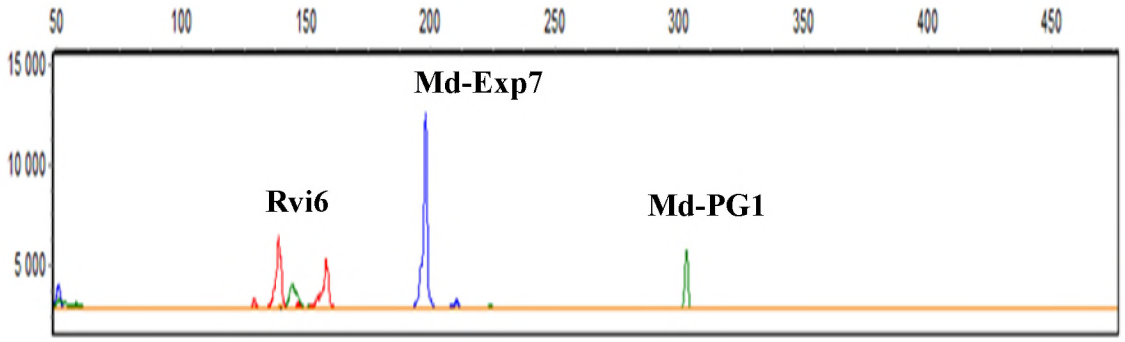


Рисунок 47 – Фрагментный анализ продуктов мультиплексной ПЦР по ДНК-маркерам генов *Md-PG1*, *Md-Exp7* и *Rvi6*

Из результатов фрагментного анализа, представленных на рисунке 45 видно, что оптимальные параметры реакции обеспечивают легко интерпретируемые результаты. Это дает возможность проводить достоверную идентификацию целевых фрагментов одновременно по всем трем генам. Исходя из полученных результатов можно сделать заключение об эффективности использования метода мультиплексной идентификации генов яблони *Rvi6*, *Md-Exp7* и *Md-PG1*. Он дает возможность идентифицировать аллели искомых генов и может быть использован для ускоренного маркер-опосредованного отбора по целевым генам. Одним из важных преимуществ,

наряду с ускорением анализа, является также существенное снижение себестоимости работ.

2.3.8 Разработка методики генотипирования сортов и идентификации генов хозяйственно-ценных признаков яблони с помощью ДНК-маркирования

Для успешного решения задач селекции и питомниководства важным фактором является наличие методов, позволяющих проводить ускоренную идентификацию сортов (гибридных форм), а также оценивать их по хозяйственно-ценным признакам, являющихся приоритетными в конкретных выполняемых селекционных программах. В связи с этим, вопрос разработки методов, позволяющих при минимальных затратах времени проводить такую оценку, является актуальным. Одно из наиболее перспективных направлений в данном аспекте это использование ДНК-маркеров, которые позволяют проводить идентификацию генотипов (сортов, гибридов) а также выявление селекционно-ценных аллелей генов хозяйственно-значимых признаков.

В связи с этим нами была поставлена задача разработки методики, позволяющей проводить ДНК-паспортизацию образцов и одновременно проводить детекцию аллелей генов, детерминирующих хозяйственно-ценные признаки. Для этих целей были отобраны микросателлитные ДНК-маркеры, проявившие высокий уровень полиморфизма при изучении как отечественного, так и мирового генофонда яблони (в соответствии с данными из научной литературы и результатами собственных исследований). Также использовали два микросателлитных ДНК-маркера, сцепленных с генами Md-Exp7 и Md-PG1, которые контролируют признаки, определяющие плотность мякоти плодов яблони и ее сохранение в процесс хранения.

В целях повышения экономической эффективности были разработаны два мультиплексных набора, позволяющих суммарно вести анализ одновременно по восьми микросателлитным ДНК-маркерам. Таким образом, имеется возможность, при постановке двух реакций, получить данные по

восьми микросателлитным ДНК-маркерам. Комбинации ДНК-маркеров в мультиплексных наборах были подобраны таким образом, чтобы их диапазоны амплифицируемых фрагментов не перекрывались. Это необходимое условие для безошибочной детекции целевых фрагментов. В таблице 14 приведена информация о мультиплексных наборах: ДНК-маркеры, входящие в наборы, диапазон длин амплифицируемых продуктов ПЦР, наименование ДНК-маркера и тип флуорохрома, специфичный для каждого из маркеров. Несмотря на одинаковый тип флуоресцентного красителя у таких маркеров как MdPG1SSR10kd и CH02c11 (мультиплекс №1) и у маркеров Md-Exp7-SSR и CH01H01 (мультиплекс №2) существенные различия в диапазонах размеров амплифицируемых фрагментов обеспечивают отсутствие перекрывания сигналов флуоресценции и позволяют безошибочно идентифицировать целевые продукты реакции.

Таблица 14 мультиплексные наборы микросателлитных ДНК-маркеров

Мультиплексный набор	ДНК-маркер	Диапазон размером амплифицируемых фрагментов (п.н.)	Флуорохром
I	$MdPG1SSR_{10kd}$	296-308	R6G
	CH02c11	206-237	R6G
	CH01f02	171-208	TAMRA
	CH03a04	86-115	FAM
II	Md-Exp7-SSR	196-214	FAM
	CH01h10	93-113	ROX
	GD147	130-150	R6G
	CH01H01	116-132	FAM

Для получения максимального уровня амплификации целевых продуктов и снижения неспецифических амплификатор, экспериментальным путем были подобраны оптимальные условия ПЦР, которые приведены ниже.

ПЦР-смесь включала: 3 мкл 5-кратного реакционного буфера для Taq ДНК-полимеразы, 1 единица активности Taq ДНК-полимеразы, по 1,5 мкл каждого праймера (3,75 мМ), 50-70 нг ДНК, 2 мкл dNTP (2 Мм), ddH2O до 25 мкл конечного объема.

Температурно-временные параметры ПЦР: начальная денатурация 5 минут при 95 °С; далее 38 циклов: денатурация 30 секунд-при 95 °С, отжиг праймеров 50 секунд при 58 °С, элонгация 1 минута при 72 °С; финальная элонгация при 72 °С.

Подготовка проб для электрофоретического анализа на генетическом анализаторе Нанофор 05: Смесь для анализа размера продуктов включала: 9,8 мкл деионизованного формамида, 0,2 мкл маркера молекулярной массы ДНК СД-450 и 1 мкл разбавленного в 20 раз продукта ПЦР.

Условия электрофореза: Преформез: 180 секунд, 15 кВ. Время и напряжение электрокинетической инжекции: 6 секунд 1,8 кВ, время и напряжение электрофореза: 1400 секунд, 12,2 кВ (начиная от 1 кВ-ступенчатое изменение напряжение). Тип полимера - ПДМА 4.

Оптимальные условия ПЦР и электрофореза позволили получить легко интерпретируемы результаты по всем микросателлитным ДНК-маркерам, входящим в мультиплексные наборы (рис. 48, 49).

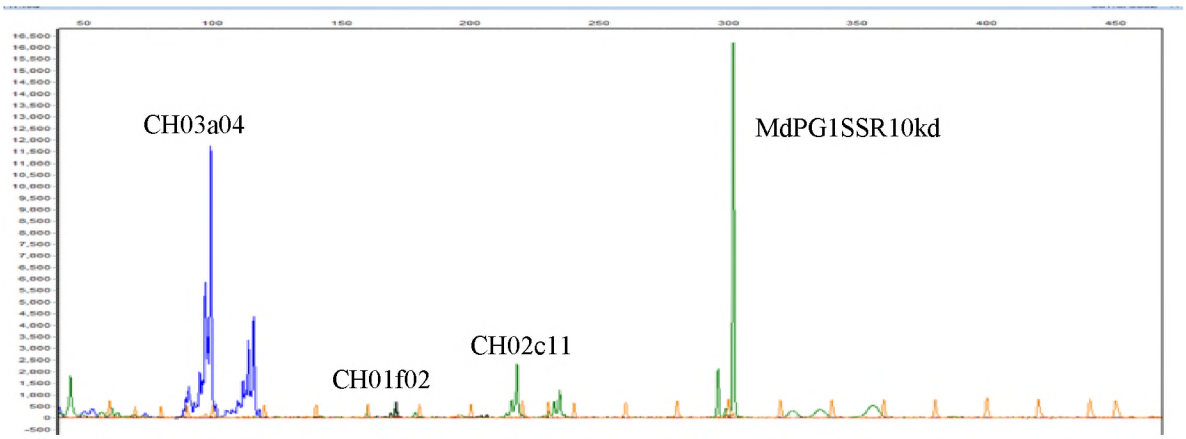


Рисунок 48 – Результаты фрагментного анализа по мультиплексному набору №1

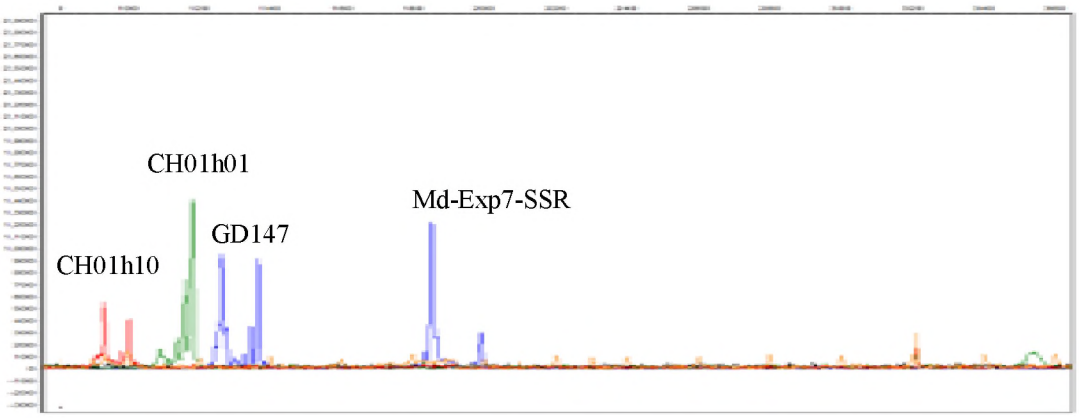


Рисунок 49 – Результаты фрагментного анализа по мультиплексному набору №2

Как видно из результатов фрагментного анализа продуктов мультиплексной ПЦР проведенной одновременно по четырем микросателлитным ДНК-маркерам в каждом мультиплекнсом наборе, продукты амплификации по каждому из маркеров визуализируются. Несмотря на относительно низкую высоту пика флуоресценции по маркеру CH01f02 (рис. 48), результаты фрагментного анализа достоверно интерпретируются. Также, учитывая то, программа GeneMarker, в которой проводится анализ полученных данных и определение размеров продуктов реакции, имеет функцию масштабирования, вопрос детекции относительно низких пиков эффективно решается.

Таким образом, выполненные исследования позволили разработать методику генотипирования сортов и идентификации генов хозяйственно-ценных признаков яблони с помощью ДНК-маркирования. Она позволяет в сжатые временные сроки, при проведении двух реакций для исследуемого образца получать ДНК-паспорт, включающий восемь микросателлитных ДНК-маркеров. При этом из используемых восьми SSR-маркеров два являются сцепленными с генами, контролирующими селекционно-важный признак. Таким образом имеется возможность наряду с ДНК-паспортом образца получить данные об аллелях генов целевых признаков, что важно при решении селекционных задач. По результатам работы была разработана етодика «Методика генотипирования сортов и идентификации генов

хозяйственно-ценных признаков яблони с помощью ДНК-маркирования» (СТО 00668034-168-2023).

2.3.9 Усовершенствование методов идентификации вирусов и фитоплазм семечковых плодовых культур

Усовершенствованный метод идентификации вирусов семечковых плодовых культур

ПЦР-технологии широко используются для детекции вироидов, вирусов, бактерий, фитоплазм, грибов и других микроорганизмов, поражающих различные виды сельскохозяйственных растений. ПЦР является самым чувствительным среди всех методов определения таких биологических объектов. Его важной особенностью является строго избирательная амплификация только целевой последовательности нуклеотидов.

Для разработки метода детекции были использованы ранее полученные многолетние собственные и литературные данные, дополненные результатами мониторинга в 2023 году промышленных насаждений яблони Краснодарского на наличие вирусной и фитоплазменной инфекции.

Для идентификации вирусов семечковых культур ранее Menzel et al. (2002) был предложен метод ПЦР позволяющий обнаруживать четырех вирусов яблони домашней. Метод основан на использовании обратной транскрипции (ОТ) и ПЦР со специфическими молекулярными маркерами, и последующего детектирования продуктов ПЦР с применением горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле.

В текущем году нами был апробирован этот метод для идентификации двух наиболее встречаемых в регионе вирусов яблони: ямчатости древесины яблони (Apple stem pitting virus – ASPV) и мозаики яблони (Apple mosaic virus – ApMV) и предложено его улучшение.

Ниже представлена классическая методика анализа на вирусоносительство.

Для проведения успешной обратной транскрипции и ПЦР необходимо выделение высококачественной матрицы из изучаемого растительного образца.

В классическом ПЦР для проведения реакции должен быть получен препарат ДНК, к которому предъявляются такие требования, как достаточная чистота и необходимое количество. Под чистотой препарата ДНК понимают отсутствие в нём мешающих проведению реакции веществ, например, полифенолов, жиров или высокомолекулярных углеводов или отсутствие не целевой ДНК. Иногда получение чистого препарата ДНК становится существенной проблемой, например, для организмов имеющих большое количество запасных веществ, к таковым относятся также и растения. Однако, большинство патогенных вирусов растений представляют собой РНК-содержащие микроорганизмы, в связи с чем необходимо получение чистого и не деградированного препарата РНК, который в дальнейшем используется в реакции ОТ для получения копийной ДНК (кДНК).

Для получения высококачественного препарата вирусной рибонуклеиновой кислоты был использован ранее предложенный нами метод выделения нуклеиновых кислот (Насонов и др., 2022). Этот способ выделения рибонуклеиновых кислот из листьев, кожицы плодов и корней различных плодовых культур, включал лизис клеточных мембран и экстракцию НК из клеток, в буферном солевом растворе, содержащем 2 % SDS, 1 % 2-меркаптаэтанол и 2 % PVP 40, осаждение НК изопропанолом и промывку в солевом буферном растворе, содержащем ацетат натрия и 96%-м этаноле, с последующим селективным осаждением РНК в растворе LiCl/мочевина в конечной концентрации 4 М. Его использование показало хорошие результаты при выделении молекул РНК из листьев яблони.

Для проведения ОТ были подобраны и оптимизированы следующие условия реакции, которую проводили в два этапа.

На первом этапе производится денатурация вторичных структур праймеров и матрицы тотальной РНК.

1) Предварительная денатурация. В пластиковую пробирку объёмом 1 мл из расчёта на необходимое количество образцов, внести следующие компоненты в указанных ниже пропорциях и порядке (из расчёта на 1 реакцию).

РНК (мкл) 3

Праймеры (соотношение Oligo(dT)15 / Random (dN)10 - 1:1) (мкл) 2

H2O (мкл) 4

Сумма (мкл) 9

В зависимости от концентрации матрицы РНК и целей обратной транскрипции, возможна корректировка состава и пропорций реакционной смеси.

Денатурацию смеси проводили при 70 °С в течении 5 мин. После чего смесь помещали в морозильную камеру при – 20 °С на 3 мин.

2) Реакция обратной транскрипции.

К предварительно денатурированной реакционной смеси для ОТ (из расчёта на 1 реакцию) добавляли следующие компоненты:

5х буфер (мкл) 4

dNTP (мкл) 2

DTT (мкл) 2

MMLV rt-sa (мкл) 1

H2O (мкл) 2

Сумма (мкл) 11

Реакция проводится термоциклере в следующем режиме: 43 °С в течении 40 мин, 94 °С в течении 3 мин.

При работе с сложными матрицами или крупными РНК транскриптами возможно повышение температуры до 45 – 50 °С и увеличение времени инкубации до 50 – 60 мин.

Полученный препарат кДНК используется для последующей постановки ПЦР.

Далее проводили полимеразную цепную реакцию с использованием вирусспецифических молекулярных маркеров. Последовательности праймерных пар молекулярных маркеров были отобраны на основе анализа литературных данных. Для контроля выделения РНК в анализ включен внутренний контроль nad5, основанный на праймерах, разработанных Menzel et al. (2002) для амплификации мРНК из митохондрий растений (митохондриальный ген NADH-дегидрогеназы). Их характеристики приведены в таблице 15.

Таблица 15 – Праймерные пары для идентификации вирусов яблони

Наименование вируса/сокраще-ние	Размер целевого продукта п.о.	Элемент праймерной пары	Праймерная пара	Температура отжига
Apple stem pitting virus **(ASPV)**	370	F	ATGTCTGGAACCTCA TGCTGCAA	62 °C
		R	TTGGGATCAACTTTA CTAAAAAGCATAA	
Apple mosaic virus **(ApMV)**	262	F	ATCCGAGTGAACAG TCTATCCTCTAA	62 °C
		R	GTAACTCACTCGTTA TCACGTACAA	
Внутренний контроль - nad5	181	F	GATGCTTCTTGGGGC TTCTTGTT	60 °C
		R	CTCCAGTCACCAACA TTGGCATAA	

ПЦР проводили на приборе Амплификатор Applied Biosystems MiniAmp. Для проведения ПЦР были использованы следующие параметры реакции.

Состав реакционной смеси ПЦР содержал следующие компоненты в указанных ниже пропорциях и порядке (из расчёта на 1 реакцию):

Буфер (мкл) 2,5

dNTP (мкл) 4

кДНК (мкл) 3

Taq (мкл) 0,2

Primer F (мкл) 2

Primer R (мкл) 2

H2O (мкл) 11,3

Сумма (мкл) 25

При этом было отмечено, что концентрация рабочего раствора праймеров может варьировать в зависимости от эффективности применяемой полимеразы. Рекомендуемая концентрация 4 пкм/мкл.

Матрица кДНК вносилась непосредственно в пробирку объёмом 0,2 мкл.

Амплификация проводилась в термоциклере в следующих режимах: 95 °С в течении 15 мин, 95 °С в течении 15 сек, n °С в течении 30 сек, 72 °С в течении 60 сек – 40–45 циклов с финальной элонгацией при 72 °С в течении 10 мин.

Для проведения амплификации использовали праймерные пары специфичные к целевому фрагменту генома вируса (таблица).

Качество амплификации подтверждали с применением праймерной пары внутреннего контроля, в отдельной пробирке.

Для регистрации результатов ПЦР использовали горизонтальный электрофорез в 2 % агарозном геле с использованием Трис-ацетатного (ТАЕ) или Трис-боратного (ТБЕ) буферного раствора. Электрофорез проводится при следующих параметрах: сила электрического тока 400 мА, 120 В и мощности 80,0 в течении 45 мин.

В зависимости от необходимой степени разделения, размера фрагментов и концентрации агарозы в геле, возможно повышение силы электрического тока и мощности.

Визуализация продуктов ПЦР на электрофореграмме осуществляют с использованием УФ-трансиллюминатора.

Положительным результатом анализа на присутствие вируса в растительном материале считалось наличие специфической электрофоретической полосы на электрофореграмме.

Классический метод позволял эффективно определять данные вирусы в симптомированном материале. Однако недостатком данного метода является относительная его времязатратность.

Нами была предложена модификация данного метода, при которой происходило сокращение проведения анализа на 1 час. В модифицированном варианте анализ результатов ПЦР проводили не путем постановки электрофореза в агарозном геле, а детекцией в реальном времени при окраске красителем SYBR® Green на приборе QuantStudio TM 5 System.

Таким образом цепная полимеразная реакция и детекция её продуктов проходила одномоментно, что экономит время анализа.

Изменения в протоколе классической методики описанной выше касались этапа подготовки реакционной смеси для ПЦР, в которую, в данном варианте метода, необходимо добавить 0,5 мкл красителя SYBR® Green. Состав реакционной смеси ПЦР в данном случае содержал следующие компоненты в указанных ниже пропорциях и порядке (из расчёта на 1 реакцию):

Буфер (мкл) 2,5
dNTP (мкл) 4
кДНК (мкл) 3
Taq (мкл) 0,2
Primer F (мкл) 2
Primer R (мкл) 2
SYBR® Green 0,5
H2O (мкл) 10,8
Сумма (мкл) 25

Анализ симптомированного растительного материала с использованием улучшенного метода, позволило детектировать наличие вирусов в нём. На рисунках 50, 51 показано типичный график амплификации, показывающий наличие вирусов яблони в исследуемых образцах.

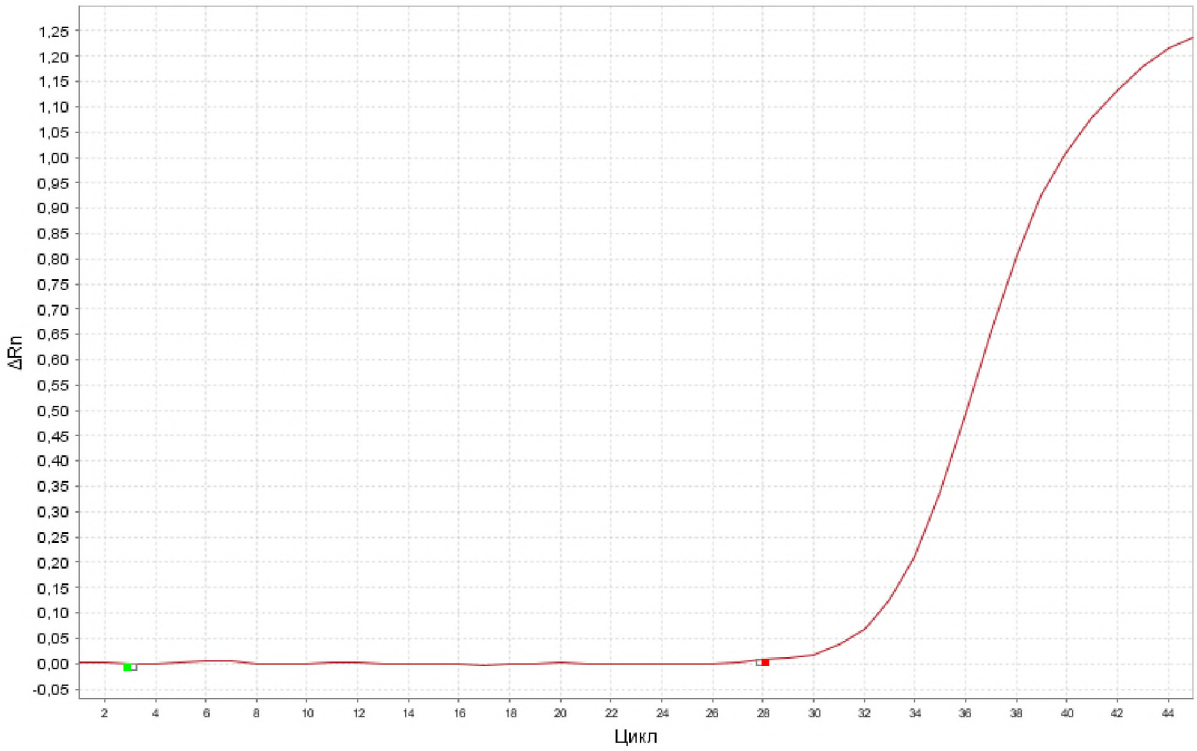


Рисунок 50 – График амплификации ПЦР продукта, показывающего наличие вируса ямчатости древесины яблони (Apple stem pitting virus – ASPV)

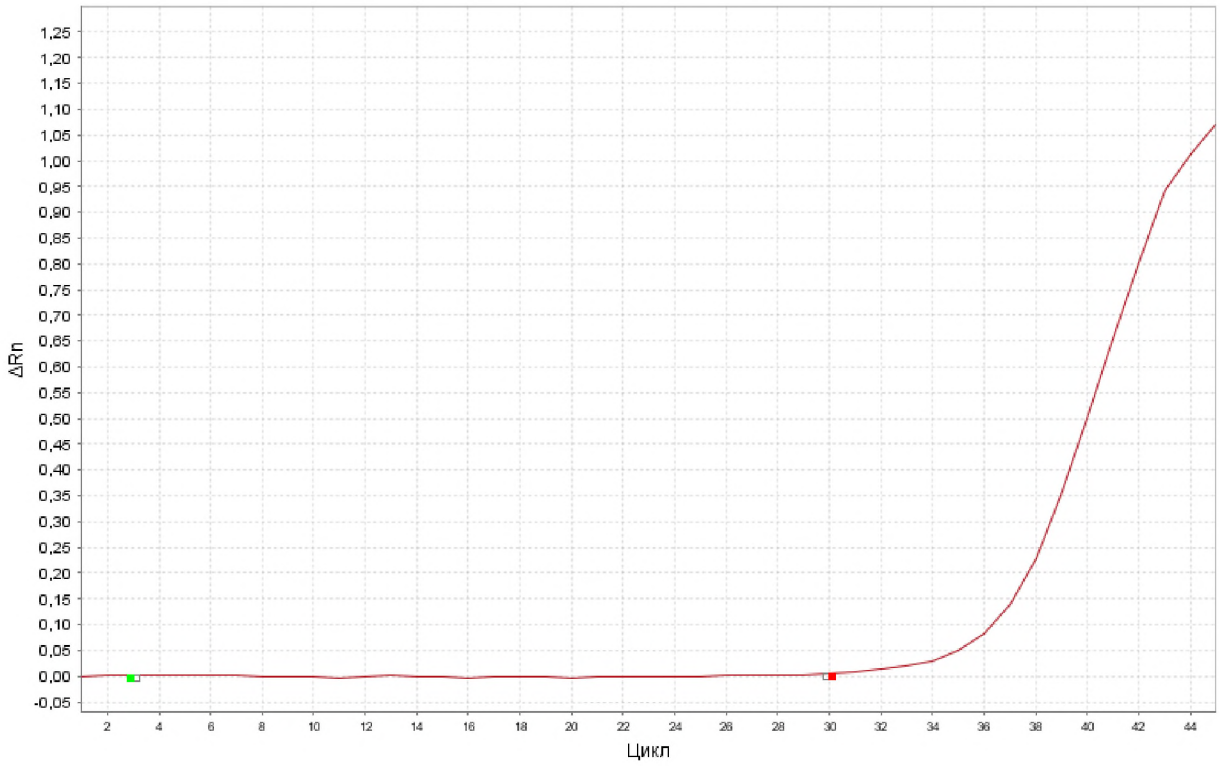


Рисунок 51 – График амплификации ПЦР продукта, показывающего наличие вируса мозаики яблони (Apple mosaic virus – ApMV)

В целом, предложенный подход, характеризуется относительно низкой себестоимостью в реализации и меньшей времязатратностью.

На основании выполненных исследований была разработана технология «Методика идентификации вирусов яблони методом ПЦР» (СТО 00668034-166-2023). Кроме того, на основе результатов исследований, выполненных в 2022 году, рамках реализации проекта, разработана методика: «Методика идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 3 (Grapevine leafroll-associated virus 3) с помощью ПЦР в реальном времени» (СТО 0668034-167-2023).

Усовершенствование метода идентификации фитоплазм семечковых плодовых культур

Существенно опасными микроорганизмами для семечковых плодовых культур являются фитоплазмы. Значимые потери в производстве плодов в мире, обусловлены фитоплазмозами у древесных садовых культур, которые вызывают патогены из группы Apple proliferation (16SrX). В этой группе, в числе прочих, присутствуют также некультивируемые бактерии: Candidatus Phytoplasma mali и Candidatus Phytoplasma pyri, вызывающие пролиферацию яблони и истощение груши. Эти виды входят в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза (ЕАЭС). Хотя эти патогены составляют одну категорию микроорганизмов, для них характерны свои растения-хозяева, переносчики, и особенности развития симптомов. В ряде работ было показано, что использование классической ПЦР позволяет идентифицировать возбудителей фитоплазмозов в симптомированных образцах плодовых растений [65].

Для успешной реализации подхода классической ПЦР необходим тщательный подбор как способа выделения целевой молекулы ДНК, так и условий проведения реакции с использованием конкретных праймерных пар.

В текущем году была проведена апробация метода полимеразной цепной реакции в реальном времени детекции двух фитоплазм семечковых:

Candidatus Phytoplasma mali, вызывающую симптомы пролиферации яблони и Candidatus Phytoplasma pyri – истощения груши. Для молекулярно-генетического анализа использовали коммерческий набор НПК «Синтол» Фитоскрин «Candidatus Phytoplasma mali-PB» и Фитоскрин «Candidatus Phytoplasma pyri-PB» для оценки этих патогенных вирусов. ДНК образца для проведения анализа выделяли двумя способами: рекомендуемым фирмой производителем НПК «Синтол» коммерческим набором Фитосорб и ЦТАБ-методом [66].

Проведённые исследования показали, что для получения однозначного результата при молекулярно-генетической идентификации наборами НПК «Синтол» критически важным, является получения препарата ДНК высокого качества. Однако препараты ДНК, полученные различными методами, имели различные показатели качества. Препарат нуклеиновых кислот, выделенный набором Фитосорб, характеризовался более низким качеством по спектрофотометрическим показателям (особенно для зрелых листьев): количественный выход целевых молекул и соотношение 260/230 и 260/280 в сравнении с препаратом полученным методом ЦТАБ (табл. 16). Наиболее критичным является существенно низкое значение соотношения 260/280, в препарате, полученном «фирменным» набором, так как оно показывает вклад в поглощение ДНК таких молекул как белки и полифенольные соединения. Эти вещества зачастую приводят к полному или частичному ингибированию ПЦР и соответственно к искажению результатов реакции.

Таблица 16 – Спектрофотометрические показатели препарата ДНК выделенного из симптомированных образцов с использованием двух методов

Название метода	Концентрация ДНК, нг/мкл	260/230	260/280
Фитосорб	93,11 – 115,55	1,33	0,90
ЦТАБ	320,02 – 551,15	2,1	1,85

В дальнейшем для проведения ПЦР реакции была использован препарат ДНК, полученный методом ЦТАБ. На рисунке показан типичный профиль нарастания синтеза целевого фрагмента, при проведении ПЦР в реальном времени, показывающего наличие генетического материала Candidatus Phytoplasma mali в образце яблони домашней (рис. 52).

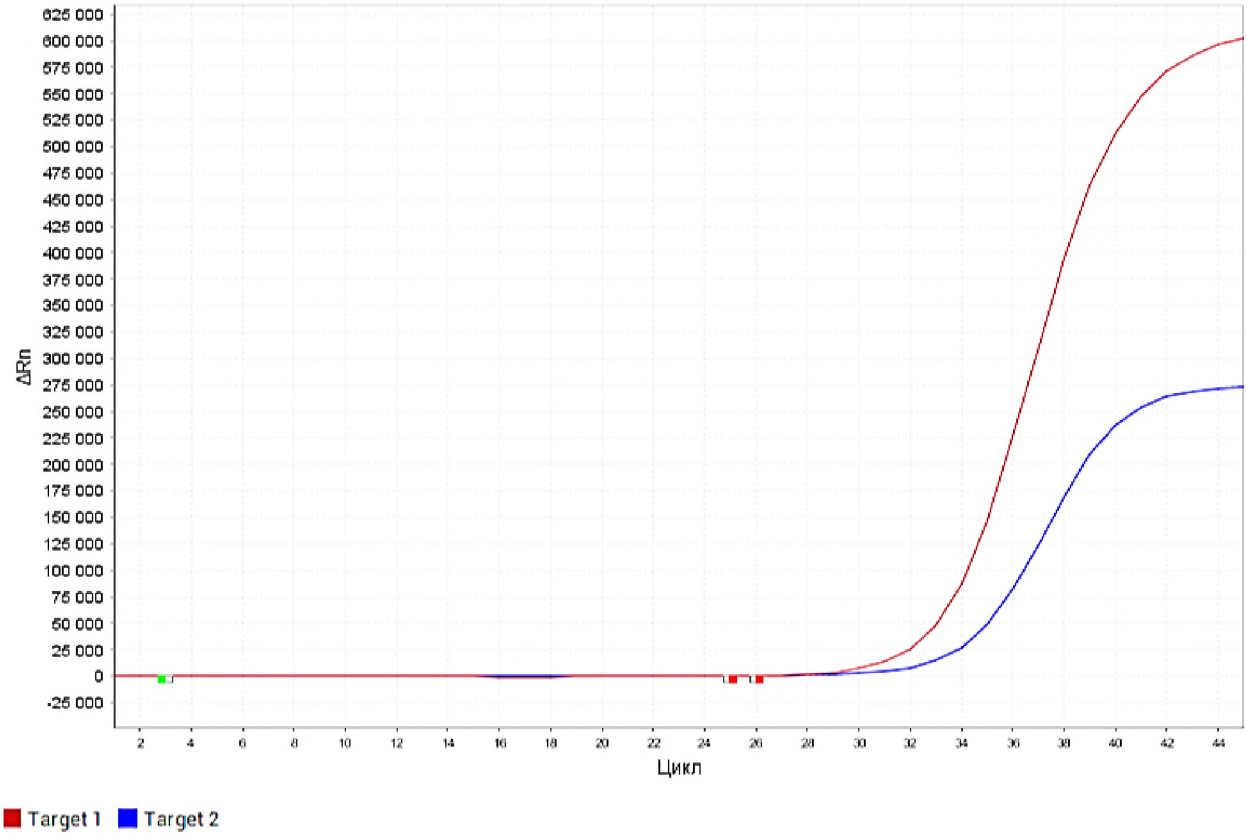


Рисунок 52 – График амплификации ПЦР продукта, показывающего наличие Candidatus Phytoplasma mali (красная линия) и продукта внутреннего стандарта ДНК

Таким образом, исходя из полученным данных мы рекомендуем при осуществлении молекулярно-генетической идентификации фитоплазмы яблони наборами НПК «Синтол» использовать на этапе получения препарата ДНК метод ЦТАБ.

При скрининге 20 сортов яблони, отобранных из различных промышленных насаждений яблони, не имевших симптомы болезни, не был найден ни один заражённый образец.

2.4 Выводы

Выполнена экспериментальная апробация 16 мультилокусных SCoT+CDDP-маркеров на сортах айвы обыкновенной и девати локусспецифичных ДНК-маркеров (SSR-маркеры) на подвоях косточковых культур и установлен уровень полиморфизма и определены наиолее перспективные маркеры.

Осуществлено генотипирование сортообразцов абрикоса обыкновенного с использованием IRAP-маркеров. Выборка включала 32 генотипа абрикоса как из природных популяций Дагестана, так и культурных сортов из различных экологи-географических групп. Полученные в ходе IRAP генетипирования сведения позволяют утверждать о уникальности дагестанского генофонда абрикоса.

Проведено генотипирование 16 сортов винограда различного экогеографичекого происхождения с применением IRAP-маркеров. В процессе анализа родства исследуемых сортов было установлено генетичекое взаимоотношение между задействованными в исследовании экогеографическими группами.

Для определения генетической стабильности размножаемой in vitro садовой культуры ежевики обыкновенной были апробированы 10 ISSR маркеров и 6 IRAP маркеров.

По результатам апробации 10 ISSR-маркеров и 6 IRAP маркеров были выявлены наиболее перспективные для и анализа генетической стабильности культуры ежевики обыкновенной при микроклонировании: DKS024 и UBC 810.

Усовершенствованы методы оценки генетичекой стабильности in vitro подвоев косточковых культур на основе ISSR и IRAP ДНК-маркеров. Определены оптимальные значения концентраций основных реагентов ПЦР-смеси для ISSR и IRAP генотипирования. Они позволяют безошибочно проводить детекцию амплифицируемых фрагментов в спектрах, что повышает эффективность анализа генетической стабильности.

Разработана методика генотипирования сортов и идентификации генов хозяйственно-ценных признаков яблони на основе использования восьми микросателлитных ДНК-маркеров, два из которых (MdPG1SSR10kd и Md-Exp7-SSR) позволяют идентифицировать аллельные варианты генов, контролирующих плотность мякоти плодов яблони.

На основании анализа и обобщения комплекса научных результатов полученных в области маркер-опосредованной селекции яблони даны методические рекомендации по использованию ДНК-маркерных систем ценных генов в селекционном процессе данной культуры.

Усовершенствованы методы идентификации вирусов и фитоплазм семечковой культуры – яблони. На основе использования метода ПЦР в реальном времени предложен метод ПЦР-диагностики вирусов яблони. Апробированный протокол экстракции ДНК, являющийся менее дорогостоящей альтернативой испольуемым ранее наборам для экстракции «Фитосорб» позволяет эффективно проводить ПЦР-диагностику фитоплазмы пролиферации яблони.

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

Создание новых сортов плодовых культур и винограда, отвечающих требованиям по урожайности, адаптивности к почвенно-климатическим конкретного региона является актуальной задачей современной селекции. Использование метода вегетативного размножения растений в условиях *in vitro*, позволяет ускорить размножение новых, перспективных сортов, подвоев и внедрять их в производство.

Благодаря возможности быстрого тиражирования клональное микроразмножение растений имеет большую коммерческую ценность, по сравнению с традиционными методами размножения. Огромная практическая ценность меристемной культуры *in vitro* заключается в возможности оздоровления и поддержании здорового посадочного материала [67], поэтому микроклональное размножение имеет особое значение при переходе к безвирусному посадочному материалу.

На успешность процесса выращивания растений в культуре *in vitro* оказывают влияние множество факторов, таких как, минеральный и гормональный состав питательной среды. Кроме того, возникают такие препятствия, приводящие к потере растений *in vitro*, таких как контаминация культур, феномен гипергидричности, потемнение тканей и выделение фенолов, некроз верхушек побегов, трудности адаптации. Очень важно выбрать оптимальный период отбора эксплантов для введения в культуру, т.к. возраст растения-донора эксплантов, его физиологическое состояние и фаза вегетации имеют большое значения для дальнейшего процесса размножения [68].

Изучение всех этих факторов, влияющих на размножение плодовых и ягодных культур в условиях *in vitro*, продолжает оставаться актуальной задачей для исследователей.

Питательная среда – один из основных факторов, обуславливающий успех микроклонального размножения растений [69]. Подбор оптимальной питательной среды для каждого вида способствует реализации морфогенетического потенциала тканей и регенерации растений [70-72]. Как правило, в ее состав входят макро- и микроэлементы, аминокислоты, органические добавки, витамины, источники углерода, регуляторы роста растений и отвердители [73]. Оптимизация содержания минеральных элементов в культуральной среде усиливает рост и морфогенез эксплантов. Он также улучшает клеточную пролиферацию, органогенез, соматический эмбриогенез, качество побега и содержание биологически активных веществ в культурах клеток и органов [74].

Подвои косточковых культур являются одним из объектов размножения в культуре *in vitro*, так как именно за счет использования в производстве современных подвоев возможно интенсифицировать садоводство, обеспечить более раннее вступление в плодоношение, компактную посадку деревьев, повысить продуктивность сортов, привитых на новые подвои [75, 76].

Введение клоновых подвоев косточковых культур в культуру *in vitro*, по нашим наблюдениям, лучше всего проводить в период активного роста побегов во второй декаде мая [77]. Для введения в культуру используют экспланты размером 0,3-0,5 мм [78]. На разных этапах клонального микроразмножения применяются модифицированные агаризованные питательные среды Мурасиге и Скуга (MS) [79], Вуди Плант Медиа (WPM) [80], DKW [78]. Концентрация регуляторов роста, добавляемых в среду, различается в зависимости от стадии культивирования и типа растения. Ауксины и цитокинины активны в образовании корней и побегов из тканей растений. Высокое соотношение цитокинина/ауксина индуцирует

образование побегов; высокое соотношение ауксина/цитокинина индуцирует образование корней [81].

На первом этапе, введения в культуру, может возникнуть проблема высокой контаминации эксплантов сапрофитной и фитопатогенной микрофлорой поэтому исследователи прибегают к различным стерилизующим агентам, путем обработки эксплантов 15% раствором гипохлорита натрия, 70% этанолом [82] сулемой, пероксидводородом [83], добавление в питательную среду различных антибиотиков [84]. В качестве питательной среды для введения используют различные модификации среды MS с добавлением 25-30 г/л сахарозы, 25 мг/л Fe, 500 мг/л Ca(No3) [85], 1 мг/л 6-БАП, 0,02 мг/л 1- нафтилуксусной кислоты [86].

Для осуществления этапа пролиферации побегов используют 6-бензиламинопурин (БАП), который представляет собой широко распространенный цитокинин, к аусинам, используемым для размножения побега, относятся ИМК, ИУК, НУК, иногда добавляют гиббереллoвую кислоту, как стимулятор роста и элонгации побегов [87, 88]. Например, экспланты успешно культивируют при таком соотношении гормонов, как 2 мг/л БАП, 0,01 мг/л ИМК, 0,3 мг/л гиббереллиновой кислоты [89]. Некоторые исследования показывают, что добавление 0,1 мг БАП позволяет добиться регенерации в 2 раза выше, чем в опытном контроле (концентрация БАП 0, 5 мг/л). Дальнейшее размножение микрорастений следует вести на среде Мурасиге-Скуга с введением 6-БАП в концентрации 0,5-2 мг/л в зависимости от пассажа [85].

На стадии ризогенеза принято использовать питательную среду с 1/2 концентрации макро- и микросолей MS. Для стимуляции корнеобразования применяются ауксины (ИМК) в концентрации 0,1 мг/л, БАП 1 мг/л [90-93], 2 мг/л НУК [81], 0,5 мг/л ИМК [94]. Добавление Fe-EDDHA (этилендиамин ди-2-гидроксифенилацетата железа) в концентрации 200 мг/л в среду для укоренения значительно повышает процент укоренившихся растений [90]. Далее следует адаптация корнесобственных растений, условием которой

является соблюдение повышенной влажности воздуха в первые недели после высадки, доращивание в нестерильных условиях, затем закаливание и доращивание в условиях теплицы [95].

Адаптация растений к нестерильным условиям произрастания является последним и наиболее сложным этапом клонального микроразмножения. Существуют различные способы адаптации микропобегов: отбираются укорененные побеги высотой не менее 2 см, имеющие 2 и более корней длиной не менее 2-3 см. Для адаптации используют субстрат, состоящий из готового питательного грунта для растений, вермикулита и перлита в соотношении 3:1:1. Проводят подкормки раствором минеральных солей питательной среды MS. После 4 недель адаптации растения пересаживаются в контейнеры с почвенным субстратом большего объема [96], по другим данным наиболее оптимальным составом почвенного субстрата является смесь почвы, песка и питательной среды Терравита в соотношении 2:1:1 [97].

Хотя методики размножения для многих культур отработаны, требуется постоянная их адаптация и совершенствование, связанные с меняющимся сортиментом, генотипические особенности которых, при выращивании в условиях *in vitro* еще не изучены.

Для **земляники садовой** исследования в области клонального размножения не менее актуальны в связи с интенсивным обновлением сортов. Эффективность введения в культуру *in vitro* земляники садовой также зависит от фазы вегетации растений. Так нами было установлено, что в условиях Краснодарского края, наиболее оптимально вводить апексы побегов земляники во время активного усообразования, а именно в середине июня-начале июля [98]. Наиболее распространенной питательной средой для введения в культуру земляники садовой является MS с добавлением 0,5 мг/л БАП, 0,1 мг/л кинетина, для микроразмножения побегов среда MS с добавлением 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л - 0,5 мг/л кинетина, укоренение выросших побегов проводят с добавлением 0,5 мг/л ИМК в течение 30 с и последующим культивированием на среде с 1 мг/л ИМК и 0,1 г/л активированного угля

[99,100]. По другим данным для успешного проведения этапа размножения земляники садовой, добавление в среду гиббеллиновой кислоты в концентрации 0,4 мг/л приводит к образованию большого количества побегов [101]. Ризогенез у микропобегов земляники может успешно проходит на среде 1/2 MS и без добавления ауксинов. Адаптация укорененных растений проводится на субстрате, состоящем из почвенно-торфяной смеси, перлита и вермикулита в соотношении 3:1:1 [102, 103].

Крыжовник и ежевика являются хозяйственно-ценными ягодными культурами. Использование метода микроклонального размножения для этих культур является перспективным, так как позволяет получать в кратчайшие сроки большое количество генетически однородного, оздоровленного посадочного материала. Применение на практике оптимизированного метода микроклонального размножения крыжовника будет способствовать быстрому внедрению перспективных и малораспространенных генотипов в производство.

Для микроклонального размножения крыжовника используют питательную среду WPM с добавлением регуляторов роста, таких как 6-бензиламинопурин (6-БАП), кинетин и зеатин в различных концентрациях [104], индолил-3-масляная кислота (ИМК) [105]. По результатам некоторых исследований эксплантов для введения крыжовника в *in vitro* лучше отбирать в октябре (летние побеги с почками). Для увеличения количества побегов при размножении крыжовника используют цитокинины, например, мета-тополин (в качестве аналога БАП) [106]. Адаптацию, укоренившихся побегов крыжовника можно проводить в пластиковых контейнерах с равным количеством компоста Левингтона и перлита [104].

Исследования в области клонального размножения ежевики показали, что уровень приживаемости и частота регенерации существенно выше при введении эксплантов в культуру в осенний период, чем в ранневесенний период [107]. На этапе микроразмножения ежевики подходят питательные среды MS и Ли де Фоссада [108]. Успешное формирование побегов

достигается культивированием эксплантов на среде MS в течение 15 дней, с добавлением 4 mM БАП и 0,25 mM ИМК [109]. В наших исследованиях при размножении ежевики Карака Блэк, было установлено, что на этапе микроразмножения в питательную среду MS следует вводить БАП в концентрации 1,0-1,25 мг/л, для получения микропобегов длиной 1,5-2 см и более следует понизить содержания в среде БАП до 0,5 мг/л. 110]. Побеги длиной не менее 1 см укореняют *ex vit*ro в смеси торфа и перлита в соотношении 1:1 [109]. Минеральный состав питательных сред для культивирования тканей растений, наряду с регуляторами роста играет в первую очередь поддерживающую роль в процессе регенерации. Потребности в питательных веществах различаются у разных видов растений, и часто, один тип питательной среды, используемый на протяжении всего культивирования, не может быть оптимальным для всех стадий развития эксплантатов [111].

Производство оздоровленного посадочного материала винограда в последнее время неразрывно связано с применением биотехнологических приемов [112]. При клональном размножении винограда *in vitro* чаще всего используют среды Мурасига и Скуга, Нича, Хеллера и других, отличающихся друг от друга соотношением аммонийного и нитратного азота. В качестве инициальных эксплантов используют апикальные меристемы. Очень важное значение при этом имеет размер экспланта: чем меньше его величина, тем большая вероятность получения абсолютно здорового материала. Оптимальный размер экспланта для винограда 0,2-0,3 мм. Оптимальными сроками для введения винограда являются: февраль-март, июнь (период активного роста), август (период вторичного роста). В большинстве случае при проведении первого этапа введение апексов в культуру исследователи отдают предпочтение среде Мурасиге и Скуга с пониженным содержанием макросолей. Уменьшенное содержание азота способствует лучшей приживаемости и развитию эксплантов, потому практически исключает явление витрификации. Немаловажный фактор, влияющий на успех клонального микроразмножения винограда, – гормональный баланс

питательной среды. При высоком соотношении гормонов (цитокинин-ауксин) происходит развитие пазушных меристем или образование адвентивных почек, при низком индуцируется корнеобразование, а при среднем наблюдается образование и пролиферация каллуса. Наиболее часто при клональном микроразмножении используют ИУК, реже – НУК в качестве ауксиновых компонентов, из цитокининов используют кинетин и БАП [113-117].

Кроме цитокининов и ауксинов, в питательную среду иногда добавляют гиббереллoвую кислоту, которая стимулирует рост и вытягивание (элонгацию) сформировавшихся почек и способствует получению растений винограда с хорошо развитой надземной частью [118].

Следует отметить, что минеральный состав среды Мурасиге и Скуга плохо подходит для укоренения побегов, полученных *in vitro* растений винограда, так как среда разрабатывалась для культивирования каллусов и каллусных клеток и учитывает, прежде всего, условия для их развития. Среди различных концентраций и комбинаций регуляторов роста, используемых для размножения, оптимально использовать 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИМК, а также БАП в концентрации 2 мг/л в течение 15-20 дней. Индуцирование корней происходит на среде MS с добавлением ИУК в количестве 2 и 4 мг/л [119]. Использование термически обработанной почвосмеси (путем пропаривания), состоящего из смеси лесной земли, п/с «Дубрава» и песка (2 : 1 : 1) повышает приживаемость пробирочных растений [120].

В целом, остается необходимость индивидуальной отработки протоколов клонального размножения растений, связанная с генотипическими особенностями новых сортов и подвоев садовых культур и винограда. Актуальной задачей остается также поиск решения, возникающих проблем в процессе размножения растений *in vitro*.

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*.

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 крупнокосточковых культур ПК СК 1, ПКГ 18/2, ПКГ 18/3 (селекция СКФНЦСВВ); сорт земляники садовой Белруби, перспективные гибриды земляники садовой селекции СКФНЦСВВ – 16-8-18, 9-2-21, 8-9-12; сорта ежевики - Апачи, Оседж, Лохтей; сорта винограда Достойный, Владимир, Дмитрий, селекции ФГБНУ СКФНЦСВВ; растения подвоев яблони М 9, СК 3, СК 4, СК 7

Основное используемое лабораторное оборудование: стерилизатор ВК-30, стерилизатор воздушный ГП-80 СПУ, аквадистиллятор АЭ-14-«Я-ФП»-01, 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 Ohaus PR-224, мешалка магнитная C-MAG HS 7, ламинарный бокс с вертикальным потоком воздуха (тип КВАЗАР), бинокулярный стерео микроскоп Kaisa- KS-7045, pH-метр Edge HI 2020, люксметр ТКА-люкс, микродозаторы автоматические Thermo Labsystems и Biohit с переменным объемом, стеллажи световые, оборудованные лампами люминесцентными и светодиодными, стеллаж для роста растений СТЕЛЛАР-ФИТО LINE P6-C, камера для роста растений ВРС МИР 500, автоклав вертикальный FW45, бокс абактериальной воздушной среды БАВнп-01-"Ламинар-С"-1,5 LORICA, холодильник-морозильник +2…+8/-10…-25 °С, 206/144 л, вертикальный, MCD- 25L350 Midea, дистиллятор электрический АЭ-4, шкаф сушильный +200 С ШС-80-01 СПУ; термостаты суховоздушные ТВ-80 и ТВ-80-1, весы аналитические 120г/0,1 мг; PX124/ E. с поверкой, Ohaus и др.

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 исследований в культуре *in vitro* (средства дезинфицирующие; перчатки, марля, вата, бумага фильтровальная, фольга, бахилы, береты, нарукавники, халаты; скальпели, пинцеты,; мерные колбы, стаканы, цилиндры; субстраты для приготовления почвосмесей, 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 2024 год.

Алгоритм работ по микроклональному размножению растений соответствовал общим требованиям и правилам [121-124].

1. 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. [121].
2. Тимофеева О.А., Невмержицкая Ю.Ю. Клональное микроразмножение растений: учеб.-метод. пособие. – Казань: Казанский университет, 2012. – 56 с. [122].
3. Тимофеева С.Н., Смолькина Ю.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Технологии микроразмножения *in vitro*: учеб.-метод. пособие. – Саратов: Саратовский государственный университет, 2016. – 38 с. [123].
4. Ребров А.Н. Питательная среда для ввода и регенерации меристем винограда в условия *in vitro // Патент на изобретение № 2636030.* Опубликовано: 17.11.2017. [124].
5. Колбанова Е.В. Подбор минерального и гормонального состава питательной среды для культивирования сортов крыжовника в культуре *in vitro*. Плодоводство. 2013; 25(1):284-294 [125].

Работы проводились в следующем порядке:

1. Отбор эксплантов с выделенных селекционерами исходных визуально здоровых растений в полевых условиях генетической коллекции ЦКП ФГБНУ СКФНЦСВВ в различные сроки вегетации;

2. Санация и введение эксплантов в культуру *in vitro*;

3. Собственно микроразмножение растений *in vitro;*

4. Этап укоренения микропобегов *in vitro*;

5. Адаптация укорененных микропобегов к 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 вычленяли в асептических условиях в ламинарных боксах и высаживали в пробирки с питательной средой.

При введении эксплантов подвоя косточковых культур ПК СК 1 испытано дезинфицирующее средство «Алмадез-эко» - жидкий концентрат, хорошо и быстро растворяется в воде, т.е. снижается время на приготовление рабочего раствора.

В состав средства «Алмадез-эко» в качестве действующих веществ входят алкилдиметилбензиламмоний хлорид 3,5%, молочная кислота -1%, неионогенные поверхностно-активные вещества и другие функциональные добавки. Раствор эффективно воздействует на инфекции бактериальной, вирусной, грибковой этиологии, используют для поверхностной стерилизации в медучреждениях [126].

В работе использовали 0,5; 1,0 и 1,5 %-ных растворы в экспозиции 5 и 10 минут.

Эффективность стерилизации оценивали по количеству чистых эксплантов, регенерировавших побеги, количеству погибших эксплантов, вследствие действия средства), количеству эксплантов, инфицированных патогенной микрофлорой.

Размер вводимого в культуру *in vitro* апекса –3-4 мм.

Экспланты вычленяли в асептических условиях в ламинарных боксах и высаживали на питательную среду.

На этапе введения в культуру экспланты культивировали в стеклянных флаконах (пенициллиновые), на этапе мультипликации и укоренения в банках объемом 200-250 мл. Режим культивирования: температура 24-26°С, фотопериод 16 часов, интенсивность освещения 3500-5000 люкс.

В качестве основной среды использовали питательные среды по прописи Мурасиге и Скуга (MS) [121], модифицированную среду Реброва А.Н. для винограда [124] и 1/3МС (содержание нитрата аммония и калия уменьшено в 3 раза + сахарозы 20 г/л для размножения крыжовника [125].

На этапе введения в культуру *in vitro* учитывали: приживаемость эксплантов (уровень регенерации) в зависимости от срока введения, способа обработки, количество инфицированных эксплантов и эксплантов с некрозом,

На этапе собственно микроразмножения оценивали эффективность размножения по коэффициенту размножения (из соотношения между количеством побегов, образовавшихся из одного эксплантa, культивируемого *in vitro*, и количеством начальных побегов), размер микропобегов.

На этапе укоренения процент укоренившихся растений, длину и количество корней.

На этапе адаптации земляники садовой, укорененные микропобеги высаживали в субстрат, состоящий из смеси пропаренного готового почвенного грунта «Садовая Земля», вермикулита, перлита в соотношении 3:1:1. Условия адаптации: температура +22+26 °С, освещенность 4,5 тыс. люкс, при фотопериоде 16/8. Учитывали процент адаптированных растений, длину корневой системы, высоту растений, количество листьев.

Для повышения адаптивной способности растений использован комплексное внесение биопрепаратов и удобрений: однократный полив водными растворами биопрепаратов в концентрации 5 мл/л Агринос 1; через 7 дней после высадки - Агринос 2, на 21-й день после высадки путем однократного опрыскивания микрорастений применяется раствор Энерген Экстра в концентрации 0,6 г/л, с последующим трехкратным опрыскиванием растений Энерген Экстра в концентрации 0,6 г/л с интервалом 10-14 дней до появления хорошо развитых листьев.

Характеристика препаратов:

Агринос 1 - биопрепарат, содержащий активные микроорганизмы: *Azotobacter vinelandii* и *Clostridium pasteurinum*, способные производить и

выделять органические кислоты как продукты жизнедеятельности, растворяющие минерализованные соли и переводящие K+, Mg+ и Ca++ из органических форм в минеральные, более доступные для растений.

Агринос 2 - биопрепарат, полученный методом микробной ферментации, содержащий L –аминокислоты (4%), хитин, хитозан, глюкозамин (4%), комплекс ферментов, молочную кислоту, полисахариды, углерод, азот и другие основные микроэлементы, используемые растениями в различных условиях выращивания.

Энерген Экстра содержит калийные соли гуминовых кислот, влияющих на рост энергетики клетки, изменение физико-химических свойств протоплазмы, интенсификацию обмена веществ клетки.

Применяемые препараты зарегистрированы на территории России: Агринос 1, № 344-19-933-1 Агринос 2, №344-19-934-1 до 24.12.2025; регистратор: «Агринос Инк.» (США); Энерген Экстра №046-18-1503-1 до 21.05.2027; регистратор: ЗАО «ТПК Техноэкспорт» [127].

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 подвоя крупнокосточковых культур

Важность и сложность этапа инициации эксплантов в культуру *in vitro* продолжает быть актуальной. Поэтому поиск эффективных, безопасных, не фитотоксичных препаратов, эффективных протоколов стерилизации для обработки эксплантов при введении в культуру *in vitro* является актуальной задачей.

В текущем году для повышения эффективности поверхностной стерилизации эксплантов было испытано дезинфицирующее средство «Алмадез-эко», стандарт - средство «ОКА-ТАБ», испытанное нами раннее при

введении эксплантов подвоев яблони [128], косточковых культур, земляники и винограда.

Для введения в культуру экспланты отбирались в период активного роста побегов, на данном этапе использовали среду по прописи Мурасиге-Скуга с 6-БАП – 0,3 мг/л. Испытывали эффективность трех концентраций рабочих растворов 0,5; 1,0; 1,5 % и две экспозиции обработки 5 и 10 минут (табл. 17).

Таблица 17 – Оценка эффективности средства «Алмадез-эко» при стерилизации эксплантов ПК СК 1

Вариант	Жизнеспособные экспланты, %	Уровень контаминации, %	Уровень некроза, %
ОКА-ТАБ, 0,5 %, 7 мин. (стандарт)	83,2	12,6	4,2
Алмадез-эко, 0,5 %, 5 мин.	**79,1**	8,6	12,3
Алмадез-эко, 0,5 %, 10 мин.	68,0	6,5	**25,5**
Алмадез-эко, 1,0 %, 5 мин.	71,9	11,3	16,8
Алмадез-эко, 1,0 %, 10 мин.	63,1	5,6	**31,3**
Алмадез-эко, 1,5 %, 5 мин.	59,4	19,2	**21,4**
Алмадез-эко, 1,5 %, 10 мин.	53,2	21,7	**25,1**

Наибольший выход жизнеспособных эксплантов отмечен в стандартном варианте при обработке средством «ОКА-ТАБ» - 83,2 % чистых жизнеспособных эксплантов (табл. 17).

Достаточно высокая эффективность обработки была в варианте «Алмадез-эко», 0,5 %, 5 мин. – 79,1%. При повышении концентрации дезинфицирующего средства «Алмадез-эко» и увеличении длительности обработки (10 мин.) эффективность обработки снижается за счет повышения уровня некроза эксплантов до 16,8-31,3 %. Предполагаем, что высокая фитотоксичность средства обусловлена тем, что экспланты отбирались в период активного роста побегов, когда растительные ткани были очень уязвимы.

В условиях отчетного года дезинфицирующее средство «Алмадез-эко» показало эффективность обработки почти на уровне стандарта - 79,1 %

(стандарт 83,2 %) при поверхностной стерилизации эксплантов подвоя ПК СК 1, в концентрации 0,5 % рабочего раствора и экспозиции 5 минут, поэтому его можно использовать для дезинфекции эксплантов при введении их в культуру *in vitro*.

Регенерация эксплантов винограда различных питательных средах

В отчетном году в культуру *in vitro* вводились сорта винограда Достойный, Владимир, Дмитрий. Для регенерации эксплантов на этапе введения использована питательная среда ½ Мурасиге-Скуга (контроль) и среда, рекомендуемая для размножения винограда Реброва А.Н. [124].

Для стимулирования регенерации и развития эксплантов винограда, в один из вариантов, в питательную среду Реброва А.Н. помимо 6-БАП добавили ИУК. В наших исследованиях этот прием уже показывал повышение уровня регенерации эксплантов некоторых сортов.

Для введения использовали инициальные экспланты, полученные с черенков прошлого года и пророщенных в лабораторных условиях (май) и экспланты, отобранные с активно растущих побегов.

При введении эксплантов с искусственно пробужденных побегов более высокая приживаемость эксплантов была в варианте с совместным использованием 6-БАП 1 мг/л и ИУК 0,5 мг/л. Уровень регенерации выше на 14,2-32,1 %, чем в контроле и варьировал от 31,4 до 62,5 %, в контрольном варианте 15,5-30,4 %. В варианте на модифицированной среде Реброва А.Н. с добавлением 6-БАП 1 мг/л регенерировало 16,5-32,3 % эксплантов (рис. 53).

В текущем году, положительная реакция на добавление ИУК, у эксплантов, отобранных с искусственно пробужденных побегов, отмечена у всех сортов, уровень регенерации в 2 раза выше, чем в контрольном варианте. Более высокая приживаемость была у сорта винограда Достойный. На модифицированной среде с 6-БАП и ИУК приживаемость эксплантов составляла 62,5 %.

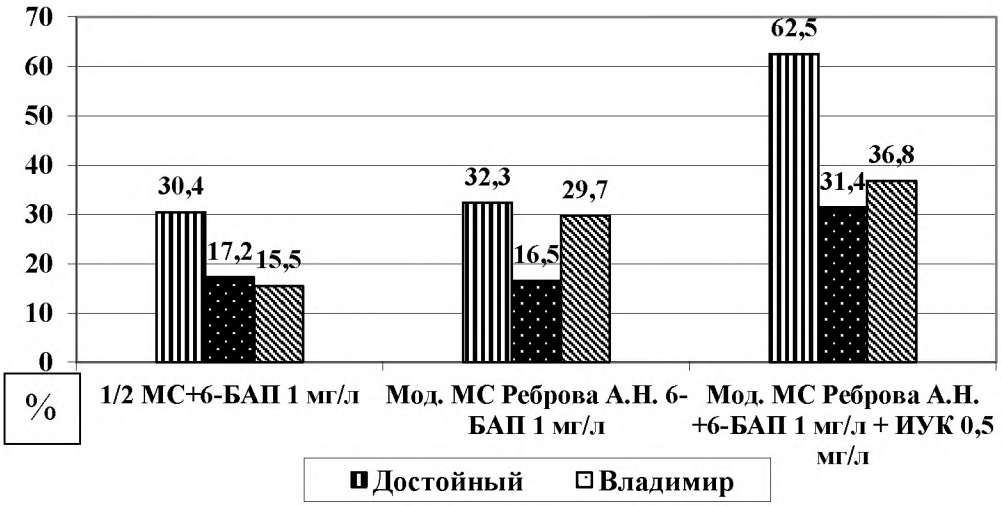


Рисунок 53 – Процент регенерации эксплантов винограда, отобранных с искусственно пробужденных побегов

При введении винограда инициальными эксплантами, отобранными в период активного роста побегов, регенерация эксплантов варьировала от 50 до 89,4 % (рис. 54).

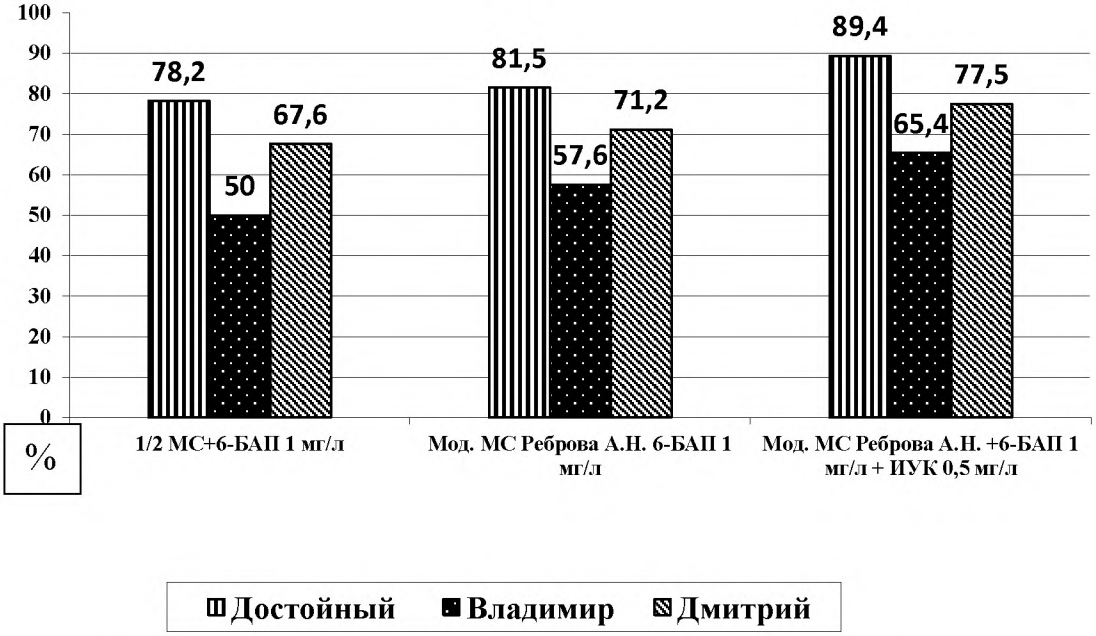


Рисунок 54 – Уровень регенерации эксплантов винограда, отобранных в период активного роста побегов

В контрольном варианте на среде ½ МС приживаемость была в пределах 50,0-78,2%, в зависимости от сорта, на модифицированной среде МС Реброва А.Н., содержавшей только 6-БАП приживаемость составляла 57,6-81,5 %, в варианте с добавлением ИУК был наибольший уровень приживаемости – 65,4-89,4 %, хотя разрыв между вариантами был не такой значительный и варьировал от 3,3 до 15,4 %.

В целом, в этот период введения, более высокая приживаемость отмечена у эксплантов сорта Достойный 78,2-89,4 %. У сорта Дмитрий 67,6-77,5 %, у сорта Владимир уровень регенерации эксплантов в зависимости от варианта варьировал от 50,0 до 65,4 %.

Введение сортов интродуцентов и гибридов земляники садовой селекции ФГБНУ СКФНЦСВВ в культуру in vitro.

В текущем году проведена оценка эффективности введения эксплантов земляники садовой, отобранных из коллекции ЦКП ФГБНУ СКФНЦСВВ и с участка гибридизации.

Введение эксплантов земляники садовой проводился в период активного усообразования (июнь) (табл. 18).

Таблица 18 – Эффективность введения эксплантов земляники садовой *in vitro* (2-3 декада июня 2023 г.)

Сорт, гибрид	Контаминация, %	Некроз, %	Без регенерации, %	Регенерация, %
Белруби	42,8	8,6	4,2	44,4
гибрид 16-8-18	17,4	2,2	5,4	**75,0**
гибрид 9-2-21	36,3	11,6	7,1	45,0
гибрид 8-9-12	49,1	6,5	5,9	38,5

По данным таблицы видно, что достаточно высокий уровень регенерации эксплантов отмечен только у гибрида 16-8-18, который соствлял 75,0 %. У сорта Белруби и гибридов 9-12-21 и 8-9-12 приживаемость

эксплантов была ниже среднего и составляла 38,5-45,0 %. Фитотоксическое действие стерилизатора на экспланты было на низком уровне 2,2-11,6 % эксплантов с признаками некроза тканей.

В основном, низкая эффективность введения эксплантов в культуру обусловлена высоким уровнем контаминации эксплантов 36,3-49,1 %, отбор которых осуществлялся с растений открытого грунта и дезинфицирующее средство не справилось с поверхностными патогенами.

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

Особенности клонального микроразмножения клоновых подвоев крупнокосточковых культур

В отчетный период в культуру *in vitro* введены экспланты перспективных подвоев крупнокосточковых плодовых культур селекции ФГБНУ СКФНЦСВВ ПКГ 18/2 и ПКГ 18/3.

По результатам 5-ти пассажей этапа мультипликации установлено, что подвои ПКГ 18/2 и ПКГ 18/3 в среднем формируют не большое количество побегов из одного эксплантa (табл. 19).

Таблица 19 – Эффективность размножения клоновых подвоев крупнокосточковых культур

Сорто-образец	Коэффициент размножения 1 : N					В среднем:
	I пассаж	II пассаж	III пассаж	IV пассаж	V пассаж	
ПКГ 18/2	2,4± 0,18	3,6 ±0,25	4,4± 0,23	6,2±0,34	6,9±0,36	4,7
ПКГ 18/3	2,8± 0,22	4,3 ±0,2	5,5± 0,29	7,1±0,32	7,3±0,27	5,4

После первого пассажа среднее количество побегов, образовавшихся у подвоя ПКГ 18/2 составляло 2,4 шт./эксп., у подвоя ПКГ 18/3 – 1,8 шт. С каждым последующим пассажем количество формирующихся побегов увеличивается. Во втором пассаже количество побегов больше, чем в первом

пассаже на 50-53,6 % и составляет 3,6-4,3 шт., в третьем пассаже на 22-27,9 % больше, чем во втором и составляет 4,4 побегов у ПКГ 18/2 и 5,5 побегов у ПКГ 18/3. На четвертом пассаже количество, образовавшихся побегов у подвоя ПКГ 18/2 было на 40,9 % выше, чем после третьего пассажа и составляло в среднем 4,4 побега с эксплантa. У подвоя ПКГ 18/3 процент побегообразования был на уровне третьего пассажа и составлял 29,1 % - 5,5 побегов/эксп.

После пятого пассажа нарастание уровня побегообразования снижается. Количество побегов образовавшихся после пятого пассажа было всего на 11,3 % больше чем в четвертом пассаже у ПКГ 18/2 и на 2,8 % у ПКГ 18/3 и составляло 6,9 и 7,3 побегов соответственно.

Также отмечено, что у подвоев для крупнокосточковых культур ПКГ 18/3, ПКГ 18/2, образование побегов идет в большей степени из боковых почек нескольких основных побегов (рис. 55).

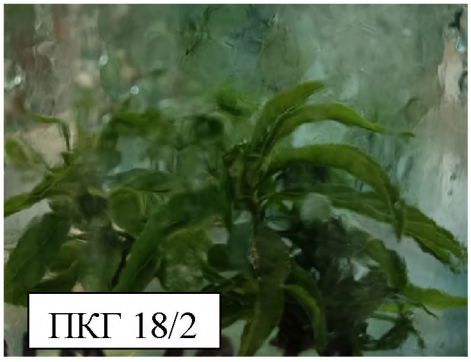


Рисунок 55 – Микропобеги подвоев крупнокосточковых культур

Оценка эффективности клонального микроразмножения сортов и гибридов земляники садовой

На этапе мультипликации земляники микропобеги были пересажены на среду MS с различной концентрацией 6-БАП (табл. 20).

Таблица 20 – Влияние концентрации 6-БАП на побегообразование на 1 пассаже

Сорт, гибрид	Концентрация 6-БАП		
	0,3 мг/л	0,5 мг/л	0,75 мг/л
Белруби	4,3	5,8	8,0
гибрид 16-8-18	4,0	5,6	7,1
гибрид 9-2-21	3,0	4,7	6,5
гибрид 8-9-12	5,2	6,9	7,3

По данным таблицы видно, что при самой низкой концентрации 6-БАП 0,3 мг/л из одного эксплантa формировалось от 3,0 до 5,2 побегов. При концентрации 6-БАП 0,5 мг/л количество побегов, с формирующихся от одного эксплантa, составляло 4,7-6,9 шт., при самой высокой концентрации БАП,75 мг/л – 6,5-8,0 шт.

Наиболее высокое побегообразование отмечено у гибрида 8-9-12 от 5,2 до 7,3 побегов в зависимости от концентрации 6-БАП. У сорта Белруби (рис. 56) и гибрида 16-8-18 примерно одинаковы уровень побегообразования от 4,0 - 4,3 до 7,1- 8,0 побегов на среде с БАП 0,75 мг/л.

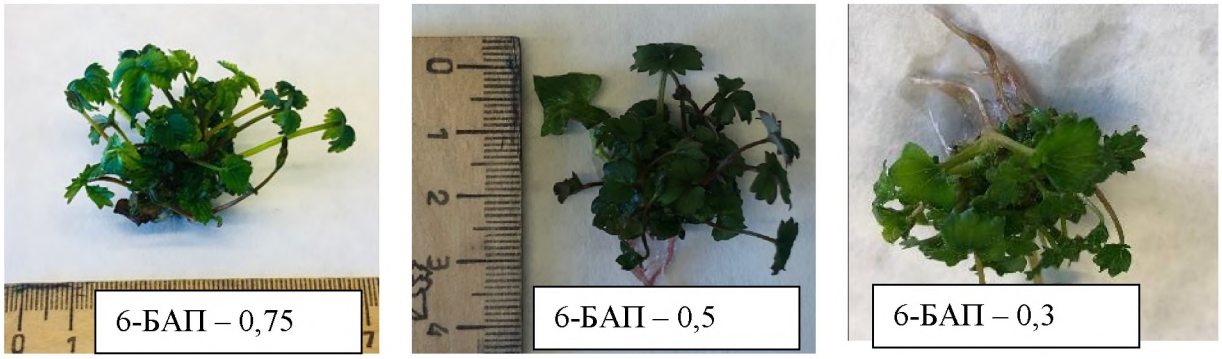


Рисунок 56 – Микропобеги земляники сорта Белруби на среде МС с различной концентрацией 6-БАП

Слабее всего побеги формировались у гибрида 9-2-21 от 3 шт. на среде с БАП 0,3 мг/л, до 6,5 побегов на среде с БАП 0,75 мг/л.

Оценка эффективности клонального микроразмножения сортов ежевики в условиях *in vitro*

В отчетный период в культуру *in vitro* были введены экспланты 3 коммерчески востребованных сортов ежевики для отработки протокола и оценки эффективности их размножения с помощью данного метода.

Главной целью микроразмножения растений является получение большого количества качественных микропобегов. С целью определения оптимального соотношения гормонов в питательной среде экспланты опытных сортообразцов высаживались на питательную среду Мурасиге-Скуга с различным соотношением 6-БАП и ГК (рис. 57).

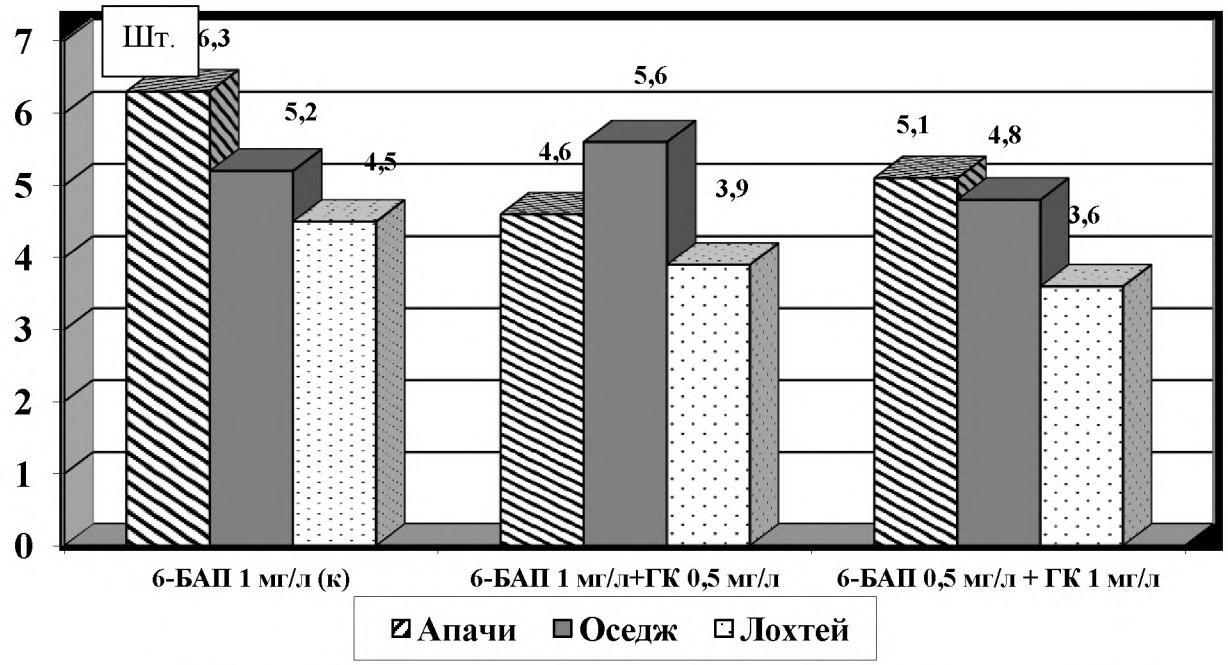


Рисунок 57 – Среднее количество побегов ежевики на средах с различным соотношением ростовых веществ

В результате наблюдений установлено, что у ежевики сорта Апачи наибольшее количество побегов сформировалось в контрольном варианте с 6-БАП 1 мг/л и составило 6,3 побегов/экспл., максимальное количество 10 шт. (рис. 58). У сорта Оседж побегообразование лучше проходит на среде, содержащей 6-БАП 1 мг/л + ГК 0,5 мг/л, при этом образуется в среднем 5,6 побегов, максимально 9 побегов с эксплантa. У сорта Лохтей в целом побегов

образуется меньше, чем у остальных сортов, более активно побеги формировались в контрольном варианте на среде с 6-БАП 1 мг/л в среднем 4,5 побега, максимально 7 шт.

Рисунок 58 – Конгломераты сортов ежевики на среде МС 6-БАП 1 мг/л

При снижении концентрации 6-БАП в 2 раза и увеличении концентрации ГК до 1 мг/л, количество образующихся побегов снижается, и побеги вытягиваются в длину (рис. 59). На среде МС с 6-БАП 0,5 мг/л + ГК 1,0 мг/л у сорта Апачи (рис. 60) и Оседж образуются более длинные побеги средней длиной 25,4 и 24,8 мм, у сорта Лохтей 18,5 мм Данный вариант среды лучше использовать на этапе, предшествующему укоренению.

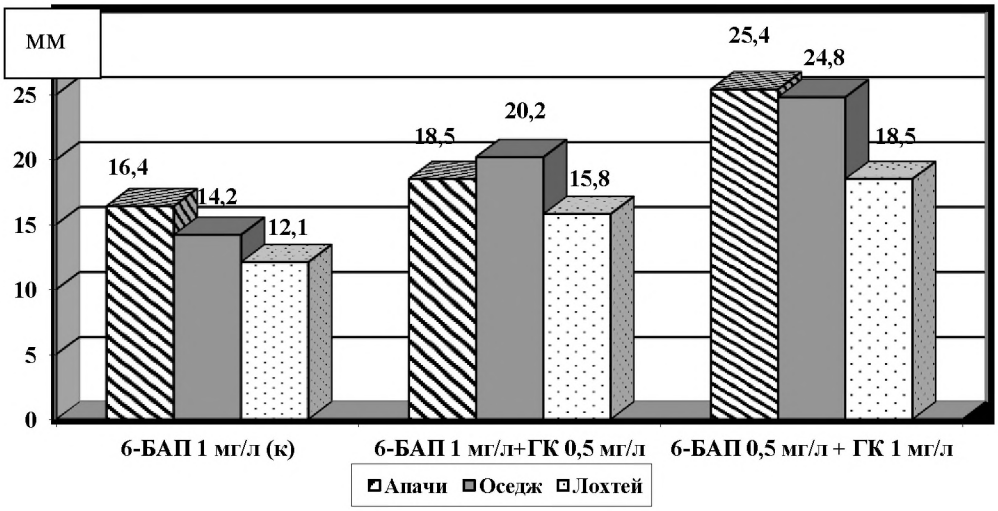


Рисунок 59 – Средняя длина побегов ежевики на средах с различным соотношением ростовых веществ

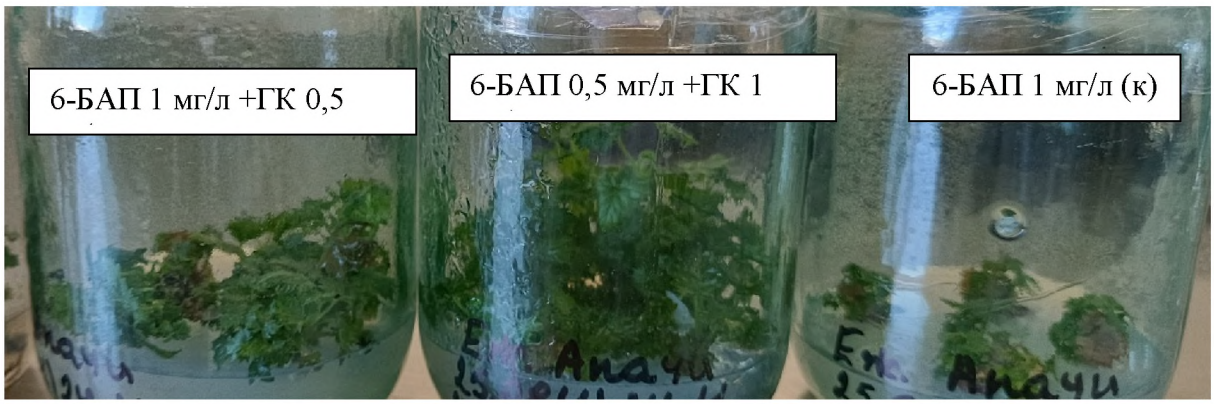


Рисунок 60 – Микропобеги ежевики сорта Апачи на средах с различным содержанием ростовых веществ

На среде, содержащей 6-БАП 1 мг/л+ГК 0,5 мг/л, формируется от 3,9 до 5,6 побегов, что в целом является оптимальным вариантом для этапа микроразмножения. Формируются конгломераты, состоящие из побегов, средней длиной 15,8-20,2 мм. В контрольном варианте побеги более мелкие 12,1-16,4 мм длиной.

Оценка эффективности клонального микроразмножения сортов крыжовника

Считается, что крыжовник трудно размножается в условиях *in vitro* [63], и в связи с тем, что культура пользуется спросом, необходимо оценить возможность получения посадочного материала с использование данного метода.

В отчетном году в культуру *in vitro* были введены эксплантыы 3 сортов крыжовника для отработки протокола размножения. Эксплантыы отобраны в коллекции ЦКП ФГБНУ СКФНЦСВВ.

После первого пассажа процент эксплантов, сформировавших конгломераты был низким от 28,8 % у сорта Лада до 42,5 % у сорта Серенада, их не разделяли и пересадили конгломератами, т.к. они были очень мелкими.

После второго пассажа побеги имели длину от 0,42 до 1,15 см (табл. 21), коэффициент размножения варьировал от 1,5 до 2,4 побегов с эксплантыа. Более

длинные побеги были у сорта Серенада и на среде МС и на среде 1/3 МС – 1,08-1,15 см, у сорта Лада 0,76-0,81см, у сорта Зеленый дождь 0,42-0,55 см.

Таблица 21 – Коэффициент размножения крыжовника

Сорто-образец	Среда	II пассаж		III пассаж	
		Высота, см	Коэф. разм.	Высота, см	Коэф. разм.
Серенада	МС	**1,08±0,06**	**2,4± 0,15**	**1,64±0,09**	**3,6± 0,28**
	1/3 МС	1,15±0,06	2,2±0,03	1,55±0,12	2,8±0,19
Зеленый дождь	МС	0,55±0,15	1,8± 0,22	0,72±0,06	2,2±0,17
	1/3 МС	0,42±0,03	1,6±0,12	0,61±0,10	1,9±0,08
Лада	МС	0,84±0,03	1,7±0,18	1,12±0,06	2,1±0,31
	1/3 МС	0,76±0,06	1,5±0,07	0,89±0,03	1,9±0,43

Примечание: Мс+6-БАП 1 мг/л, 1/3 МС+6-БАП 1 мг/л

Однако большая часть разделенных мелких побегов долго не развивались, и часто отмечалась гибель таких побегов, особенно у сортов Зеленый дождь и Лада (рис. 61). Поэтому после третьего пассажа конгломераты размером менее 0,6 см не разделяли. Остальные микропобеги регенерировали от 2 до 5 новых побегов. Средний коэффициент размножения у сорта Серенада на среде МС был 3,6 побегов, на среде 1/3 МС – 2,8 побегов.

У сортов Зеленый дождь и Лада коэффициент размножения был одинаковый в пределах 1,9-2,2 побега/эксплант. При последующем пассаже большая часть эксплантов не развивалась, наблюдалась гибель побегов, в итоге, размножить микропобеги этих сортов на средах МС и 1/3 МС не удалось, в виду низкой их жизнеспособности.

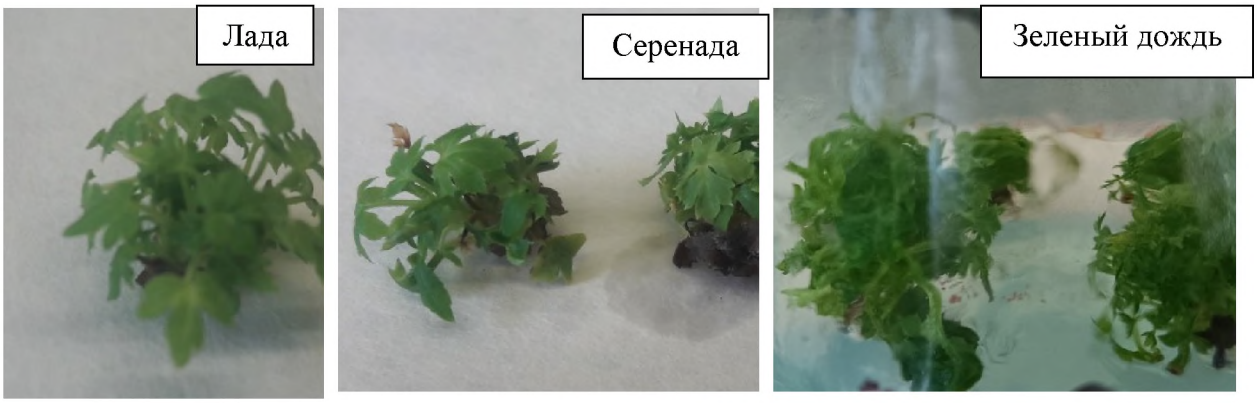


Рисунок 61 – Конгломераты сортов крыжовника после II пассажа

Самые длинные побеги сорта Серенада были на среде МС, и для снижения гормональной нагрузки их пересаживали на безгормональную среду, на которой отмечалось корнеобразование у 52,4 % побегов. Через 4 недели укорененные побеги пересадили субстрат для адаптации к условиям *ex vitro* (рис. 62), не укорененные побеги пересаживали для дальнейшего размножения на среду МС.

Рисунок 62 – Побеги крыжовника сорта Серенада на этапе адаптации и доращивания

Оценка влияния комплекса биопрепаратов и удобрений на развитие растений земляники садовой при адаптации ex vitro

Адаптация растений к нестерильным условиям *ex vitro* - завершающий этап клонального микроразмножения растений. Эффективность адаптации растений определяется несколькими критериями, в том числе может зависеть от вида культуры, почвенной смеси для адаптации, влажности, температуры воздуха, спектрального состава света. В связи с этим, необходимо подобрать оптимальные условия для адаптации побегов, при которых будет активно формироваться корневая система.

Адаптацию укорененных побегов земляники садовой начали после четвертого пассажа. В качестве субстрата использовали смесь готового универсального грунта, вермикулита и перлита, в соотношении 3:1:1.

Адаптацию проводили в микропарниках с кассетами, +22…+26 °С, освещенности 4,5 тыс. люкс, при фотопериоде 16/8 (день/ночь – 16/8).

Побеги высаживали в кассеты объёмом 95 мл, кассеты помещали в мини парник с крышкой, для создания высокой влажности воздуха – 95 %, провели пролив раствором минеральных солей (1/2 по составу Мурасиге-Скуга).

Размер растений для адаптации составлял 3-3,5 см в высоту, 3-4 листа, длина корневой системы 2,5-3 см.

Применение препаратов Агринос 1, Агринос 2 и Энерген Экстра (характеристика и схема применения, см. п. 3.2) при адаптации растений земляники садовой, привело к увеличению вегетативной массы и корневой системы растений.

Использование комплекса биостимуляторов позволило повысить уровень адаптации растений к нестерильным условиям, выход адаптированных растений был на 5,5-13,3 % выше, чем в контроле и варьировал в пределах 85,6 - 92,1 % (рис. 63). Однако, в большей степени, обработка комплексом препаратов Агринос 1+Агринос 2+ Энерген Экстра способствовала развитию корневой системы и нарастанию надземной массы растений.

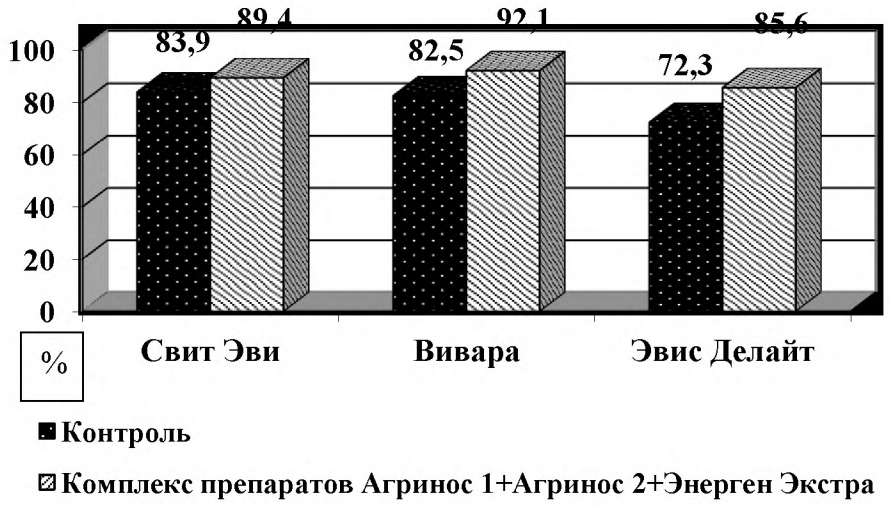


Рисунок 63 – Выход адаптированных растений земляники, %

Средняя высота растений на фоне применений препаратов была выше в 1,3-2,1 раза, чем в контроле и составила у земляники сорта Свит Эви – 8,3 см, Вивара – 11,4 см, Эвис Делайт – 6,2 см (рис. 64).

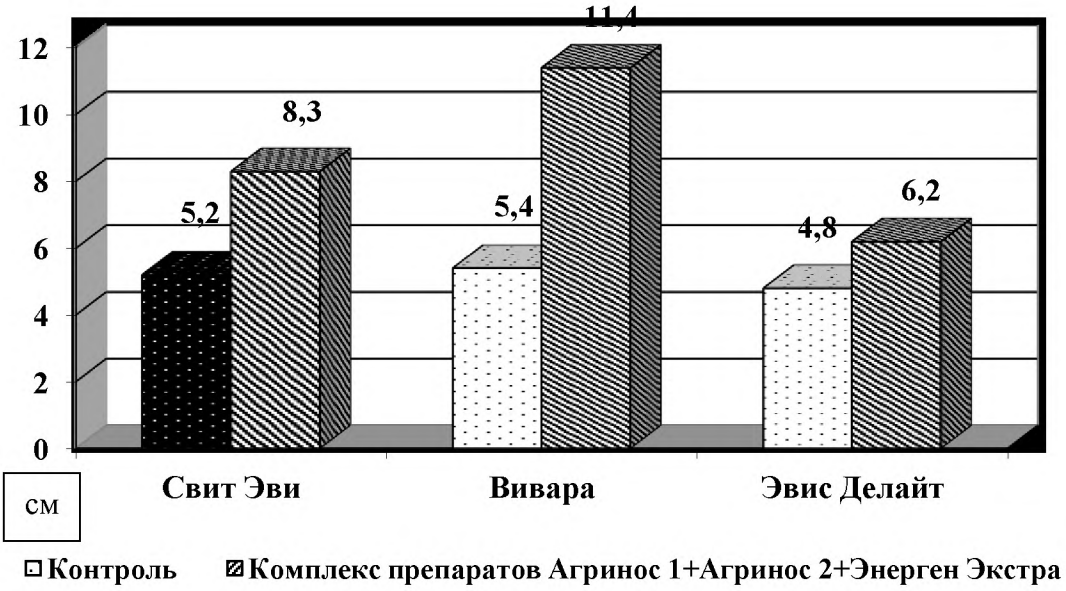


Рисунок 64 – Влияние комплекса биопрепаратов на рост земляники садовой при адаптации *ex vitro*

В контрольном варианте этот показатель составлял у сорта Свит Эви – 5,2 см, Вивара – 5,4 см, Эвис Делайт – 4,8 см.

Также отмечено нарастание надземной массы растений в варианте с обработкой препаратами. Среднее количество листьев было выше на 70,1 % у сорта Свит Эви и составило 8,3 шт. на растение, у сорта Вивара выше на 57,7 % - 8,2 шт. на растение, у растений сорта Эвис Делайт на 32,5 % и составило 5,3 шт. на растение (рис. 65). В контрольных вариантах этот показатель варьировал от 4,0 до 5,2 листьев на растение.

Применение комплекса биостимуляторов Агринос 1, содержащий активные микроорганизмы и Агринос 2 и Энерген Экстра, содержащие аминокислоты, комплекс ферментов и основных микроэлементов способствовало также нарастанию корневой массы.

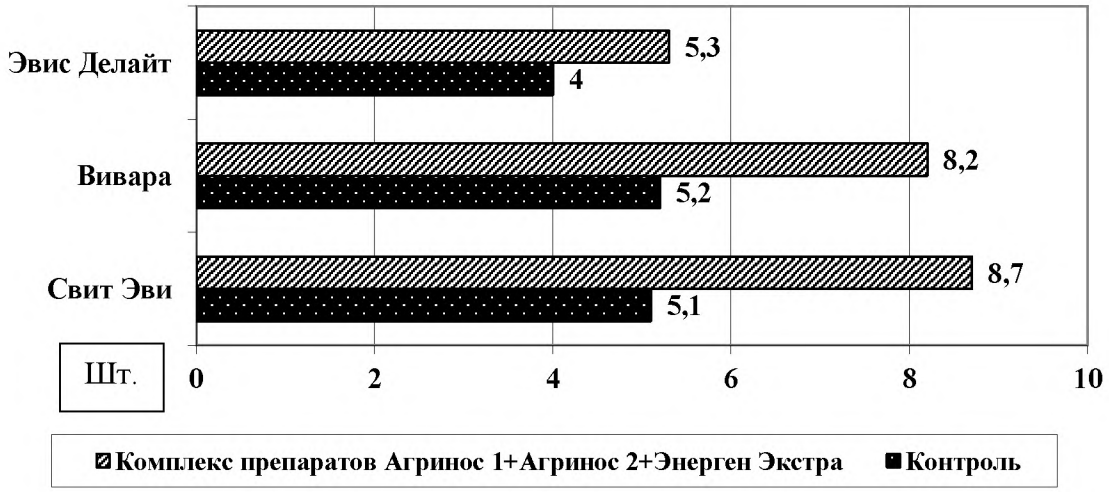


Рисунок 65 – Влияние комплекса препаратов на образование листьев растений земляники

Длина корневой системы в варианте с применением препаратов была в пределах 12,3-15,1 см и составляла в среднем у сорта Свит Эви 12,3 см, у сорта Вивара 15,1 см, у сорта Эвис Делайт - 13,2 см (рис. 66).

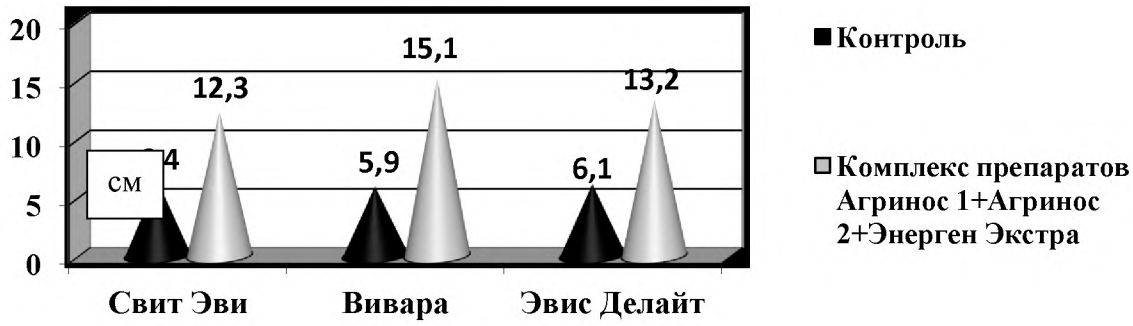


Рисунок 66 – Влияние препаратов Агринос 1, Агринос 2 и Энерген Экстра на развитие корневой системы земляники

В контрольным варианте длина основной массы корней варьировала в пределах 5,9-6,4 см и составляла с среднем у сорта Свит Эви 6,4 см, у Вивары – 5,9 см, у Эвис Делайт - 6,4 см.

Таким образом, в результате выполненных исследований установлено положительное влияние комплексного применения биостимуляторов Агринос 1, Агринос 2 и Энерген Экстра на адаптивность к условиям *ex vitro* земляники садовой сортов Свит Эви, Вивара и Эвис Делайт. На основе результатов

исследований, полученных в отчетном периоде, а также за 2022 год разработан способ: «Способ повышения качества посадочного материала земляники садовой» (Fragaria L.) к условиям ex vitro» - заявка на патент на изобретение №2023124330 от 19.09.2023.

3.3.3 Разработка технологий выращивания посадочного материала родов *Malus, Prunus, Fragaria* в условиях *in vivo*, основанные на применении микробиологических препаратов

Оценка действия микробиологического препарата на рост растений подвоев яблони

В результате исследований установлено положительное влияние микробиологического препарата на основе микоризообразующих грибов рода *Glomus* на общее состояние и ростовую активность подвоев яблони в большинстве вариантов опытов (табл. 22, 23).

Таблица 22 – Размеры подвоев яблони СК 3 и СК 7, обработанных микробиологическим препаратом (ОПХ «Центральное», г. Краснодар)

Вариант (опыт №1)	Размеры подвоев			% подвоев с боковыми ветвями	Кол-во боковых побегов, шт./раст.	Средняя длина бокового побега, см
	диаметр штамба подвоя, мм	высота подвоя, см	сумма длины приростов, см			
Подвой СК 3						
Контроль	9,2	73,8	76,0	57,1	0,8	22,1
0,2 г/растение	9,6	77,2	83,1	58,8	1,2	18,2
0,4 г/растение	10,7	78,4	107,8	86,7	1,7	26,3
1 г/растение	10,6	79,4	101,5	84,8	1,6	24,4
2 г/растение	10,1	81,9	99,7	84,2	1,5	22,6
Подвой СК 7						
Контроль	10,3	61,6	68,7	51,6	0,7	33,3
0,2 г/растение	10,4	69,0	79,6	54,8	0,7	36,5
0,4 г/растение	10,4	80,7	89,0	51,4	0,6	38,4
1 г/растение	11,2	83,2	113,4	64,9	1,1	41,
2 г/растение	10,5	82,3	112,0	73,7	1,	37,1

Отмечено увеличение диаметра штамба растений подвоев по сравнению с контролем во всех вариантах опыта, причем у подвоя СК 3 достоверно наиболее эффективными были дозы препарата 0,4 и 1 г/растение, а у подвоя СК 7 – 1 г/растение.

Усиление ростовой активности проявилось также в увеличении линейного роста растений – их высоты. У подвоя СК 3 выше контрольных были все обработанные микробиологическим препаратом растения, хотя это превышение статистически не достоверно. Растения подвоя СК 7 оказались более отзывчивыми: достоверное увеличение высоты растений отмечено при дозах препарата 0,4; 1 и 2 г/растение.

Помимо увеличения линейного роста, выявлено положительное влияние препарата на ветвление растений подвоев яблони в 1 поле питомника. При этом прослеживается сортовая специфика в отзывчивости различных типов подвоев на этот агроприем: у растений подвоя СК 3 при дозах 0,4; 1 и 2 г/растение процент растений с боковыми побегами увеличился в 1,5 раза, в вариантах с подвоем СК 7 это преимущество было меньше и наблюдалось только при дозах биопрепарата 1 и 2 г/растение.

Также отмечено положительное влияние этого элемента технологии на количество боковых побегов в расчете на одно растение. У растений подвоя СК 3 выявлено достоверное увеличение при дозах препарата 0,4; 1 и 2 г/растение, у растений подвоя СК 7 – при дозах 1 и 2 г/растение.

Увеличение средней длины боковых побегов в большинстве вариантов опыта было несущественным, за исключением варианта с дозой 1 г/растение у растений подвоя СК 7.

Наиболее информативным показателем ростовой активности является сумма длины всех приростов растения, которая отражает сортовую специфику особенностей роста и степени ветвления различных типов подвоев яблони. По этому показателю по обоим подвоям установлено достоверное преимущество вариантов с дозами биопрепарата 0,4; 1 и 2 г/растение.

Установлено, что наиболее эффективным было применение препарата на подвое яблони СК 3 в дозе 0,4 г/растение, а на подвое СК 7 – 1 г/растение.

В опыте № 2 исследовались другие подвои яблони (М 9 и СК 4) и увеличенная доза микробиологического препарата (табл. 23).

Таблица 23 – Размеры подвоев яблони М 9 и СК 4, обработанных микробиологическим препаратом (ОПХ «Центральное», г. Краснодар)

Вариант	Размеры подвоев			% подвоев с боковыми ветвями	Кол-во боковых побегов, шт./раст.	Средняя длина бокового побега, см
	диаметр штамбика подвоя, см	высота подвоя, см	сумма длины приростов, см			
Подвой М 9						
Контроль	5,4	35,3	25,1	55,0	1,4	3,6
0,5 г/растение	4,9**	34,6	26,7	72,2	1,8	5,3
1,0 г/растение	4,9**	31,4**	29,1	84,6	2,2*	6,6**
2,0 г/растение	5,4	33,5	33,5**	91,3	2,2**	7,4**
4,0 г/растение	5,8*	33,4	33,7**	69,7	1,8	8,9**
Подвой СК 4						
Контроль	6,1	26,4	25,3	64,5	2,0	7,2
0,5 г/растение	6,3	30,3**	31,7	94,3	2,7*	6,5
1,0 г/растение	6,2	26,1	32,0	81,6	1,9	12,5**
2,0 г/растение	6,2	22,6*	33,3	90,0	1,8	15,2**
4,0 г/растение	5,9	21,7*	27,5	92,3	1,6	13,9**

В результате анализа показателей ростовой активности растений подвоя М 9 выявлено, что основной показатель усиления роста – сумма длины приростов – был выше контроля во всех вариантах опыта, причем достоверное превышение отмечено в вариантах с дозами препарата 2 и 4 г/растение. Данное увеличение обусловлено большим ветвлением растений и существенным увеличением длины разветвлений, при этом практически не изменилась высота растений (за исключением варианта с дозой 1 г/растение). Меньший, чем в контроле, диаметр штамба подвоев в вариантах с дозой препарата 0,5 и 1 г/растение может быть обусловлен также существенно более сильным ветвлением растений.

Влияние микробиологического препарата на силу роста растений подвоя яблони СК 4 было незначительным и проявилось, в основном, в существенном увеличении длины боковых приростов. При этом в варианте с максимальной

дозой 4 г/растение наблюдалось снижение ростовой активности по сравнению с контролем и другими вариантами.

Таким образом, в результате испытаний влияния применения микробиологического препарата на основе грибов арбускулярной микоризы установлено его положительное влияние на ростовую активность растений подвоев яблони М 9, СК 3, СК 7 в большинстве вариантов опытов. Существенного положительного влияния действия препарата на растения подвоя СК 4 не выявлено.

Отмечена сортоспецифичность в отзывчивости различных типов подвоев яблони на применение препарата:

- у растений подвоя СК 3 увеличились диаметр штамба, процент растений с боковыми побегами и количество боковых побегов на растении;

- у растений подвоя СК 7 увеличились, прежде всего, рост растений, а также количество боковых побегов в расчете на одно растение и их длина;

- у растений подвоя М 9 усилилось ветвление и существенно увеличилась длина разветвлений, при этом практически не изменилась высота растений.

Установлено, что наиболее эффективными дозами микробиологического препарата для усиления роста растений при выращивании подвоев яблони являлись:

- для СК 3 – 0,4 и 1 г/растение

- для СК 7 – 1 и 2 г/растение

- для М 9 – 2 и 4 г/растение.

Таким образом, предложен элемент технологии выращивания посадочного материала яблони (подвоев), заключающийся в применении микробиологического биопрепарата в плодовом питомнике для улучшения состояния и усиления роста растений клоновых подвоев яблони.

Изучение совместного влияния микробиологического фунгицида многофункционального действия Гамаир и препаратов рострегулирующего действия на укореняемость одревесневших подвоев для крупнокосточковых культур в первом поле питомнгика

Нами проведены испытания по использованию микробиологического препарата Гамаир при обработках одревесневших черенков подвоев сливы против грибных и бактериальных заболеваний перед посадкой их в почву, который зарегистрирован как фунгицид [129]. Действующее вещество *Bacillus subtilis,* штамм М-22 ВИЗР, регистрационный номер: 139-02-2349-1, содержание действующего вещества: титр не менее 10^9 КОЕ/г. Способ проникновения: контактный пестицид, системный пестицид. Характер действия: защитный пестицид, иммунизирующий фунгицид, лечащий фунгицид. Его преимущество перед химическими фунгицидами, особенно при сравнении с фундазолом (наиболее часто применяемого при обработках черенков в промышленных питомниках):

1) относится к 3 классу опасности, т.е. малоопасный для пчел, препарат, экологически чист, не содержит химических соединений.

2) разрешен к применению в личных подсобных хозяйствах.

3) срок хранения: 3 года со дня изготовления, что также является преимуществом перед другими микробиологическими препаратами с коротким сроком действия.

4) применение подобных препаратов — основа получения экологически чистой продукции.

В задачи входило изучение влияния сочетаний препарата фунгицидного действия Гамаир и росткорректирующих препаратов на получение качественного посадочного материала, без признаков поражения корневым раком.

Изучался эффект от сочетания препарата Гамаир с препаратами, влияющих на ускорение процесса образование корней: Радифарм, Циркон, ИМК, ФитАктив Экстра.

Циркон (рострегулирующий препарат) [129] изготавливается из природного сырья - эхинацеи пурпурной. Этот регулятор роста нормализует обмен веществ, является мощным иммуномодулятором. Помимо прочего обладает фунгицидным (противогрибковым) действием и обеспечивает защиту растений от засухи в условиях юга России.

Индолил-3-масляная кислота (ИМК) (экспериментальный препарат, рострегулирующий) –растительный гормон из класса ауксинов, который встречается в природе и играет ключевую роль в стимуляции роста и развития растений. ИМК является одним из наиболее распространенных и эффективных стимуляторов корневого образования, поскольку она стимулирует клетки на стебле или черешке для создания корней. Когда растение обрабатывается ИМК, оно быстрее развивает корни, это обеспечивает лучшую поглощение воды и питательных веществ, а также укрепляет растение.

Радифарм (экспериментальный препарат, рострегулирующий) это препарат, содержащий полисахариды, стероиды глюкозидов, аминокислоты и бетаин, обогащенный витаминами и микроэлементами, разработанный для развития боковых и дополнительных корней (вторичная корневая система), обеспечивая равномерное развитие всей корневой системы растения.

Препарат ФитАктив Экстра **(экспериментальный препарат,** рострегулирующий) Препарат представляет собой водный раствор фитогормона направленного действия, содержащий индолилмасляную кислоту на фуллереновом носителе. Действующее вещество: Препаративная форма Водная эмульсия Ауксин-фуллеренового комплекса 2-этил-индол-3-n-пропилено-3,6:1,2, фуллерен – водный раствор 1 г/л 1Н-индолил-3-этановой кислоты на фуллереновом носителе, 1 г/л.

В результате исследований отмечен положительный эффект при использовании в технологиях размножении клоновых подвоев сочетания микробиологического препаратом Гамаир с препаратом ИМК. Практически по всем вариантам опыта отмечено увеличение выхода укорененных подвоев

при использовании этих веществ, до 39 %, в зависимости от генотипов подвоев (рисунок 67, 68).

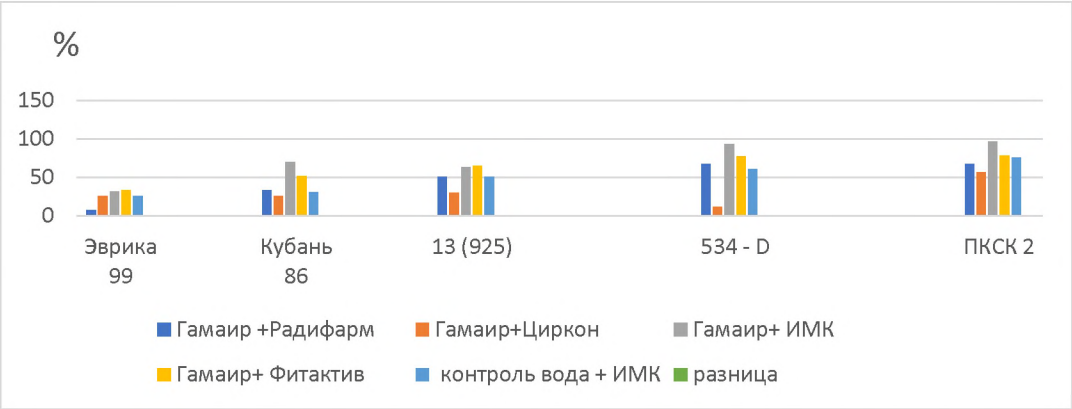


Рисунок 67 – Процент укоренившихся подвоев при использовании микробиологического препарата Гамаир и росткорректирующих препаратов

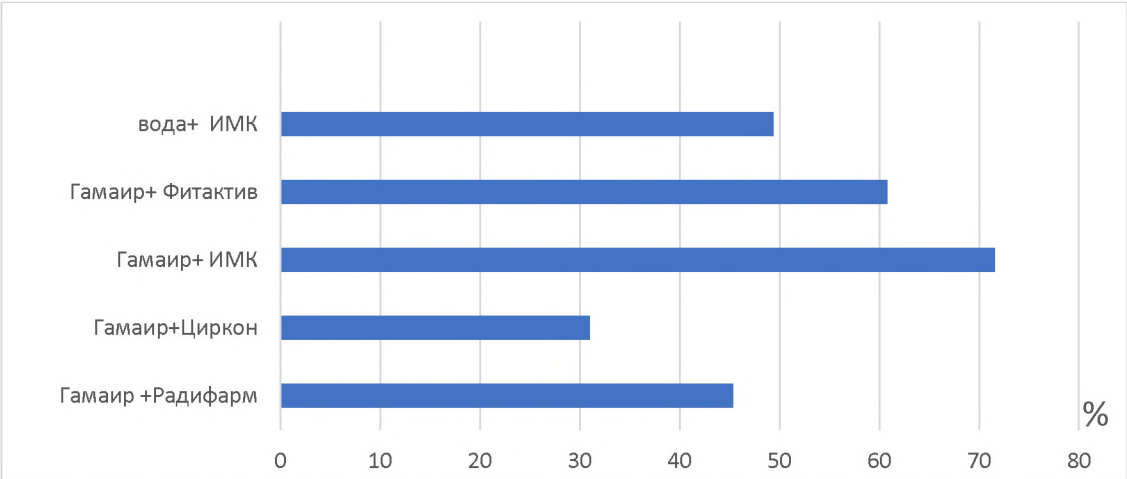


Рисунок 68 – Влияние препаратов на укореняемость подвоев

Наибольший выход подвоев в условиях первого поля питомника при выращивании на богаре выявлен у подвоя ПК СК 2 (рис. 69).

Отмечено, что при использовании препарата Гамаир не наблюдалось поражение корневым раком.

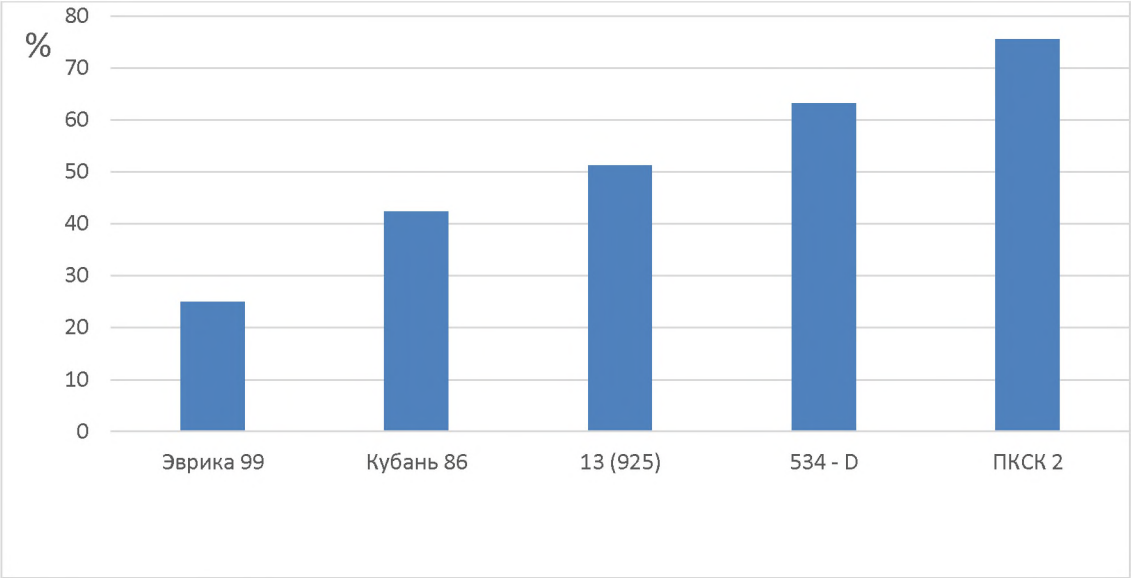


Рисунок 69 – Влияние генотипов на выход укорененных растений

Влияние биопрепаратов на эффективность адаптации *in vivo* земляники садовой

Этап адаптации микрорастений к нестерильным условиям ex vitro является одним из проблематичных этапов в процессе получения здорового посадочного материала земляники с использованием методов микроклонального размножения.

Растения, выращенные in vitro, очень нежные, поскольку процесс микроразмножения в культуральном сосуде проходит в условиях высокой влажности, контролируемых температур и низкой интенсивности света. В связи с этим у таких растений отсутствуют защитные механизмы: восковая кутикула, регуляция устьиц, листовые волоски, что делает их весьма уязвимыми для пересыхания под воздействием условий среды после пересадки растений из условий in vitro в ex vitro.

Большинство растений, выращиваемых в условиях in vitro, требуют некоторого периода акклиматизации, чтобы обеспечить выживание и наращивания вегетативной массы при переносе в почву. В связи с этим актуально использование натуральных биостимуляторов для улучшения общего состояния здоровья, роста и жизнеспособности растений, выращенных в условиях in vitro, а также не представляющих экологического риска для

окружающей среды. Помимо этого, улучшение усвоения питательных веществ - одно из преимуществ использования биостимуляторов, связанное с их способностью повышать микробиологическую и ферментативную активность почвы, обусловленную влиянием на структуру корня, а также растворимость и транспортабельность микронутриентов.

Азотные бактерии являются одним из компонентов биостимуляторов для садовых культур. Биостимуляторы, содержат микроорганизмы, которые свободно живут в почве, либо являются симбиотическими с растениями, и вносят прямой или косвенный вклад в азотное и фосфорное питание растений. Азотные бактерии способны производить гормоны, витамины и другие вещества, необходимые для роста и развития растений. Атмосферный азот фиксируется микроорганизмами, которые являются симбиотическими и несимбиотическими по своей природе. По данным ряда источников, обработка растений Azotobacter chroococcum во время пересадки из одних условий в другие, приводит к существенному увеличению роста и урожайности сельскохозяйственных культур. Принимая во внимание эти факты, настоящее исследование было инициировано с целью изучения влияния биопрепаратов, в состав которых входят бактерии *Azotobacter vinelandii* и *Clostridium pasteurinum*, на рост, развитие и адаптацию земляники садовой, выращенной в условиях in vitro, а также изучение влияния биопрепаратов на агрохимические характеристики почвогрунта, применяемого для адаптации растений земляники садовой к нестерильным условиям *ex vivo*.

Объектами исследований были микрорастения земляники садовой ремонтантного сорта *Свит Эви* и розовоцветковый ампельный гибрид земляники садовой селекции СКФНЦСВВ - *3-27-12*, выращенные и прошедшие процесс оздоровления в условиях *in vitro*.

Основные характеристики применяемых препаратов: Агринос 1 - представляет собой продукт, содержащий активные микроорганизмы, такие как Azotobacter vinelandii и Clostridium pasteurinum, способные производить и выделять органические кислоты как продукты жизнедеятельности,

растворяющие минерализованные соли и переводящие K+, Mg+ и Ca++ из органических форм в минеральные, более доступные для растений. Агринос 2 - продукт, полученный методом микробной ферментации, содержащий L – аминокислоты (4%), хитин, хитозан, глюкозамин (4%), комплекс ферментов, молочную кислоту, полисахариды, углерод, азот и другие основные микроэлементы, используемые растениями для улучшения здоровья и продуктивности в течение различных стадий роста и развития, а также в различных условиях выращивания. Препарат улучшает толерантность растений к различным стрессам (абиотические, биотические и физиологические) и поддерживает процесс фотосинтеза.

После пересадки микрорастений земляники садовой из стерильных условий in vitro в нестерильные ex vitro в кассеты с почвогрунтом на 9 ячеек (размер кассеты (одной): 18х13,5х6,0 см размер одной ячейки: 5,5х4 см / 95 мл) микробиологические препараты вносили путем полива водным раствором биопрепарата Агринос 1 в концентрации 5 мл/л, и через 7 дней после высадки ферментативным гидролизатом белковых субстратов - Агринос 2 (5 мл/л, также однократно) и спустя 21 день после высадки микрорастений применяется стимулятор роста (фитогормон) Энерген Экстра путем опрыскивания, в концентрации 0,6г/л на 40кв.м. Внесение Энерген Экстра проводили путем опрыскивания микрорастений после 21 дня адаптации в нестерильных условиях и в дальнейшем с периодичностью 1 раз в 14 дней.

В результате проведенных экспериментальных исследований было установлено, что на фоне применения препаратов высота растений земляники *ex vitro* и количество листьев спустя, 45 дней после обработки, были значительно больше при использовании препарата Агринос 1 и Агринос 2. Максимальная высота большинства растений на фоне применений препаратов составила у ремонтантного сорта *Свит Эви* – 8 см, у гибрида 3-27-12 – 9,7см (рис. 70). В контрольном варианте этот показатель был ниже соответственно на 25 % и 23 %.

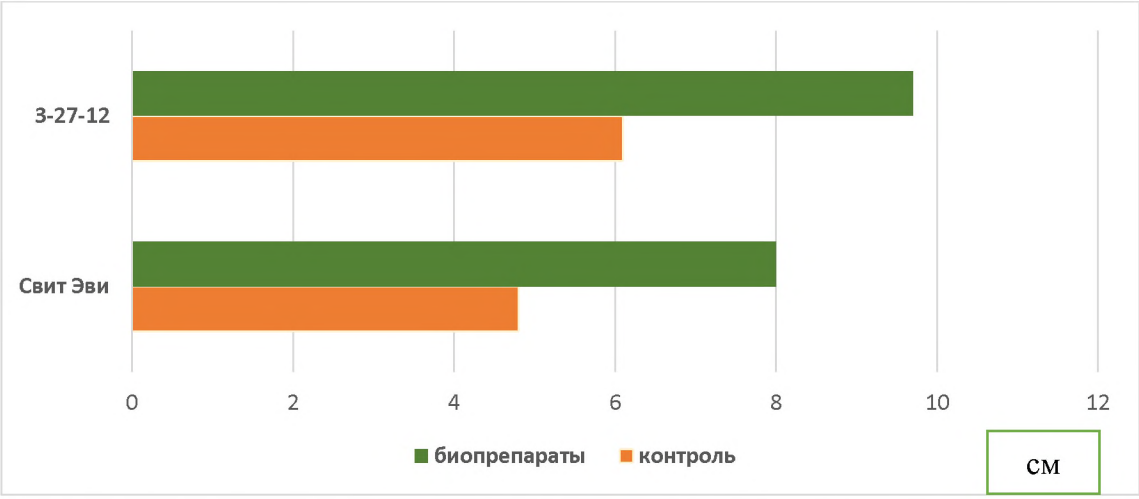


Рисунок 70 – Влияние микробиологических препаратов на рост земляники садовой при адаптации ex vitro

Было также отмечено увеличение количества листьев в вариантах с применением биостимуляторов. Среднее количество листьев у сорта *Свит Эви* составило от 8 до 9 листьев на куст, у розовоцветкового гибрида *3-27-12* от 5 до 6 листьев (рис. 71). В контрольных вариантах эти показатель был ниже на 25-28 %.

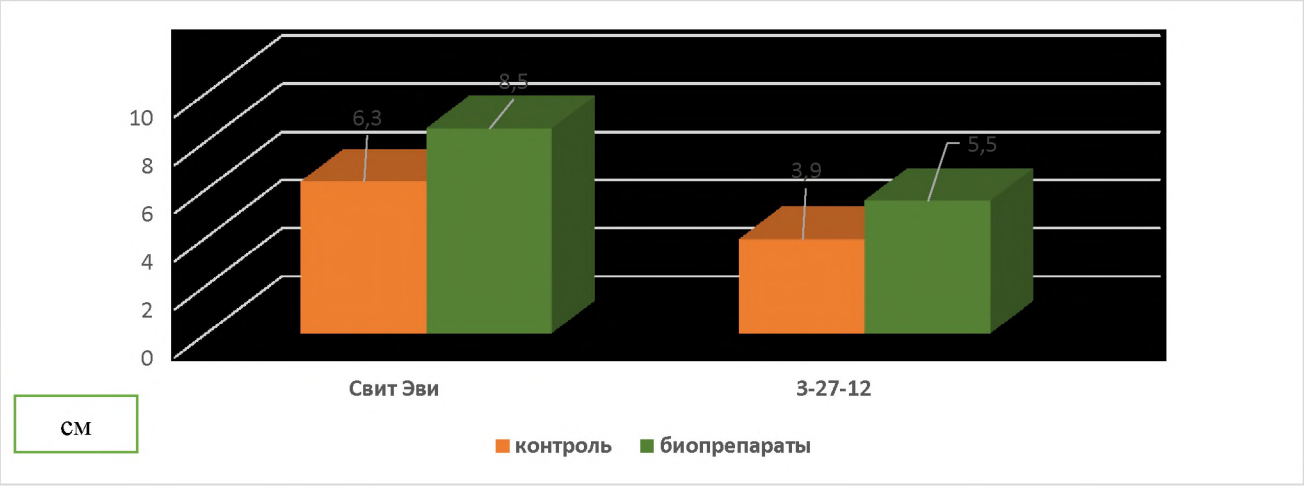


Рисунок 71 – Влияние микробиологических препаратов на количество листьев земляники садовой при адаптации ex vitro

Следует отметить, что все контрольные варианты микрорастений земляники имели тенденцию усыхания и гибели листового аппарата в процессе роста в условиях *ex vitro*, в связи с повышенной чувствительностью

к новым условиям окружающей среды, в то время как у обработанных растений этого не наблюдалось.

Было отмечено, что применение комплекса биостимуляторов Агринос 1, содержащий активные микроорганизмы и Агринос 2, содержащий аминокислоты, комплекс ферментов и основных микроэлементов привело к значительному улучшению корнеобразования. Длина корневой системы в варианте с применением препаратов составляла в среднем 11-12см, в контрольным варианте длина корней варьировала в пределах 4 - 6 см (рис. 72).

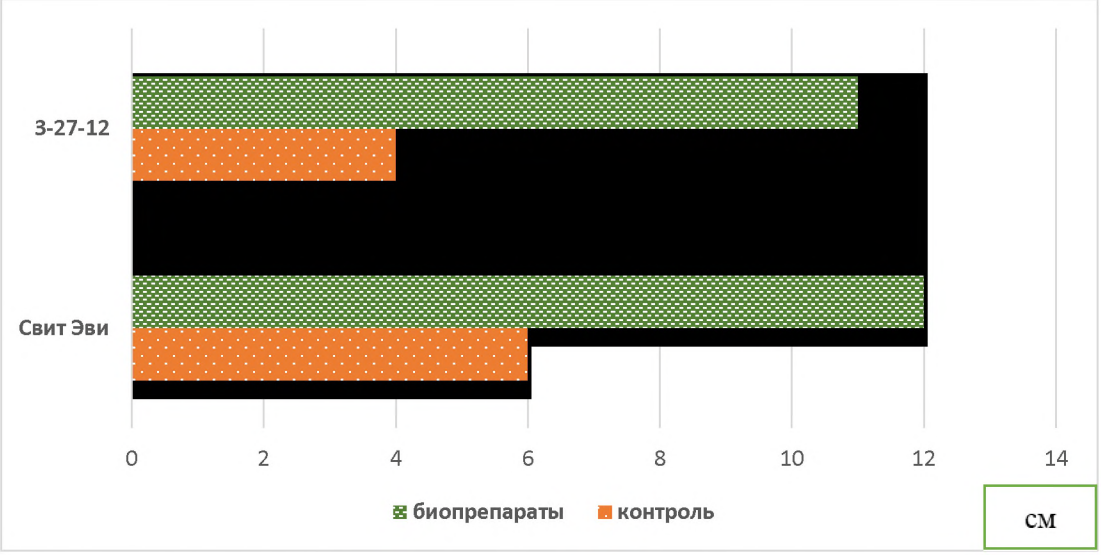


Рисунок 72 – Влияние микробиологических препаратов на развитие корневой системы земляники садовой при адаптации ex vitro

Проведенные исследования по изучение эффективности микробиологических препаратов на адаптивную способность микрорастений земляники садовой, выращенных в условиях *in vitro* показали, что интенсивность вегетативного роста у обработанных вариантов была на 20-25 % выше, по сравнению с контролем. Растения имели более сильную корневую систему (на 5-10 см длиннее, чем в контроле), а, следовательно, и более высокую адаптивную способность к условиям *ex vitro*.

3.3.4 Оптимизация минерального питания растений яблони в питомнике на разных этапах производства посадочного материала

Исследования проводили в условиях Прикубанской зоны плодоводства Краснодарского края в Селекционнно-питомниководческом центре ФГБНУ СКФНЦСВВ, расположенном на базе ООО «ОПХ им. К.А. Тимирязева» (х. Безлесный, Усть-Лабинский район). Почвенный покров представлен черноземами типичными мало- и слабогумусными сверхмощными легкоглинистыми на лёссовидных глинах.

Объектом исследований являлись саженцы деревьев яблони сорта Прикубанское на подвое СК 2У со схемой размещения 1,2 х 0,3 м. Опыт заложен в 2022 г. в первом поле питомника и продолжен в 2023 г. во втором поле питомника. Схема опыта:

Вариант 1. Контроль, без применения удобрений.

Вариант 2. Основное внесение $N_8P_{20}K_{30}$ + фертигация $N_{40}P_{15}K_{25}$.

Вариант 3. Основное внесение $N_{16}P_{40}K_{60}$ + фертигация $N_{80}P_{30}K_{50}$.

Вариант 4. Замачивание корневой системы подвоев в растворе БСка-3 + основное внесение $N_8P_{20}K_{30}$ + фертигация $N_{40}P_{15}K_{25}$.

Вариант 5. Замачивание корневой системы подвоев в растворе БСка-3 + основное внесение $N_{16}P_{40}K_{60}$ + фертигация $N_{80}P_{30}K_{50}$.

Основное внесение удобрений осуществлялось перед высадкой подвоев в первом поле питомника разбросным способом с заделкой минеральных удобрений, для внесения использовали Азотно-фосфорно-калийное удобрение NPKS 8:20:30:2. Фертигацию проводили в первом и втором поле питомника на протяжении вегетационного периода, за сезон было проведено по 15 подкормок. Для внесения использовали водорастворимые минеральные удобрения: NPK 13-40-13, NPK 18-18-18, NPK 3-11-38, Мочевину (N-34,6), Аммиачную селитру (N-46), Моноаммонийфосфат (N-12, P_2O_5-61) Калий сернокислый (K_2O-51), Нитрат кальция концентрированный (N-17, CaO-32).

Замачивание корневой системы подвоя СК 2У осуществляли на 6-8 часов в 10 % растворе микробиологического удобрения БСка-3. Действующим

веществом биопрепарата являются живые культуры: *Trichoderma viride* 256, *Pseudomonas koreensis* Ар33, *Bacillus subtilis* 17, *Bradyrhizobium japonicum* (*Rhizobium japonicum*) 614а.

Оптимизация пищевого режима почвы способствовала существенному усилению ростовой активности саженцев яблони по сравнению с контрольным вариантом. Основное внесение удобрений в ранневесенний период и последующее проведение фертигации на протяжении основной части вегетационного периода обусловило увеличение среднего диаметра ствола подвоя на 11,3-14,5 %, высоты растения на 23,1-30,9 % и суммарного однолетнего прироста на 30,1-35,2 % по сравнению с контролем (табл. 1).

Наибольшее усиление интенсивности ростовых процессов установлено на варианте с замачиванием корневой системы подвоев яблони в растворе микробиологического удобрения БСка-3 и применением однократных доз основного удобрения и фертигации. Применение биопрепарата БСка-3 в сочетании с двойными дозами минеральных удобрений в первом поле питомника не оказало дополнительного эффекта на усиление ростовой активности растений яблони (табл. 24).

Таблица 24 – Влияние пищевого режима на биометрические показатели яблони сорта Прикубанское на подвое СК 2 в первом поле питомника

Варианты опыта	Средний диаметр ствола подвоя, мм	Средняя высота растения, см	Суммарный однолетний прирост, см
Вар. № 1 Контроль, без удобрений	12,4	74,3	168,0
Вар. № 2 Основное внесение $N_8P_{20}K_{30}$ + фертигация $N_{40}P_{15}K_{25}$	13,8	91,5	218,6
Вар. № 3 Основное внесение $N_{16}P_{40}K_{60}$ + фертигация $N_{80}P_{30}K_{50}$	14,2	97,3	227,1
Вар. № 4 БСка-3 + основное внесение $N_8P_{20}K_{30}$ + фертигация $N_{40}P_{15}K_{25}$	14,8	102,4	240,4
Вар. № 5 БСка-3 + основное внесение $N_{16}P_{40}K_{60}$ + фертигация $N_{80}P_{30}K_{50}$	14,9	96,1	234,1
НСР 05	0,9	9,4	14,7

Установлено положительное влияние применения биопрепарата БСка-3 в сочетании с оптимизацией пищевого режима почвы питомника на ростовую активность растений яблони во втором поле питомника (табл. 25). У саженцев яблони сорта Прикубанское установлено увеличение диаметра штамба на 15,7-16,6 %, высоты саженцев на 13,1-15,2 %, количества боковых ветвей на 27,4-29,6 % и средней длины боковых побегов на 42,7-44.2 % по сравнению с контролем. Следует отметить, что различия между опытными вариантами с применением биопрепарата БСка-3 с различными дозами минеральных удобрений были незначительными и находились в пределах ошибки опыта ($НСР_{05}$) (табл. 25).

Таблица 25 – Влияние пищевого режима на биометрические показатели саженцев яблони сорта Прикубанское на подвое СК 2 во втором поле питомника

Варианты опыта	Средний диаметр штамба, мм	Средняя высота саженца, см	Кол-во боковых ветвей, шт./раст.	Средняя длина боковых побегов, см
Вар. № 1 Контроль, без удобрений	22,9	156,6	13,5	26,7
Вар. № 2 Основное внесение $N_8P_{20}K_{30}$ + фертигация $N_{40}P_{15}K_{25}$	25,4	172,9	17,1	34,3
Вар. № 3 Основное внесение $N_{16}P_{40}K_{60}$ + фертигация $N_{80}P_{30}K_{50}$	26,1	178,3	17,5	37,8
Вар. № 4 БСка-3 + основное внесение $N_8P_{20}K_{30}$ + фертигация $N_{40}P_{15}K_{25}$	26,7	180,4	17,2	38,5
Вар. № 5 БСка-3 + основное внесение $N_{16}P_{40}K_{60}$ + фертигация $N_{80}P_{30}K_{50}$	26,5	177,1	17,5	38,1
НСР 05	2,1	13,9	2,9	5,6

Оптимизация пищевого режима почвы питомника позволило получить саженцы яблони сорта Прикубанское преимущественного первого товарного сорта со средней высотой дерева 177,1-180,4 см, в то время как на варианте без применения минеральных и микробиологических удобрений многие саженцы соответствовали второму товарному сорту со средней выстой растения 156,6 см. Согласно техническим требованиям к надземной части однолетних саженцев плодовых культур (ГОСТ Р 59653-2021) выход саженцев первого товарного

сорта при применении приемов регулирования пищевого режима почвы составил 94-96 %. При отсутствии внесения минеральных и микробиологических удобрений выход саженцев первого сорта составил 44,1 %.

Таким образом, использование микробиологического удобрения с живыми культурами *Trichoderma viride* 256, *Pseudomonas koreensis* Ар33, *Bacillus subtilis* 17, *Bradyrhizobium japonicum* (*Rhizobium japonicum*) 614а в сочетании с применением основного удобрения и фертигации способствовало существенному усилению ростовой активности саженцев и получению высококачественного посадочного материала яблони. Применение биопрепарата и однократных доз минеральных удобрений обеспечило снижение доз вносимых минеральных удобрений на 50 % по сравнению с полноценной системой применения удобрений в питомнике при одинаковой эффективности.

3.4 Выводы

Таким образом, в ходе выполненных исследований:

Установлено, что дезинфицирующее средство «Алмадез-эко» показало эффективность обработки на уровне стандарта - 79,1 % (стандарт 83,2 %) при поверхностной стерилизации эксплантов подвоя ПК СК 1, в концентрации 0,5 % рабочего раствора и экспозиции 5 минут, поэтому его можно использовать для дезинфекции эксплантов при введении их в культуру *in vitro*.

Выявлено, что при введении эксплантов винограда с искусственно пробужденных побегов целесообразно использовать модифицированную среду МС (мод. Реброва А.Н.) с внесением в среду 6-БАП 1 мг/л и ИУК 0,5 мг/л. Уровень регенерации повышается на 14,2-32,1 %.

Определено, что у винограда сорта Достойный более высокий уровень регенерации меристем - 62,5-89,4 %, по сравнению с эксплантами сортов Владимир (31,4-65,4 %) и Дмитрий (36,8-77,5 %).

Выявлена сортоспецифичность при введении земляники садовой в культуру in vitro: высокий уровень регенерации эксплантов отмечен только у

гибрида 16-8-18 –75,0 %, сорта Белруби, гибридов 9-12-21 и 8-9-12 приживаемость эксплантов была ниже среднего и составляла 38,5-45,0 %.

Установлено, что подвои ПКГ 18/2 и ПКГ 18/3 в среднем за пассаж формируют 4,7-5,4 побегов, с каждым последующим пассажем количество формирующихся побегов увеличивается, а процент повышения побегообразования снижается с 50-53,6 % после первого пассажа до 2,8-11,3 % после пятого.

Отмечено, что у подвоев для крупнокосточковых культур ПКГ 18/3, ПКГ 18/2, образование побегов идет в большей степени из боковых почек нескольких основных побегов.

Определена наибольшая побегообразовательная активность у гибрида 8-9-12 от 5,2 до 7,3 побегов в зависимости от концентрации 6-БАП, с сорта Белруби и гибрида 16-8-18 средняя – от 4,0 - 4,3 до 7,1- 8,0 побегов на среде с БАП 0,75 мг/л, у гибрида 9-2-21 от 3 до 6,5 побегов (в зависимости от концентрации 6-БАП).

Отмечено, что на среде МС с 6-БАП 0,5 мг/л + ГК 1,0 мг/л у ежевики образуются более длинные побеги длиной 18,5 мм у сорта Лохтей, 25,4 и 24,8 мм у сортов Апачи и Оседж. Данный вариант среды лучше использовать на этапе, предшествующему укоренению.

Установлено, что оптимальным вариантом для этапа микроразмножения ежевики сортов Апачи, Оседж и Лохтей является среда МС с 6-БАП 1 мг/л+ГК 0,5 мг/л, на которой формируются конгломераты, состоящие из 3,9 -5,6 побегов, средней длиной 15,8-20,2 мм;

Определено, что среда МС+6-БАП 1 мг/л подходит для клонального микроразмножения крыжовника сорта Серенада, коэффициент размножения на 2-3 пассаже 2,4-3,6 побегов/эксп., побеги длиной 1,08-1,64 см; побеги длиной менее 0,6 см лучше не разделять, а пересаживать конгломератом.

Выявлено положительное влияние комплексного применения биостимуляторов Агринос 1, Агринос 2 и Энерген Экстра на адаптивную способность земляники садовой сортов Свит Эви, Вивара и Эвис Делайт к

условиям *ex vitro:* повышается выход адаптированных растений на 5,5-13,3 %, и составляет 85,6 - 92,1 %; увеличивается средняя длина побегов на 1,3-2,1 раза, и составляет 6,2- 11,4 см; среднее количество листьев было выше на 70,1 % у сорта Свит Эви и составило 8,3 шт. на растение, у сорта Вивара выше на 57,7 % - 8,2 шт. на растение, у растений сорта Эвис Делайт на 32,5 % и составило 5,3 шт. на растение; длина корневой системы в варианте с применением препаратов была в пределах 12,3-15,1 см, что в 1,9-2,6 раза больше, чем в контрольном варианте (5,9-6,4 см).

Выявлено положительное влияние применения микробиологического биопрепарата на основе арбускулярной микоризы на ростовую активность растений подвоев яблони М 9, СК 3, СК 7. Установлены эффективные дозы микробиологического биопрепарата для усиления роста растений: на подвое яблони СК 3 – 0,4 и 1 г/растение; на подвое яблони СК 7 – 1 и 2 г/растение; на подвое яблони М 9 – 2 и 4 г/растение.

Получен положительный эффект при использовании сочетания микробиологического препарата фунгицидного действия Гамаир и ИМК при укоренении одревесневших черенков в первом поле питомника для крупнокосточковых культур в условиях высоких летних температур юга России.

На основании выполненных исследований разработаны основы технологии для оптимизации минерального питания в питомниках на разных этапах производстве посадочного материала яблони.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения исследований в отчетном 2023 году выполнены все поставленные задачи:

1. Получены новые знания о фенотипическом и генотипическом разнообразии образцов генофонда садовых культур и винограда ФГБНУ СКФНЦСВВ, включая основные адаптивно значимые и селекционно-ценные признаки.

2. Выделены элитные формы, в том числе: элитная форма яблони 12/2-20-22 (Корей × Прима), обладающая иммунитетом к парше; элитная форма груши 17-3-9, выделенная по комплексу ценных признаков: засухоустойчивость, скороплодность и товарные качества плодов; элитная форма айвы 3-3-14, выделена по признаку крупноплодности, имеет хорошее качество плодов; 3 элитные формы косточковых культур: элитная форма черешни – 12-5-2; элитная форма вишни – 17-7-7; элитная форма сливы – 17-2-15; элитная форма винограда Тана 40. 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.

3. Выделены источники хозяйственно ценных признаков, в том числе: яблони – 12/2-21-76 (источник крупноплодности плодов), 12/1-20-46 (источник темно-красной интенсивной окраски плодов); три источника скороплодности ¬ сорт айвы Кубаночка (3-17-49), сорт сливы Йо-Йо, сорт вишни Элегия; источник крупноплодности черешни – сорт Крупноплодная. Виноград: гибридная форма С3 – источник устойчивости к листовой форме антракноза; сорт Северный сладкий – источник морозостойкости. Выделенные источники ценных признаков рекомендуются для включения в дальнейший селекционный процесс по созданию сортов нового поколения с заданными признаками.

4. Создан и передан в государственное сортоиспытание 1 новый иммунный к парше (с геном Rvi6) сорт яблони Эльф осеннего срока созревания; подана заявка на патент передан в Госсортоиспытание сорт винограда Вагра технического направления использования. 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.

5. Выделено 3 донора ценных признаков винограда: гена устойчивости к милдью Rpv3 – Курчанский, гена устойчивости к милдью Rpv12 – Золотце, генов устойчивости к оидиуму Ren3 и Ren9 – Цитронный Магарача.

6. Выполнена экспериментальная апробация 16 мультилокусных SCoT+CDDP-маркеров на сортах айвы обыкновенной и девати локусспецифичных ДНК-маркеров (SSR-маркеры) на подвоях косточковых культур и установлен уровень полиморфизма и определены наиолее перспективные маркеры.

7. Осуществлено генотипирование сортообразцов абрикоса обыкновенного с использованием IRAP-маркеров. Выборка включала 32 генотипа абрикоса как из природных популяций Дагестана, так и культурных сортов из различных экологи-географических групп. Полученные в ходе IRAP генетипирования сведения позволяют утверждать о уникальности дагестанского генофонда абрикоса.

8. Проведено генотипирование 16 сортов винограда различного экогеографичекого происхождения с применением IRAP-маркеров. В процессе анализа родства исследуемых сортов было установлено генетичекое взаимоотношение между задействованными в исследовании экогеографическими группами.

9. Для определения генетической стабильности размножаемой in vitro садовой культуры ежевики обыкновенной были апробированы 10 ISSR маркеров и 6 IRAP маркеров. По результатам апробации были выявлены наиболее перспективные для и анализа генетической стабильности культуры ежевики обыкновенной при микроклонировании: DKS024 и UBC 810.

10. Разработана технология и подана заявка на изобретение «Способ оценки генетической стабильности растений микроклонально размножаемых растений земляники»

11. Усовершенствованы методы оценки генетичекой стабильности in vitro подвоев косточковых культур на основе ISSR и IRAP ДНК-маркеров. Определены оптимальные значения концентраций основных реагентов ПЦР-смеси для ISSR и IRAP генотипирования. Они позволяют безошибочно проводить детекцию амплифицируемых фрагментов в спектрах, что повышает эффективность анализа генетической стабильности.

12. Разработана методика генотипирования сортов и идентификации генов хозяйственно-ценных признаков яблони на основе использования восьми микросателлитных ДНК-маркеров, два из которых (MdPG1SSR10kd и Md-Exp7-SSR) позволяют идентифицировать аллельные варианты генов, контролирующих плотность мякоти плодов яблони. Разработанная методика (технология) оформлена в виде Стандарта организации (СТО 00668034-168-2023).

13. На основании анализа и обобщения комплекса научных результатов полученных в области маркер-опосредованной селекции яблони даны методические рекомендации по использованию ДНК-маркерных систем ценных генов в селекционном процессе данной культуры.

14. Усовершенствованы методы идентификации вирусов и фитоплазм семечковых семечковых культуры – яблони. На основе использования метода ПЦР в реальном времени предложен метод ПЦР-диагностики вирусов ямчатости древесини и бороздчатости коры яблони. Апробированный протокол экстракции ДНК, являющийся менее дорогостоящей альтернативой

испольуемым ранее наборам для экстракции «Фитосорб» позволяет эффективно проводить ПЦР-диагностику фитоплазмы пролиферации яблони.

15. Даны методические рекомендации по использованию ДНК-маркерных систем ценных генов в селекционном процессе данной культуры. Усовершенствованы методы идентификации вирусов и фитоплазм: «Методика идентификации вирусов яблони методом ПЦР», оформленная в виде Стандарта организации (СТО 00668034-166-2023); «Методика идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 3 (Grapevine leafroll-associated virus 3) с помощью ПЦР в реальном времени», оформленная в виде Стандарта организации (СТО 0668034-167-2023).

16. Установлено, что дезинфицирующее средство «Алмадез-эко» показало эффективность обработки на уровне стандарта - 79,1 % (стандарт 83,2 %) при поверхностной стерилизации эксплантов подвоя ПК СК 1, в концентрации 0,5 % рабочего раствора и экспозиции 5 минут, поэтому его можно использовать для дезинфекции эксплантов при введении их в культуру *in vitro*.

17. Выявлено, что при введении эксплантов винограда с искусственно пробужденных побегов целесообразно использовать модифицированную среду МС (мод. Реброва А.Н.) с внесением в среду 6-БАП 1 мг/л и ИУК 0,5 мг/л. Уровень регенерации повышается на 14,2-32,1 %.

18. Определено, что у винограда сорта Достойный более высокий уровень регенерации меристем - 62,5-89,4 %, по сравнению с эксплантами сортов Владимир (31,4-65,4 %) и Дмитрий (36,8-77,5 %).

19. Выявлена сортоспецифичность при введении земляники садовой в культуру in vitro: высокий уровень регенерации эксплантов отмечен только у гибрида 16-8-18 –75,0 %, сорта Белруби, гибридов 9-12-21 и 8-9-12 приживаемость эксплантов была ниже среднего и составляла 38,5-45,0 %.

20. Установлено, что подвои ПКГ 18/2 и ПКГ 18/3 в среднем за пассаж формируют 4,7-5,4 побегов, с каждым последующим пассажем количество формирующихся побегов увеличивается, а процент повышения

побегообразования снижается с 50-53,6 % после первого пассажа до 2,8-11,3 % после пятого. У подвоев для крупнокосточковых культур ПКГ 18/3, ПКГ 18/2, образование побегов идет в большей степени из боковых почек нескольких основных побегов.

21. Определена наибольшая побегообразовательная активность у гибрида8-9-12 от 5,2 до 7,3 побегов в зависимости от концентрации 6-БАП, с сорта Белруби и гибрида 16-8-18 средняя – от 4,0 - 4,3 до 7,1- 8,0 побегов на среде с БАП 0,75 мг/л, у гибрида 9-2-21 от 3 до 6,5 побегов (в зависимости от концентрации 6-БАП).

22. Отмечено, что на среде МС с 6-БАП 0,5 мг/л + ГК 1,0 мг/л у ежевики образуются более длинные побеги длиной 18,5 мм у сорта Лохтей, 25,4 и 24,8 мм у сортов Апачи и Оседж. Данный вариант среды лучше использовать на этапе, предшествующему укоренению. Установлено, что оптимальным вариантом для этапа микроразмножения ежевики сортов Апачи, Оседж и Лохтей является среда МС с 6-БАП 1 мг/л+ГК 0,5 мг/л, на которой формируются конгломераты, состоящие из 3,9 -5,6 побегов, средней длиной 15,8-20,2 мм.

23. Определено, что среда МС+6-БАП 1 мг/л оптимальна для клонального микроразмножения крыжовника сорта Серенада, коэффициент размножения на 2-3 пассаже 2,4-3,6 побегов/эксп., побеги длиной 1,08-1,64 см; побеги длиной менее 0,6 см лучше не разделять, а пересаживать конгломератом.

24. Выявлено положительное влияние комплексного применения биостимуляторов Агринос 1, Агринос 2 и Энерген Экстра на адаптивную способность земляники садовой сортов Свит Эви, Вивара и Эвис Делайт к условиям *ex vitro:* повышается выход адаптированных растений на 5,5-13,3 %, и составляет 85,6 - 92,1 %; увеличивается средняя длина побегов на 1,3-2,1 раза, и составляет 6,2- 11,4 см; среднее количество листьев было выше на 70,1 % у сорта Свит Эви и составило 8,3 шт. на растение, у сорта Вивара выше на 57,7 % - 8,2 шт. на растение, у растений сорта Эвис Делайт на 32,5 % и

составило 5,3 шт. на растение; длина корневой системы в варианте с применением препаратов была в пределах 12,3-15,1 см, что в 1,9-2,6 раза больше, чем в контрольном варианте (5,9-6,4 см). Подана заявка на изобретение «Способ повышения адаптивной способности микрорастений земляники садовой (Fragaria L.) к условиям ex vitro».

25. Выявлено положительное влияние применения микробиологического биопрепарата на основе арбускулярной микоризы на ростовую активность растений подвоев яблони М 9, СК 3, СК 7. Установлены эффективные дозы микробиологического биопрепарата для усиления роста растений: на подвое яблони СК 3 – 0,4 и 1 г/растение; на подвое яблони СК 7 – 1 и 2 г/растение; на подвое яблони М 9 – 2 и 4 г/растение.

26. Получен положительный эффект при использовании сочетания микробиологического препарата фунгицидного действия Гамаир и ИМК при укоренении одревесневших черенков в первом поле питомника для крупнокосточковых культур в условиях высоких летних температур юга России.

27. На основании выполненных исследований разработаны основы технологии для оптимизации минерального питания в питомниках на разных этапах производстве посадочного материала яблони.

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

29. 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.

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. – C. 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 // Hortic 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 Salgotra RK, Chauhan BS. Genetic Diversity, Conservation, and Utilization of Plant Genetic Resources. *Genes*. 2023; 14(1):174. https://doi.org/10.3390/genes14010174

34 Конарев А.В. Использование молекулярных маркеров в работе с генетическими ресурсами растений // Сельскохозяйственная биология. – 1998. – №5. – С. 3-25.

35 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.

36 Nybom H., Lacis 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.

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

38 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.

39 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.

40 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

41 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.

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

43 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.

44 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.

45 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.

46 Silfverberg-Dilworth, E. Microsatellite markers spanning the apple (Malus domestica Borkh.) genome // Tree Genetics & Genomes. –2006. – Vol. 2. – P. 202-224.

47 Седов Е.Н., Янчук Т.В., Корнеева С.А. Направления и краткие итоги селекции яблони // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2020. – № 3. – С. 8-12. DOI: 10.30850/vrsn/2020/3/8-12

48 Якуба Г.В. Экологизированная защита яблони от парши в условиях климатических изменений: монография. – Краснодар: СКЗНИИСиВ; 2013.

49 Parisi L, Lespinasse Y, Guillaumes J, Kru¨ger J, 1993. A new race ofVenturia inaequalisvirulent to apples with resistance due to theVfgene.Phytopathology83, 533–7.

50 Супрун И.И., Егоров Е.А., Насонов А.И., Лободина Е.В., Токмаков С.В., Степанов И.В. Маркер-опосредованный отбор в создании селекционных образцов и комплексных доноров яблони с устойчивостью к парше и повышенным потенциалом лежкоспособности плодов // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2023. – Т. 184, № 3. – С. 135-145.

51 Ji Y., Wang A. Recent advances in phytohormone regulation of apple-fruit ripening // Plants. – 2021. – Vol. 10(10). – P. 2061. DOI: 10.3390/ plants10102061.

52 Longhi S., Cappellin L., Guerra W., Costa F. Validation of a functional molecular marker suitable for markerassisted breeding for fruit texture in apple (Malus domestica Borkh.) // Molecular Breeding. – 2013. – Vol. 32(4). – P. 841-852. DOI: 10.1007/s11032-013-9912-2

53 Costa F., van de Weg W.E., Stella S., Dondini L., Pratesi D., Musacchi S. et al. Map position and functional allelic diversity of Md-Exp7, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (Malus × domestica Borkh.) and pear (Pyrus communis) // Tree Genetics and Genomes. – 2008. – Vol. 4(3). – P. 575-586. DOI: 10.1007/s11295-008-0133-5.

54 Harada T., Sunako T., Wakasa Y., Soejima J., Satoh T., Niizeki M. An allele of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (Md-ACS1) accounts for the low level of ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars // Theoretical and Applied Genetics. – 2000. – Vol. 101(5). – P. 742-746. DOI: 10.1007/s001220051539.

55 Zhu Y., Barritt B.H. Md-ACS1 and Md-ACO1 genotyping of apple (Malus × domestica Borkh.) breeding parents and suitability for marker-assisted selection // Tree Genetics and Genomes. – 2008. – Vol. 4(3). – P. 555-562. DOI: 10.1007/s11295-007- 0131-z

56 Costa F., van de Weg W.E., Stella S., Dondini L., Pratesi D., Musacchi S. et al. Map position and functional allelic diversity of Md-Exp7, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (Malus × domestica Borkh.) and pear (Pyrus communis) // Tree Genetics and Genomes. – 2008. – Vol. 4(3). – P. 575-586. DOI: 10.1007/s11295-008-0133-5

57 Longhi S., Cappellin L., Guerra W., Costa F. Validation of a functional molecular marker suitable for markerassisted breeding for fruit texture in apple (Malus domestica Borkh.) // Molecular Breeding. – 2013. – Vol. 32(4). – P. 841-852. DOI: 10.1007/s11032-013-9912-2

58 Bai S., Wang A., Igarashi M., Kon T., Fukasawa-Akada T., Li T. et al. Distribution of MdACS3 null alleles in apple (Malus × domestica Borkh.) and its relevance to the fruit ripening characters // Breeding Science. – 2012. – Vol. 62(1). – P. 46-52. DOI: 10.1270/jsbbs.62.46

59 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.

60 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.

61 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.

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

63 Насонов А.И., Супрун И.И., Федорович С.В. Способ выделения тотальной рибонуклеиновой кислоты из тканей растений плодовых культур Патент на изобретение RU 2803798 C1, 19.09.2023. Заявка № 2022130861 от 28.11.2022.

64 Menzel, W., Jelkmann, W. & Maiss, E. 2002 Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with co-amplification of plant mRNA as internal control // Journal of Virological Methods. – 1999. – P. 81-92

65 Башкирова И.Г., Каримова Е.В., Смирнова И.П. Исследование праймеров для диагностики фитоплазм из группы Apple proliferation // Фитосанитария. Карантин растений. – 2022. – Vol. (3). – P. 26-36.

66 Rogers S.O. & Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. – 1985. – Vol. 5. – P. 69-76.

67 Lal M., Jamwal M., Sood Y., Bakshi P., Sharma N., Sharma S., Kumar S. Micropropagation of fruit crops: a review // Plant Science Today. – 2023. – Vol. 10 (1). – P. 108-117.

68 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.)

69 Батукаев А.А., Батукаев М.С., Магомадов З.М. Биологические методы оздоровления и ускоренного размножения винограда // Научное обеспечение устойчивого развития АПК в Северо-Кавказском федеральном округе: материалы Всерос. науч. практич. конф. Нальчик, 16-18 июля, 2013 г. Том 1. – Нальчик, 2013. – С. 391-397.

70 Зленко В.А., Лиховской В.В., Волынкин В.А. и др. Оптимизация методологии получения плодовых растений из почек в культуре тканей in vitro // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2017. – № 1. – С. 3.

71 Батукаев А.А., Палаева Д.О., Собралиева Э.А. Совершенствование состава питательных сред при микрочеренковании винограда in vitro // Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. – Краснодар, 2018. – Т. 18. – С. 76-80.

72 Янковская М.Б. Модификация питательных сред при работе с культурой in vitro // Генетические основы селекции сельскохозяйственных культур: материалы междунар. науч.-практ. конф. посвящ. памяти акад. РАН, д-ра с.-х. наук, проф. Н. И. Савельева (24-26 мая 2017 г.). – Мичуринск-наукоград РФ. – Воронеж: Кварта, 2017. – С. 362-366.

73 Batukaev A.A., Levchenko S.V., Ostroukhova E., Boyko V., Peskova I., Probeygolova P., Belash D., Lutkova N. The effect of foliar fertilizing on ecological optimization of the application of fungicides on the productivity and phenolic complex composition of grapes // Preservation and innovation: expectations at the environmental, economic and social level book of abstracts of

42st world congress of vine and wine 17th general assembly of the oiv. – 2019. – P. 61-63.

74 Ван-Ункан Н.Ю., Савельев Н.И., Олейникова О.Я. Микроклональное размножение колонновидных сортов яблони // Биотехнология в плодоводстве: материалы междунар. науч. конф., Самохваловичи, 13-17 июня 2016, г. Минск. – С. 32-34.

75 Еремина О.В., Подорожный В.Н. Повышение эффективности товарных насаждений черешни путем подбора высокоадаптивныхпривойно-подвойных форм // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ ВСТИСП. М. – 2011. – Т.28. – С.191-200.

76 Еремин Г.В., Подорожный В.Н. Результаты и актуальные направления в селекции клоновых подвоев для черешни // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ ВСТИСП. – М., 2011. – Т. 28, Ч.1. – С. 174-180.

77 Vinter M., Fedorovitch S., Karpushina M., Gridnev S. Micropropagation of rootstocks of stone fruit cultures in vitro. In BIO Web of Conferences. – 2020. –Vol. 25. – P. 05001.

78 Khamurzaev S. M., I.M., Butsaeva E. M., Sibiryatkin S. V. The use of the Driver-Kuniyuki nutrient medium for micropropagation of rootstocks of LC-52 (Cerasus vulgaris x Cerasus fruitcose) and Gizela 6 (Peisica vulgaris x Cerasus canescens) stone fruit crops// Journal of Bamatov Experimental biology and agricultural sciences. – 2018.– 6(3). – P. 623-627.

79 Murashige T., Skoog F. A revisedmediumforrapidgrowth and bioassayswithtobacootissuecultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol.15. – N.3.- P. 473-497.

80 McCown B.H., Lloyd G. Woody Plant Medium (WPM) – mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species // Hort. Sci. – 1981. – Vol. 16. – 453 p.

81 Pakyürek M., Hepaksoy S. A research on micropropagation of Pixy rootstock. // Euroasia Journal of Mathematics, Engineering, Natural & Medical Sciences. – 2020. – Vol. 7(8). – P. 160–169. https://doi.org/10.38065/euroasiaorg.31

82 Amiri S. A., Babaiy S., Aliyoun-Nazari A., Khodadadi S., Khodadadi E., Mohsen E. S. Control of contamination during micropropagation process of Rootstocks Mariana (Prunus mariana) // Scholars research library. – 2013.– Vol. 4.– P. 149-151.

83 U. Remzi.Development of in vitro sterilization protocol for Do-1 (Prunus domestica) rootstock // Applied Ecology and Environmental Research. – 2020. –18. 10.15666/aeer/1802_23392349

84 Liang C. Wu, Rendun H., Yu T. , Wan C. Y. Optimizing Suitable Antibiotics for Bacterium Control in Micropropagation of Cherry Rootstock Using a Modified Leaf Disk Diffusion // Method and E Test. Plants. – 2019. – Vol. 8. – P. 66. 10.3390/plants8030066

85 Bamatov I., Butsaeva E., Arsanov M., Bamatov D. The modification of murashige and skoog media for efficient cultivation of gizella-5 and vsl-2 rootstocks in vitro // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – Vol. 315, Is. 4.

86 Suleymanova S.J. Technology of receiving the clone rootstock gf 677 and garnem applied to the guba-khachmaz region //Agrarian science. – 2018. – Vol. 3. – P.73-75. (In Russ.)

87 Güney M. Development of an in vitro micropropagation protocol for Myrobalan 29C rootstock // Turkish Journal of Agriculture and Forestry – 2019. – Vol. 43, No. 6. https://doi.org/10.3906/tar-1903-4;

88 Bulunuz P. E., Ugur R., Yaman M. Micropropagation Protocols of New Prunus Hybrids with Significant Rootstock Potential in Fruit Breeding and Cultivation//Erwerbs-Obstbau. – 2023. – 65. P.1359–1364 . https://doi.org/10.1007/s10341-023-00908-6

89 Bulunuz P. E., Ugur R., Yaman M. Micropropagation Protocols of New Prunus Hybrids with Significant Rootstock Potential in Fruit Breeding and

Cultivation//Erwerbs-Obstbau. – 2023. – Vol. 65. – P.1359–1364. https://doi.org/10.1007/s10341-023-00908-6

90 Ognjanov V., Ljubojevic M., Barac G., Dulic j., Pranjic A., Dugalic, K. Rapid propagation of sweet and sour cherry rootstocks // Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. –2014. – Vol. 42(2). – P. 488-494.

91 Ancu S. et al. In vitro propagation protocol for new stone fruit rootstocks //III Balkan Symposium on Fruit Growing, 2015. – C. 335-340.

92 Dorić D. O., Ljubojević V., Barac M., Dulić G., Pranjić J., Dugalić A., Krunoslav. Rapid propagation of sweet and sour cherry rootstocks//Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. – 2014. – Vol. 42. – P. 488-494. 10.1583/nbha4229671.

93 Nas Z., Eşitken A. Micropropagation of an Apricot (Prunus Armeniaca L.) Rootstock Candidate // Erwerbs-Obstbau. – 2023. – Vol. 65. – P. 2357–2365.

94 Suleymanova S.J. Technology of receiving the clone rootstock gf 677 and garnem applied to the guba-khachmaz region // Agrarian science. – 2018. – Vol. 3. – P. 73-75. (In Russ.)

95 Коваленко Н. Н. Перспективы использования размножения in vitro гибридных клоновых подвоев косточковых культур в создании маточных насаждений // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2019. – № 56. – С. 93-109.

96 Супрун И.И., Амосова М.А., Лободина Е.В., Аль-Накиб Е.А., Авакимян А.О., Егорова О.В Оптимизация этапов клонального микроразмножения подвоев косточковых культур // Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. –2023.– Т. 36. –С. 69-73.

97 Медведева Н. И., Подорожный В. Н. Особенности адаптации in vivo растений-регенерантов косточковых плодовых культур //Плодоводство и ягодоводство России. – 2012. – Т. 32, №. 1. – С. 342-348.

98 Karpushina M.V., Amosova M.A. Comparative assessment of the efficiency of prapogation of strawberry varieties under in vitro conditions// Плодоводство и виноградарство Юга России. –2023.– № 79 (1).– С. 82-92.

99 Dhukate M. R., Kher M. M., Vadawale A. V., Giri P. Protocol for micropropagation of strawberry (Fragaria× ananassa) cv.‘Sweet Charlie’and ‘Winter Dawn’ // Environmental and Experimental Biology. – 2021. – Vol. 19(1). – P. 1-6.

100 Naing A. H., Kim S. H., Chung M. Y., Park S. K., Kim C. K. In vitro propagation method for production of morphologically and genetically stable plants of different strawberry cultivars // Plant methods. – 2019. – Vol. 15. – P.1-10.

101 Banerjee D., Singh V., Thakur, R. MicroPropagation on Strawberry: A Review // In E3S Web of Conferences. – 2023. – Vol. 453. – P. 01019.

102 Карпушина М.В., Винтер М.А. Микроклональное размножение земляники садовой // Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. – 2021. –Т. 31. – С. 108-113.

103 Borkowska B. Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted in vitro or ex vitro //Scientia Horticulturae. – 2001. – T. 89, №. 3. – C. 195-206.

104 Wainwright H., Flegmann A. W. The micropropagation of gooseberry (Ribesuva-crispa L.): II. In vitro proliferation and in vivo establishment. //Journal of horticultural science. – 1985. – Vol. 60(4). – P. 485-49.

105 Kucharska D. Orlikowska T. Maciorowski R. Kunka M. Wójcik D., Pluta S. Application of meta-Topolin for improving micropropagation of gooseberry (Ribes grossularia) // Sci. Hortic.– 2020. – Vol. 272. – P. 109529.

106 Tashmatova L. V., Matsneva O. V., Khromova T. M.,Shakhov, V. V. Optimization of individual elements of clonal micro-propagation of fruit and berry crops in the production system of healthy planting material. In E3S Web of Conferences. – 2021. – Vol. 254. – P. 04001.

107 Иванова-Ханина Л.В. Оптимизация условий введения в малины и ежевики в культуру in vitro // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2014. – № 101 (07).

108 Hunkova J., Libiakova G., Gajdošová A. Shoot proliferation ability of selected cultivars of Rubus spp. as influenced by genotype and cytokinin concentration // Journal of Central European Agriculture. – 2016. – Vol. 17 (02). https://doi.org/10.5513/jcea.v17i2.4282

109 Gonzalez M. V., Lopez M., Valdes A. E., Ordas R. J. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from fieldgrown plants // Annals of Applied Biology. –2000. – Vol. 137(1). – P. 73-78.

110 Карпушина М.В., Амосова М.А. Микроразмножение ежевики (Rubus) сорта Карака блэк in vitro // Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. – 2022. – Т. 35. – С. 13-17.

111 Ramage C.M., Williams R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2002. – Vol. 38. – P. 116-124.

112 Высоцкий В.А. Биотехнологические приемы в современном садоводстве // Сборник научных работ ВСТИСиП РАСХН – Т.XXVI – М., 2011. – С. 3-10.

113 Батукаев А.А., Шишхаева А.А., Дадаева Т.А., Батукаев М.С. Использование БАВ при размножении винограда in vitro // Биологически активные вещества растений-изучение и использование: материалы Междунар. науч.-практич. конф. Минск, 29-31 мая 2013 г. – С. 324-325.

114 Божидай Т.Н., Кухарчик Н.В. Влияние генотипа и ауксина на процесс ризогенеза ex vitro сортов брусники обыкновенной (Vacciniumvitis-ideall) // Биотехнология в плодоводстве: материалы науч. конф., Самохваловичи, 13-17 июня 2016, г. Минск. – С. 99-101.

115 Бойко В.А., Белаш Д.Ю. Влияние внекорневой подкормки на фитометрические показатели молодых виноградных насаждений // Магарач: Виноградарство и виноделие. – 2017. – № 1. – С. 22-24.

116 Batukaev A., Sobralieva E. Clonal propagation of in vitro and adaptation ex vitro // The VIII International Scientific and Practical Conference «Biothecnology as an instrument for plant biodiversity conservation», October 1-5, 20018, Yalta, Russia, p.123-124.

117 Batukaev A.A., Mukailov M.D. Use of growth regulators in grapes grinding by in vitro method // 18th International Multidisciplinary Scientific Geo Conference, SGEM -2018. Albena, Bulgaria 30 June-9 July, 2018 Vol. 18, Is. 6.2. – P.783-79.

118 Энхтайван А. Влияние условий культивирования на размножение растений рода Astragalus L. и синтез вторичных соединений в культуре in vitro // Международная научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 150-летию РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2015. – С. 83.

119 Kinfe B., Feyssa T., Bedada G. In vitro micropropagation of grape vine (Vitis vinifera L.) from nodal culture // African Journal of Biotechnology. – 2017. – Vol. 16(43). – P. 2083-2091.

120 Медведева Н. И., Поливара Н. В., Трошин Л. П. Методические рекомендации по микроклональному размножению винограда in vitro //Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2010. – № 62. – С. 314-326.

121 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.

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

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

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

125 Колбанова Е.В. Подбор минерального и гормонального состава питательной среды для культивирования сортов крыжовника в культуре *in vitro* // Плодоводство. – 2013. – 25(1). – 284-294.

126 https://almadez.ru/dez-sredstva/almadez_eko/

127 Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов», разрешенных к применению на территории РФ. Часть II АГРОХИМИКАТЫ, (Минсельхоз России). – М., 2022. – 64 с.

128 Винтер М.А., Лободина Е.В., Токмаков С.В., Беседина Е.Н., Карпушина М.В. Санация эксплантов яблони при введении в культуру *in vitro* // Плодоводство и виноградарство Юга России. – № 60(6). – 2019. – С. 84-90. DOI 10.30679/2219-5335-2019-6-60-84-90.

129 «Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов», разрешенных к применению на территории Российской Федерации. – М.: Минсельхоз России, 2022. – 846 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Оценка отличимости, однородности и стабильности при передаче в Государственное сортоиспытание сорта яблони Эльф, переданного в ГСИ в 2023 году

Форма RTG № 0014/2 ЯБЛОНЯ КУЛЬТУРНАЯ

Оценка отличимости, однородности и стабильности

Место проведения испытаний Краснодар, ЗАО ОПХ «Центральное» Год 2023

Сорт **Эльф** Категория _____

Группа _____

Фактическое число растений __10__ Код _ _ _ _ _ _ _ _

Признак		Индекс	Степень выраженности	Резуль-тат	Нети пич. расте ний	Примечание
1.	Дерево: сила роста	1	очень слаборослое	**5**	**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	**2**	**0**	
		2	раскидистая			
		3	свисающая			
		4	плакучая			
4.	Дерево: тип плодоношения	1	только на кольчатках	**2**	**0**	
		2	на кольчатках и прутиках			
		3	только на прутиках			
5.	Прирост прошлого года: толщина	3	тонкий	**3**	**0**	
		5	средней толщины			
		7	толстый			
		9	очень толстый			
6. (*)	Прирост прошлого года: длина междоузлий	1	очень короткие	**5**	**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	**5**	**0**	
		5	среднее число			
		7	много			
10. (*)	Листовая пластинка: положение относительно побега	1	направлена вверх	**1**	**0**	
		2	направлена в сторону			
		3	направлена вниз			
11.	Листовая пластинка: длина	1	очень короткая			

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

Признак		Индекс	Степень выраженности	Резуль-тат	Нети пич. расте ний	Примечание
		4	от мелкого до среднего			
		5	среднего размера			
		6	от среднего до крупного	**6**	**0**	
		7	крупный			
		8	от крупного до очень крупного			
		9	очень крупный			
25. (*)	Плод: высота	3	низкий			
		5	средней высоты	**5**	**0**	
		7	высокий			
26. (*)	Плод: диаметр	3	маленький			
		5	среднего диаметра	**5**	**0**	
		7	большой			
27. (*)	Плод: отношение высоты к диаметру	1	очень маленькое			
		3	маленькое			
		5	среднее	**5**	**0**	
		7	большое			
		9	очень большое			
28. (*)	Плод: форма	1	цилиндрический с перехватом			
		2	конический			
		3	яйцевидный			
		4	цилиндрический	**4**	**0**	
		5	эллипсовидный			
		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	**1**	**0**	
		2	средняя			
		3	сильная			
31. (*)	Плод: размер чашечки	3	маленькая			
		5	среднего размера	**5**	**0**	
		7	большая			
32.	Плод: длина чашелистиков	3	короткие			
		5	средней длины	**5**	**0**	
		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			
		2	беловато-желтая			
		3	желтая			
		4	беловато-зеленая			
		5	желто-зеленая	**5**	**0**	
		6	зеленая			
36. (*)	Плод: доля поверхности кожуры под покровной окраской	1	отсутствует или оч. маленькая			
		3	маленькая			
		5	средняя			
		7	большая	**7**	**0**	

Признак		Индекс	Степень выраженности	Резуль-тат	Нети пич. расте ний	Примечание
		9	очень большая			
37. (*)	Плод: покровная окраска без воскового налета	1	оранжево-красная			
		2	розово-красная			
		3	красная	**3**	**0**	
		4	фиолетово-красная			
		5	коричнево-красная			
38. (*)	Плод: интенсивность покровной окраски	3	светлая			
		5	средняя	**5**	**0**	
		7	темная			
39. (*)	Плод: тип покровной окраски	1	только равномерная			
		2	равномерная со слабо определяемыми полосами	**2**	**0**	
		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			
		2	средняя	**2**	**0**	
		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			
		5	среднее число	**5**	**0**	
		7	много			
45.	Плод: размер подкожных точек	3	маленькие	**3**	**0**	
		5	среднего размера			
		7	большие			
46. (*)	Плод: длина плодоножки	1	очень короткая			
		3	короткая			
		5	средней длины	**5**	**0**	
		7	длинная			
		9	очень длинная			
47. (*)	Плод: толщина плодоножки	3	тонкая			
		5	средней толщины			
		7	толстая	**7**	**0**	
48. (*)	Плод: глубина воронки	3	мелкая			
		5	средней глубины			
		7	глубокая	**7**	**0**	
49. (*)	Плод: ширина воронки	3	узкая			
		5	средней ширины	**5**	**0**	
		7	широкая			

Признак		Индекс	Степень выраженности	Резуль-тат	Нетипич. растений	Примечание
50. (*)	Плод: глубина чашечки	3	мелкая	**5**	**0**	
		5	средней глубины			
		7	глубокая			
51. (*)	Плод: ширина чашечки	3	узкая	**5**	**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	розоватая			
		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	**5**	**0**	
		3	раннее			
		5	среднее			
		7	позднее			
		9	очень позднее			
56.	Время сбора урожая	1	очень раннее	**5**	**0**	
		3	раннее			
		5	среднее			
		7	позднее			
		9	очень позднее			
57.	Время потребительской спелости плодов	1	раннелетнее (очень раннее)	**5**	**0**	
		2	летнее (от очень раннего до раннего)			
		3	позднелетнее (раннее)			
		4	раннеосеннее (от раннего до среднего)			
	международное название степеней выраженности признака в скобках	5	осеннее (среднее)			
		6	позднееосеннее (от среднего до позднего)			
		7	раннезимнее (позднее)			
		8	зимнее (от позднего до очень позднего)			
		9	позднезимнее (очень позднее)			

Общее число нетипичных растений нет

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Оценка отличимости, однородности и стабильности при передаче в Государственное сортоиспытание сорта винограда Варга, переданного в ГСИ в 2023 году

Форма RTG № 0050_9 ВИНОГРАД

Оценка отличимости, однородности и стабильности

Место проведения Анапская ампелографическая коллекция Год 2023
Сорт **Варга** Категория технический
Группа
Фактическое число растений Код __ _ _ _ _ _ _ _

Признак		Индекс	Степень выраженности	Результат	Нетипич. растений	Примечание
1. (*)	Время распускания почек	1	очень раннее	5	0	
		3	раннее			
		5	среднее			
		7	позднее			
		9	очень позднее			
2. (*)	Молодой побег: форма (открытость) верхушки побега	1	закрытая	3	0	
		2	слегка открытая			
		3	открытая наполовину			
		4	широко открытая			
		5	полностью открытая			
3. (*)	Молодой побег: паутинистое опушение верхушки побега	1	отсутствует или очень редкое	5	0	
		3	редкое			
		5	средней густоты			
		7	густое			
		9	очень густое			
4. (*)	Молодой побег: антоциановая окраска паутинистого опушения верхушки побега	1	отсутствует или оч. слабая	1	0	
		3	слабая			
		5	средняя			
		7	сильная			
		9	очень сильная			
5.	Молодой побег: щетинистое опушение верхушки побега	1	отсутствует или очень редкое	3	0	
		3	редкое			
		5	средней густоты			
		7	густое			
		9	очень густое			
6. (*)	Молодой лист: окраска верхней стороны пластинки	1	желто-зеленая	2	0	
		2	зеленая			
		3	зеленая с антоциановыми пятнами			
		4	светло-медно-красная			
		5	темно-медно-красная			
		6	винно-красная			
7. (*)	Молодой лист: паутинистое опушение между главными жилками на нижней стороне пластинки	1	отсутствует или очень редкое	3	0	
		3	редкое			
		5	средней густоты			
		7	густое			
		9	очень густое			
8.	Молодой лист: щетинистое опушение на главных жилках нижней стороны пластинки	1	отсутствует или очень редкое	1	0	
		3	редкое			
		5	средней густоты			

Признак		Индекс	Степень выраженности	Резуль-тат	Нети-пич. растений	Приме чание
		7	густое			
		9	очень густое			
9.	Побег: положение (до образования завязей)	1	прямостоячий	1	0	
		3	полупрямостоячий			
		5	горизонтальный			
		7	полусвисающий			
		9	свисающий			
10.	Побег: окраска спинной стороны междоузлия	1	зеленая	1	0	
		2	зеленая и красная			
		3	красная			
11. (*)	Побег: окраска брюшной стороны междоузлия	1	зеленая	1	0	
		2	зеленая и красная			
		3	красная			
12.	Побег: окраска спинной стороны узла	1	зеленая	1	0	
		2	зеленая и красная			
		3	красная			
13.	Побег: окраска брюшной стороны узла	1	зеленая	1	0	
		2	зеленая и красная			
		3	красная			
14.	Побег: щетинистое опушение междоузлий	1	отсутствует или очень редкое	1	0	
		3	редкое			
		5	средней густоты			
		7	густое			
		9	очень густое			
15.	Побег: длина усиков	1	очень короткие	5	0	
		3	короткие			
		5	средней длины			
		7	длинные			
		9	очень длинные			
16. (*)	Цветок: органы размножения	1	полностью развитые тычинки и нет пестика	3	0	
		2	полностью развитые тычинки и редуцированный пестик			
		3	полностью развитые тычинки и полностью развитый пестик			
		4	загибающиеся тычинки и полностью развитый пестик			
17. (*)	Сформировавшийся лист: размер пластинки	1	очень мелкий	5	0	
		3	мелкий			
		5	среднего размера			
		7	крупный			
		9	очень крупный			
18. (*)	Сформировавшийся лист: форма пластинки	1	сердцевидная	5	0	
		2	дельтовидная			
		3	пятиугольная			
		4	округлая			
		5	почковидная			
19.	Сформировавшийся лист: пузырчатость верхней стороны пластинки	1	отсутствует или очень слабая	5	0	
		3	слабая			
		5	средняя			
		7	сильная			
		9	очень сильная			
20.		1	одна (нерассеченный)			
		2	три			

Признак		Индекс	Степень выраженности	Резуль-тат	Нети-пич. растений	Приме чание
(*)	Сформировавшийся лист: число лопастей	3	пять	3	0	
		4	семь			
		5	более семи			
21.	Сформировавшийся лист: глубина верхних боковых вырезок	1	отсутствуют или очень мелкие	3	0	
		3	мелкие			
		5	средней глубины			
		7	глубокие			
		9	очень глубокие			
22.	Только сорта с лопастными листьями: Сформировавшийся лист: расположение лопастей верхних боковых вырезок	1	открытые	2	0	
		2	закрытые			
		3	слегка перекрывающиеся			
		4	сильно перекрывающиеся			
23. (*)	Сформировавшийся лист: расположение лопастей черешковой выемки	1	очень широко открытые	2	0	
		2	широко открытые			
		3	открытые наполовину			
		4	слегка открытые			
		5	закрытые			
		6	слегка перекрывающиеся			
		7	перекрывающиеся наполовину			
		8	сильно перекрывающиеся			
		9	очень сильно перекрывающиеся			
24. (*)	Сформировавшийся лист: длина зубчиков	3	короткие	3	0	
		5	средней длины			
		7	длинные			
25. (*)	Сформировавшийся лист: отношение длины зубчиков к их ширине	1	очень малое	5	0	
		3	малое			
		5	среднее			
		7	большое			
		9	очень большое			
26. (*)	Сформировавшийся лист: форма зубчиков	1	с вогнутыми сторонами	2	0	
		2	с прямыми сторонами			
		3	с выпуклыми сторонами			
		4	с выпукло-вогнутыми сторонами			
		5	из прямых и выпуклых сторон			
27. (*)	Сформировавшийся лист: доля главных жилок верхней стороны пластинки с антоциановой окраской	1	отсутствует или очень малая	1	0	
		3	малая			
		5	средняя			
		7	большая			
		9	очень большая			
28. (*)	Сформировавшийся лист: паутинистое опушение между главными жилками на нижней стороне пластинки	1	отсутствует или очень редкое	1	0	
		3	редкое			
		5	средней густоты			
		7	густое			
		9	очень густое			
29. (*)	Сформировавшийся лист: щетинистое опушение главных жилок на нижней стороне пластинки	1	отсутствует или очень редкое	1	0	
		3	редкое			
		5	средней густоты			
		7	густое			
		9	очень густое			
30.	Сформировавшийся лист: длина черешка по	1	значительно короче		0	
		2	короче			
		3	одинаковый	3		

Признак		Индекс	Степень выраженности	Резуль-тат	Нети-пич. растений	Приме чание
	отношению к длине средней жилки	4	длиннее			
		5	значительно длиннее			
31. (*)	Время начала созревания ягод	1	очень раннее			
		3	раннее			
		5	среднее	5	0	
		7	позднее			
		9	очень позднее			
32. (*)	Гроздь: размер (без плодоножки)	1	очень мелкая			
		3	мелкая			
		5	среднего размера	5	0	
		7	крупная			
		9	очень крупная			
33. (*)	Гроздь: плотность	1	очень рыхлая			
		3	рыхлая			
		5	средней плотности	5	0	
		7	плотная			
		9	очень плотная			
34. (*)	Гроздь: длина гребненожки главной грозди	1	очень короткая			
		3	короткая			
		5	средней длины	5	0	
		7	длинная			
		9	очень длинная			
35. (*)	Ягода: размер	1	очень мелкая			
		3	мелкая			
		5	среднего размера	5	0	
		7	крупная			
		9	очень крупная			
36. (*)	Ягода: форма	1	сплющенная			
		2	округлая	2		
		3	широкоэллиптическая			
		4	узкоэллиптическая			
		5	цилиндрическая		0	
		6	тупоконечно-яйцевидная			
		7	яйцевидная			
		8	обратнояйцевидная			
		9	роговидная			
		10	пальцевидная			
37. (*)	Ягода: окраска кожицы (без налета)	1	зеленая			
		2	желто-зеленая			
		3	желтая			
		4	желто-розовая			
		5	розовая		0	
		6	красная			
		7	серо-красная			
		8	темно-красно-фиолеовая			
		9	сине-черная	9		
38.	Ягода: отделяемость от плодоножки	1	с трудом			
		2	с относительной легкостью	2	0	
		3	очень легко			
39.	Ягода: толщина кожицы	1	тонкая			
		2	средней толщины	2	0	

Признак		Индекс	Степень выраженности	Резуль-тат	Нети-пич. растений	Приме чание
		3	толстая			
40. (*)	Ягода: антоциановая окраска мякоти	1	отсутствует или очень слабая	5	0	
		3	слабая			
		5	средняя			
		7	сильная			
		9	очень сильная			
41.	Ягода: твердость мякоти	1	мягкая или слабо твердая	2	0	
		2	твердая			
		3	очень твердая			
42. (*)	Ягода: особенность вкуса	1	отсутствует	5	0	
		2	мускатный			
		3	лисий			
		4	травянистый			
		5	иной			
43. (*)	Ягода: образование семян	1	отсутствуют	3	0	
		2	рудиментарные			
		3	имеются			
44.	Одревесневший побег: основная окраска	1	желтовато-коричневый	3	0	
		2	оранжево-коричневый			
		3	темно-коричневый			
		4	красновато-коричневый			
		5	фиолетовый			

Общее число нетипичных растений __**0**__

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Методика генотипирования сортов и идентификации генов хозяйственно-ценных признаков яблони с помощью ДНК-маркирования (СТО 00668034-168-2023)

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

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ

СТО 00668034-168-2023

Яблоня.

Генотипирование сортов и идентификация генов хозяйственно-ценных признаков с помощью ДНК-маркирования

Краснодар

2023

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Методика идентификации вирусов яблони методом ПЦР (СТО 00668034-166-2023)

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

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ

СТО 00668034-166-2023

Яблоня.

Идентификация вирусов методом ПЦР

Краснодар

2023

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Методика идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 3 (Grapevine leafroll-associated virus 3) с помощью ПЦР в реальном времени (СТО 0668034-167-2023)

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

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ

СТО 00668034-167-2023

ВИРУСЫ ВИНОГРАДА

МЕТОДИКА ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ ВИНОГРАДНОЙ ЛОЗЫ 3 (GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUS 3) С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Краснодар

2023

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

«Способ повышения качества посадочного материала земляники садовой» (Fragaria L.) к условиям ex vitro» - заявка на патент на изобретение №2023124330 от 19.09.2023

Форма № 94 ИЗ, ПМ, ПО-2016

Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Федеральный институт промышленной собственности» (ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993 Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

19.09.2023	053460	2023124330
Дата поступления	*Входящий №*	*Регистрационный №*

15 СЕН 2023

ФИПС ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ	(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №	ВХОДЯЩИЙ №
	(85) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки на национальную фазу	

☐ (86) ☐ (87) ☐ (96) ☐ (97)	АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ ФГБОУ "Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия" 350901, г. Краснодар, ул. им. 40-летия Победы, 39 Телефон: (861) 2527074 E-mail: kdanual@kdavnet.ru АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ
ЗАЯВЛЕНИЕ о выдаче патента Российской Федерации на изобретение	В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., д. 30, корп. 1, г. Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация

(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ
Способ повышения адаптивной способности микрорастений земляники садовой (*Fragaria* L.) к условиям *ex vitro*

(71) ЗАЯВИТЕЛЬ: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия" 350901, г. Краснодар, ул. им. 40-летия Победы, 39 ☐ изобретение создано за счет средств федерального бюджета. Заинтересованные: ☐ государственным заказчиком ☐ муниципальным заказчиком ☒ исполнителем работ по соглашению №075-15-2021-536 от 31.05.2021 заказчик работ Министерство науки и высшего образования РФ	ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ ОГРН 1022301810706 КПП 231101001 ИНН 2311003262 СНИЛС ДОКУМЕНТ (серия, номер) КОД СТРАНЫ (если не установлено) RU
(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ	☐ патентный поверенный ☐ представитель по доверенности ☐ представитель по закону
Фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) Адрес Срок представительства	Телефон: Факс: Адрес электронной почты: Регистрационный номер патентного поверенного

ОТД 17
22 СЕН 2023
040 00 18

Общее количество документов в листах	16	Лицо, зарегистрировавшее документы
Из них: - количество листов комплекта изображений изделия *(для промышленного образца)*	0	Атаказова И.М.
Количество платежных документов	1	

Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются в Открытых реестрах на сайте ФИПС по адресу: www.fips.ru/registers-web

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

«Способ оценки генетической стабильности растений земляники садовой, полученного in vitro» - заявка на патент на изобретение №2023126641 от 17.10.2023

Форма № 94 ИЗ, ПМ, ПО-2016

Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Федеральный институт промышленной собственности» (ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993 Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

17.10.2023	058869	2023126641
Дата поступления	*Входящий №*	*Регистрационный №*

ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ	(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №	ВХОДЯЩИЙ №
17 ОКТ 2023	(85) ДАТА ПЕРЕВОДА	

☐ ОТДЕЛ 17

☐ (87)

☐ (96)

☐ (97)

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ
ФГБНУ "Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия"
350901, г. Краснодар, ул. им. 40-летия Победы, 39
Телефон: (861) 252 3974
E-mail: kubansad@kubanet.ru

АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ

ЗАЯВЛЕНИЕ
о выдаче патента Российской Федерации на изобретение

В Федеральную службу по интеллектуальной собственности
Бережковская наб., д. 30, корп. 1, г. Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация

(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ
Способ оценки генетической стабильности микроклонально размноженных растений земляники

(71) ЗАЯВИТЕЛЬ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия"
350901, г. Краснодар, ул. им. 40-летия Победы, 39

☐ изобретение создано за счет средств федерального бюджета
Заказчик наименование:
☐ государственный заказчик ☐ муниципальный заказчик
исполнитель работ (полное наименование)

☒ исполнителем работ по:
соглашению 70375-IS-2021-534 от 31.05.2021
заказчик работ Министерство науки и высшего образования РФ

ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ
ОГРН 1022300510704
КПП 231100001
ИНН 2311003262
СНИЛС
ДОКУМЕНТ (серия, номер)
КОД СТРАНЫ (если он установлен)
RU

(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ
☐ патентный поверенный
☐ представитель по доверенности
☐ представитель по закону

Фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии)
Адрес
Орган представительства, если с данным представителем доверенность предоставлена другим органам (организациям)

Телефон:
Факс:
Адрес электронной почты
Регистрационный номер патентного поверенного

ОТДЕЛ 17
10 НОЯ 2023
240 • 60 • 15

Общее количество документов в листах	43	Лицо, зарегистрировавшее документы
Из них: - количество листов комплекта изображений изделия *(для промышленного образца)*	0	Атаказова И.М.
Количество платежных документов	2	

Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются в Открытых реестрах на сайте ФИПС по адресу: www.fipi.ru/registers-web