



На правах рукописи

Пузырнова Валентина Георгиевна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ВИНОГРАДА
ДЛЯ СОЗДАНИЯ КОЛЛЕКЦИИ ГЕНОФОНДА *IN VITRO***

(03.01.05 – физиология и биохимия растений)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Новочеркасск 2021

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте виноградарства и виноделия имени Я.И. Потапенко – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Федеральный Ростовский аграрный научный центр"

Научный руководитель:

Наталья Петровна Дорошенко
Главный научный сотрудник
ВНИИВиВ имени Я.И. Потапенко
– филиал ФГБНУ ФРАНЦ,
доктор сельскохозяйственных наук

Официальные оппоненты:

Оксана Геннадьевна Белоус
Заведующая лабораторией физиологии и биохимии растений
ФИЦ СИЦ РАН, доктор биологических наук

Михаил Иванович Панкин
Ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Северо-Кавказский
федеральный научный центр садоводства, виноградарства,
виноделия», доктор сельскохозяйственных наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Донской
государственный аграрный университет»

Защита состоится 1.02.2022 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета Д 220.038.04, созданного на базе ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина», по адресу: 350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13 (главный корпус, 2 этаж, ауд. 209), тел./факс (8-861) 221-58-61.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина», по адресу: 350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13 и на сайте <http://www.kubsau.ru>, с авторефератом – на официальных сайтах: Высшей аттестационной комиссии – <http://www.vak.ed.gov.ru> и ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина» – <http://www.kubsau.ru>

Автореферат разослан 23 ноября 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор сельскохозяйственных наук, профессор



Онищенко Л.М

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований. В условиях глобального экологического неблагополучия проблема сохранения генофонда растений стоит особенно остро. Традиционных средств сохранения биологического разнообразия растений уже недостаточно.

Технология клонального микроразмножения это ценный инструмент, как для науки, так и для производства, позволяющий создать биотехнологию содержания генофонда растений в условиях их замедленного роста. Сегодня во всем научном мире этот способ общепризнан как альтернативный и дополнительный инструмент размножения, применяемый как для крупномасштабного быстрого размножения растений, свободных от инфекций, так и для хранения генофонда.

Необходимость сохранения генофонда винограда общепризнана, и сегодня во всем мире ведется формирование банков каллусных, суспензионных, меристематических культур, культуры семяпочек, пыльников и пыльцы, криосохранение растительных тканей.

Коллекции винограда *in vitro* позволяют не только хранить генетически ценный материал, но и производить обмен генетическими ресурсами на международном уровне. Сегодня обмен материалом *in vitro* активно развивается.

По всему миру ведутся исследования по разработке и совершенствованию протоколов введения в культуру и содержания *in vitro* ценных сортов. Особенности роста и развития растений в культуре *in vitro* очень видо и сортоспецифичны, что отмечено большинством исследователей в этой области, поэтому единства приемов быть не может – необходим сортоориентированный подход.

Цель исследований – разработать стратегию среднесрочного хранения *in vitro* перспективных сортов винограда, включенных в реестр селекционных достижений, допущенных к использованию с учетом сортовых особенностей, состояния растений и происходящих морфогенетических процессов, для создания генетического банка стерильных культур.

Для достижения цели были поставлены и решены следующие задачи:

- усовершенствовать способы ввода меристем в культуру, сочетающие применение апикальных меристем и хемотерапию (Рибавирин, Цефотаксим, Мелафен);
- улучшить качественные характеристики мериклонов на этапе микроразмножения за счет определения оптимального расположения микрочеренков на побеге;
- исследовать приемы замедления ростовых процессов для среднесрочного хранения;
- определить оптимальные концентрации антибиотиков Цефотаксим, Гентамицин, Амоксициллин, для элиминации бактериальной инфекции и замедления ростовых процессов;

– определить влияние углеводов (сахароза, фруктоза, сорбит) в составе питательных сред на ход ростовых процессов, установить возможность применения их для сохранения винограда в коллекции *in vitro*;

– изучить применение ингибитора Флорон с целью создания коллекции винограда *in vitro*;

– исследовать возможность изменения кинетики культуры за счет уплотнения питательной среды;

– осуществить контроль за состоянием растений и их регенерационной способностью при хранении в коллекции *in vitro*.

Объект исследования – методы и приемы оздоровления, замедления ростовых процессов для массового тиражирования и формирования коллекции генофонда *in vitro*.

Предмет исследования – среднесрочное хранение винограда в коллекциях *in vitro* сортов Каберне Совиньон, Кобер 5 ББ, Платовский, Презент, Фиолетовый ранний, Цветочный.

Новизна исследований заключается в разработке научных основ хранения растений винограда в коллекции *in vitro*, обеспечивающих продолжительное беспересадочное хранение и высокую регенерационную способность растений, а именно:

– разработка новых способов ввода меристем в культуру, сочетающих применение апикальных меристем и хемотерапии (Рибавирин, Цефотаксим, Мелафен);

– улучшение качественных характеристик мериклонов в результате выбора оптимального расположения микрочеренков на побеге;

– определение параметров применения антибиотиков Гентамицин, Цефотаксим, Амоксициллин, регулятора роста Мелафен и ингибитора Флорон для минимизации роста растений и продолжительного беспересадочного хранения;

– исследовано влияние углеводов (сахароза, фруктоза, сорбит) на ход ростовых процессов при создании коллекции сортов Фиолетовый ранний, Каберне Совиньон;

– выявлено изменение кинетики культуры за счет уплотнения питательной среды;

– впервые доказана возможность беспересадочного культивирования исследуемых сортов в течение 10–12 месяцев.

Теоретическая значимость заключается в выявлении научных основ кинетики роста растений под действием антибиотиков и углеводов. Результаты научных исследований являются основой для совершенствования существующих и создания новых технологий и протоколов хранения растений в коллекциях *in vitro*. Разработана стратегия (схема) и методология создания банка асептических культур.

Практическая значимость заключается в том, что полученные результаты исследований позволяют усовершенствовать биотехнологию создания и содержания коллекций

винограда *in vitro*. Разработанная технология создания и хранения мериклонов винограда в коллекции *in vitro*, позволяет изменять кинетику роста культуры, увеличивать временной интервал между субкультивированиями, что обеспечивает длительное беспересадочное хранение растений винограда исследуемых сортов. Показана экономическая эффективность предложенных приемов замедления роста. Научные результаты позволили оптимизировать существующие способы ввода в культуру *in vitro*, микроразмножения и хранения. Создан протокол введения и содержания в коллекции *in vitro* сортов винограда Каберне Совиньон и Фиолетовый ранний. Ускоренное микроразмножение растений из коллекции способствует производству оздоровленного сертифицированного посадочного материала. Результаты исследований могут быть применены в работе научно-исследовательских учреждений, занимающихся содержанием коллекций винограда *in vitro*.

Положения, выносимые на защиту:

1. Теоретическое обоснование создания коллекции растений *in vitro*. Разработка стратегии и методологии создания банка асептических растений.
2. Научно-методические разработки по способу ввода эксплантов в культуру *in vitro*, совмещающие применение апикальных меристем размером 0,1–0,2 мм и хемотерапию с применением препаратов Рибавирин (10,0 мг/л), Цефотаксим (200,0 мг/л) и Мелафен (10^{-7} – 10^{-9}).
3. Использование пробирочных растений для выделения меристем с целью повышения эффективности оздоровления, для нового цикла хранения коллекции, а также для обмена генетическими ресурсами.
4. Совершенствование этапа микроразмножения предварительным оздоровлением на питательной среде с Цефотаксимом (200–300 мг/л).
5. Рекомендации по выбору месторасположения микрочеренков. При создании коллекции из пробирочных растений микрочеренки следует отбирать из верхней и средней части растений.
6. Для увеличения продолжительности беспересадочного хранения растений в коллекции следует применять антибиотики Цефотаксим и Гентамицин.
7. Для создания коллекции следует применять альтернативные сахарозе углеводы – фруктозу, сорбит.

Апробация работы. Результаты исследований доложены на I Всероссийской конференции молодых ученых АПК "Актуальные вопросы развития отраслей сельского хозяйства 1–3 октября 2019 г; III Всероссийской научно практической конференции "Проблемы и перспективы биологического земледелия " ЮФУ, Ростов-на Дону, 2019;

международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. Магарач, 2019; VII Международной дистанционной научно-практической конференции молодых ученых, Краснодар, 2017; XIV Международная научно-практическая конференция «Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса» (Конференция «ИНТЕРАГРОМАШ 2021»), Ростов-на-Дону, 24–26 февраля 2021 г.

Публикация результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ. В том числе три работы в изданиях, определенных ВАК Минобрнауки России и науки РФ и две – в сборниках, индексируемых системой Web of Science.

Вклад автора. Автор работы принимал непосредственное участие в разработке программы исследований, постановке целей и формировании задач, схемы опытов. Лично осуществлял все подготовительные работы (комплексный анализ методической и нормативной литературы, подготовка посуды и приготовление культуральных сред), самостоятельно проводил постановку опытов, сбор данных, их обработку, систематизировал и анализировал экспериментальный материал.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Работа изложена на 221 странице, содержит 30 таблиц, 17 рисунков, 181 источник, из них 87 иностранных, 13 приложений. Состоит из введения, трех глав («Состояние изученности вопроса» «Методика исследований» «Результаты исследований») и заключения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Опыты выполнены в лаборатории биотехнологии Всероссийского научно-исследовательского института виноградарства и виноделия имени Я.И. Потапенко – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Федеральный Ростовский аграрный научный центр" по общепринятым в биотехнологии методикам (Уайт Ф.Р., 1949; Бутенко Р.Г., 1964, 1999; П.Я. Голодрига и др., 1986; Дорошенко Н.П., 1992, 2012).

Работа по высадке эксплантов, выделению меристем, микрочеренкованию проводилась в ламинарном боксе «Фатран» под бинокулярным микроскопом МБС-9 при 25-кратном увеличении.

Питательные среды готовили из минеральных и органических компонентов, которые группировали в маточные растворы макроэлементов, микроэлементов, хелатного железа, витаминов, фитогормонов. Все исследования проводили на питательной среде Мурасиге и Скуга, модифицированной для каждого этапа микроразмножения.

Культуральные среды оптимизировали введением противовирусного препарата (Рибавирин), антибиотиков (Цефотаксим, Амоксициллин, Гентамицин), регулятора роста

(Мелафен) и углеводов (сахароза, фруктоза, сорбит). Противовирусные и антибактериальные препараты вносили в питательную среду после автоклавирования и охлаждения ее до 50°C.

При проведении учетов и наблюдений оценивали показатели: инфицированность эксплантов, %; размер эксплантов, мм; приживаемость, %; число срезанных микропобегов, шт.; общая укореняемость, %; количество корней, шт.; длина корней, см; величина ризогенной зоны, см; высота растения, см; число листьев, шт.; коэффициент полярности; продолжительность культивирования, дней.

Жизнеспособность растений оценивали с периодичностью один раз в месяц по количеству некрозов тканей листьев и побегов: 0 баллов – визуальная гибель растения, 1 балл – некроз более 50 % тканей растения, 2 балла – некроз менее 50 % тканей, 3 балла – растения без некроза.

Статистическая обработка выполнена при 95-% уровне доверительной вероятности по методике Б.А. Доспехова (1985). Для оценки адекватности полученных данных использован критерий Фишера (F).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ФОРМИРОВАНИЕ БАНКА ОЗДОРОВЛЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Одним из ключевых моментов создания коллекции *in vitro* является разработка приёмов введения растительного материала в стерильную культуру. Чтобы достигнуть большего эффекта при длительном хранении генофонда, необходимо освободить растительный материал от патогенов и быстро его размножить.

За основу был взят способ оздоровления растений при помощи культуры апикальных меристем при относительном размере эксплантов 0,1–0,2 мм. Для ввода в культуру *in vitro* в качестве исходного материала были взяты почки побегов виноградных кустов в период активного роста, а также почки пробирочных микрорастений.

Для оптимизации способа с целью оздоровления от вирусной инфекции культуру меристем дополнили введением в питательную среду противовирусного препарата Рибавирин в диапазоне концентраций 5–30 мг/л.

Применение препарата способствовало повышению приживаемости у сорта Цветочный – 70,0–90,0 %, у сорта Презент– 62,0–84,5 % (таблица 1).

Применение противовирусного препарата Рибавирин не оказывает отрицательного действия на развитие меристем в концентрации 5–30 мг/л, так как отмечен их интенсивный рост и высокая приживаемость. Общее число развившихся меристем (100 %) и наибольшее число крупных меристем размером более 3 мм отмечено при концентрации 10,0 мг/л. Лучшее

образование и срезка побегов для дальнейшего микроразмножения зафиксированы также в этом варианте. Концентрация 40 мг/л оказалась токсичной для меристем и привела к их полной гибели.

Таблица 1 – Анализ ввода меристем сорта Презент в культуру, 2018 г.

Рибавирин, мг/л	Число меристем, % размером			Гибель меристем, %		Общее число развившихся меристем, %
	до 1мм	1 – 3 мм	более 3 мм	ГИ	ОР	
30 дней культивирования						
0	0	31,0	53,5	0	15,5	84,5
10	0	31,0	69,0	0	0	100
20	0	15,5	69,0	0	15,5	84,5
30	0	46,0	38,5	0	15,5	84,5
40	0	0	0	0	100	0
60 дней культивирования						
0	0	31,0	53,5	0	15,5	84,5
10	0	31,0	69,0	0	0	100
20	0	31,0	46,0	0	23,0	77,0
30	0	38,0	31,0	0	31,0	69,0
40	0	0	0	0	100	0

*ГИ – грибная инфекция; *ОР – отсутствие развития.

Таким образом, для оптимизации способа оздоровления от вирусной инфекции необходимо совмещать культуру апикальных меристем размером 0,1–0,2 мм и хемотерапию с применением препарата Рибавирин (10,0 мг/л).

Для оздоровления от фитоплазменной инфекции изучили оптимизацию культуры меристем введением в питательную среду антибиотика Цефотаксим (таблица 2)

Таблица 2 – Влияние антибиотика Цефотаксим на прохождение этапа собственно микроразмножения у сорта Цветочный, 2018 г.

Состояние меристем, шт.	Содержание антибиотика Цефотаксим в питательной среде, мг/л				
	0	50	100	200	300
ОР*	4	5	5	5	6
ГИ*	1	2	2	2	1
Сохранилось	5	3	3	3	3
Срезано побегов	1	1	-	5	3

*ОР – отсутствие развития; *ГИ – грибная инфекция

Применение антибиотика Цефотаксим способствовало уменьшению гибели меристем из-за отсутствия развития и увеличению образования побегов. Лучшим вариантом является – 200 мг/л.

Изучение влияния препарата Мелафен на приживаемость и развитие меристем на этапе ввода осуществлено на сорте Каберне Совиньон. В качестве исходных растений взяты пробирочные растения, оздоровленные Цефотаксимом. Мелафен использовался в концентрациях 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} .

Введение в состав среды регулятора роста Мелафен способствовало улучшению образования побегов (таблица 3).

Таблица 3 – Образование побегов при различных концентрациях Мелафена, сорт Каберне Совиньон, 2019 г.

Вариант	Образовалось побегов (шт.) в процессе пролиферации				
	Пассаж 1	Пассаж 2	Пассаж 3	Пассаж 4	Всего
Контроль	–	1	–	1	2
10 ⁻⁵	5	–	–	5	10
10 ⁻⁷	10	3	–	14	27
10 ⁻⁹	–	11	9	15	35
10 ⁻¹¹	–	–	–	–	–
Всего на пассаж	15	15	9	35	74

Мелафен во всех концентрациях, за исключением 10⁻¹¹, оказал положительное влияние на образование побегов. В контроле образовались единичные побеги. Лучший результат получен при разведении 10⁻⁷ и, особенно 10⁻⁹. Таким образом, для повышения эффективности клонального микроразмножения следует на этапе ввода применять стимулятор роста Мелафен в концентрациях 10⁻⁷–10⁻⁹.

Изучено влияние места расположения почек для извлечения эксплантов на приживаемость и развитие меристем сорта Каберне Совиньон. Меристемы выделяли из почек, расположенных в нижней, средней и верхней части побегов пробирочных растений. Лучшее развитие меристем (50–60 %) происходило из почек, выделенных из нижней и средней части побегов (таблица 4).

Таблица 4 – Этап ввода в культуру меристем из почек, расположенных в разных частях побега, сорт Каберне Совиньон, 2019 г.

Учеты	Расположение меристем на побеге					
	нижняя часть		средняя часть		верхняя часть	
	живые меристемы	отсутствие развития	живые меристемы	отсутствие развития	живые меристемы	отсутствие развития
Пассаж 1	6	4	6	4	6	4
Пассаж 2	6	–	5	1	5	1
Пассаж 3	6	–	5	–	3	2
Пассаж 4	6	–	5	–	3	–
Всего	6	4	5	5	3	7

Меристемы, выделенные из верхней части побегов, развивались намного слабее и их гибель, и из-за отсутствия развития, составила 70,0 %. Таким образом, если в качестве экспланта, для дальнейшего микроразмножения, выбирать меристемы пробирочных растений, то необходимо выделять их из почек нижней и средней части побегов.

ФАКТОРЫ И ПАРАМЕТРЫ СОЗДАНИЯ И ХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА

Влияние расположения микрочеренков на приживаемость и сохранность растений

Влияния места расположения микрочеренков на приживаемость, рост и развитие растений изучено на сортах: Фиолетовый ранний, Платовский, Каберне Совиньон, Кобер 5 ББ.

Лучшая приживаемость, образование корней и сохранность растений сорта Каберне Совиньон отмечена у микрочеренков, выделенных из верхней части побегов. Продолжительность их беспересадочного культивирования составила 375 дней (таблица 5).

Таблица 5 – Рост и развитие растений, инициированных из разных частей побега, сорт Каберне Совиньон, 2019–2020 гг.

Вариант	ОР, %	Приживаемость, %	Корни			Высота, см	Число листьев, шт.		Скорость роста, мм/сутки	Коэффициент полярности
			число, шт.	длина, см	ризогенная зона, см		всего	на 1 см побега		
39 дней культивирования										
Верх	0	100	5,3	0,9	4,8	2,0	1,5	0,8	0,5	2,4
Середина	0	100	5,3	0,9	4,8	2,5	1,2	0,5	0,6	1,9
Низ	0	100	4,8	1,1	5,3	2,6	2,1	0,8	0,7	2,0
117 дней культивирования										
Верх	0	100	6,0	1,3	7,8	6,2	5,5	0,9	0,5	1,3
Середина	16,7	83,3	5,6	1,6	9,0	9,9	6,9	0,7	0,8	0,9
Низ	23,1	61,5	4,1	1,5	6,2	9,9	7,7	0,8	0,8	0,6
230 дней культивирования										
Верх	45,5	54,5	6,8	2,5	17,0	7,2	6,8	0,9	0,3	2,4
Середина	91,7	8,3	7,0	1,8	12,6	10,0	9,0	0,9	0,4	1,3
Низ	69,2	30,8	5,0	3,0	15,0	10,0	8,0	0,8	0,4	1,4
313 дней культивирования										
Верх	81,8	18,2	5,3	2,6	13,7	6,8	9,5	1,4	0,2	2,0
Середина	100	0								
Низ	92,3	7,7	5,0	3,2	16,0	10,5	8,0	0,8	0,3	1,5
341 дней культивирования										
Верх	81,8	18,2	5,3	2,7	14,3	7,5	9,0	1,2	0,2	1,7
Середина	100	0								
Низ	100	0								
375 дней культивирования										
Верх	90,9	9,1	5,0	1,9	9,5	10,0	9,0	0,9	0,3	1,0

*ОР – отсутствие развития

Высокая приживаемость, хорошее развитие ризогенной зоны, побегов и их облиственности, высокая скорость роста наблюдалась у микрочеренков из средней части растений. Однако продолжительность их культивирования составила 230 суток. У растений,

полученных из микрочеренков нижней части побегов продолжительное хранение составила 313 суток.

Подобное положение сложилось у растений сорта Платовский. Несмотря на то, что лучшее развитие отмечено у растений, инициированных из средней и, особенно, нижней части побегов, более продолжительная сохранность выявлена у растений из микрочеренков верхней части – 280 суток. В этом варианте отмечено умеренное развитие ризогенной зоны, побегов и скорости роста.

У сорта Фиолетовый ранний растения, инициированные из верхней части побегов, при стопроцентной приживаемости, сохранились в течение 341 суток, в то время как растения из нижней части побегов сохранились лишь 117 суток, а растения из средней части побегов 147 суток. При этом следует отметить умеренное развитие ризогенной зоны, побегов, облиственности и сочетания развития корней и побегов у растений из верхней части побегов.

Совершенно иное положение выявлено, при культивировании растений из разных частей побега у сорта Кобер 5ББ – до 375 суток сохранились растения, полученные из микрочеренков средней части побегов.

Таким образом, у сортов Каберне Совиньон, Платовский, Фиолетовый ранний лучшая сохранность отмечена у растений, инициированных из микрочеренков верхней части побегов.

В результате исследований установлено, что место расположения микрочеренков оказывает влияние на приживаемость растений, ризогенез, развитие побегов, скорость роста и продолжительностью нахождения растений в культуре. Зная это, можно выбирать местоположение микрочеренков, которое обеспечит массовое тиражирование оздоровленных растений или продолжительное беспересадочное хранение растений в культуре *in vitro*.

Применение антибиотика Цефотаксим для оздоровления от фитоплазменной (микоплазменной) инфекции при микроразмножении мериклонов

Доказано, под действием антибиотика Цефотаксим снижается заражение растений бактериальной инфекцией, что выражается в улучшении приживаемости микрочеренков, регенерации и сохранности растений в вариантах с антибиотиком 100 мг/л. Однако, при значительной степени инфицирования исходного материала сорта Кобер 5 ББ высокая сохранность растений была зафиксирована в вариантах с концентрацией 300 и 500 мг /л (46 %). В контрольном варианте сохранность оставалась низкой на протяжении всего эксперимента (17–25 %).

Приживаемость микрочеренков зависела от гибели их из-за инфекции и отсутствия развития с последующим некрозом тканей (рисунок 1). В течение первого месяца культивирования наблюдалось более высокая гибель от инфекции.

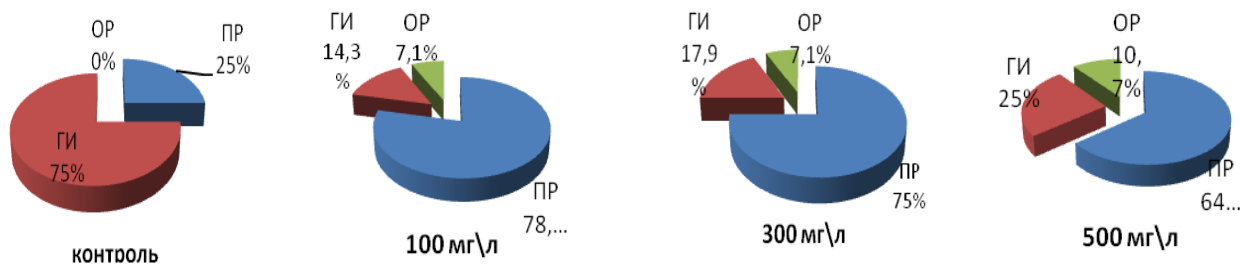


Рисунок 1 – Гибель растений сорта Кобер 5 ББ в первый месяц культивирования:
 ОР – отсутствие развития, GI – гибель от инфекции, ПР – приживаемость

В ходе исследования было установлено, что присутствие в среде антибиотика Цефотаксим в концентрации 100–300 мг/л не оказало негативного влияние на развитие ризогенной зоны и высоты растений, а в варианте 100 мг/л даже оказало стимулирующее действие.

Данные по изучению влияния антибиотика Цефотаксим на развитие растений на сорте Платовский демонстрируют высокую приживаемость (100 %) в вариантах с антибиотиком в концентрациях 100 и 300 мг/л. Растения в вариантах 300 и 500 мг/л имеют наибольшую ризогенную зону, а показатели роста побегов и облиственности снизились в 2,0–2,8 раза.

Уменьшение гибели от инфекции и повышение приживаемости растений сорта Фиолетовый ранний произошло при концентрации Цефотаксима 300 мг/л. Однако, резкое уменьшение ростовых процессов привело к гибели растений в этом варианте. Наибольшее количество растений сохранилось при концентрации Цефотаксима 50 мг/л, а лучшее развитие растений – при концентрации 100 мг/л.

Таким образом, лучшей концентрацией антибиотика Цефотаксим для массового микроразмножения является 100 мг/л. Концентрации 300–500 мг/л могут быть использованы для создания коллекций винограда *in vitro*, т.к. при достаточно высокой сохранности растений наблюдается умеренное снижение ростовых процессов.

Применение антибиотика Гентамицин

Опыт по изучению антибиотика Гентамицин заложен на сорте Фиолетовый ранний в диапазоне концентраций 0–0,05 мл/л. В первые три месяца наблюдений отмечена высокая приживаемость (80–100 %) по всем вариантам опыта. Начиная с 122-го дня культивирования, в вариантах с применением Гентамицина, наблюдалось, отсутствие развития, подсыхание растений, уменьшение числа растений в коллекции (таблица 6).

Таблица 6 – Влияние антибиотика Гентамицин на приживаемость и развитие растений, сорт Фиолетовый ранний, 2019–2020 гг.

Гентамицин, мл/л	Гибель, %		Приживаемость, %	Корни			Высота, см	Число листьев, шт.		Скорость роста, мм/сутки	Коэффициент полярности
	ГИ	ОР		число, шт.	длина, см	ризогенная зона, см		всего	на 1 см побега		
30 дней культивирования											
Контроль	0	0	100	1,9	1,4	2,7	1,4	1,7	1,2	0,5	1,9
0,005	13,3	0	86,7	1,8	1,1	2,0	1,2	1,0	0,9	0,5	2,2
0,01	10,0	0	90,0	2,4	0,7	1,7	1,2	1,2	1,1	0,4	1,7
0,03	6,7	0	93,3	1,7	0,3	0,5	1,0	1,3	1,3	0,3	0,7
0,05	3,3	0	96,7	0,9	0,2	0,2	0,4	0,8	2,1	0,1	0,5
НСР _{0,95}				0,9	0,03		0,7				
122 дней культивирования											
Контроль	6,7	10	83,3	2,0	2,6	5,2	11,9	11,8	1,0	1,0	0,5
0,005	13,3	0	86,7	1,9	2,8	5,3	7,4	9,8	1,3	0,6	0,7
0,01	10,0	23,3	66,7	2,9	1,4	4,1	7,0	8,6	1,2	0,6	0,6
0,03	10,0	40,0	50,0	2,0	0,5	1,0	4,3	7,3	1,8	0,4	0,2
0,05	16,6	46,7	36,7	1,7	0,9	1,5	2,7	5,8	2,4	0,2	0,7
НСР _{0,95}				1,8	1,4		2,5				
220 дней культивирования											
Контроль	6,7	30	63,3	3,0	2,9	8,7	15,2	15,7	1,0	0,7	0,6
0,005	13,3	0	86,7	3,2	4,0	12,8	11,7	16,9	1,5	0,5	1,1
0,01	10,0	23,3	66,7	4,6	1,9	8,7	12,9	16,2	1,3	0,6	0,7
0,03	10,0	53,3	36,7	4,7	1,0	4,7	5,9	12,2	2,1	0,3	0,9
0,05	16,7	60,0	23,3	3,2	1,3	4,2	6,0	13,1	2,4	0,3	0,8
НСР _{0,95}				–	1,4	4,8	4,6				

*Примечание: ГИ – гибель от инфекции; ОР – отсутствие развития.

Лучшая сохранность растений через 220 дней культивирования оказалась в варианте с концентрацией Гентамицина 0,005 мл/л.



Рисунок 2 – Культивирование растений на среде с различными концентрациями антибиотика Гентамицин, сорт Фиолетовый ранний

В вариантах с повышенными концентрациями (0,03–0,05 мл/л) сохранность растений уменьшилась в 1,8–2,9 раза. На протяжении всего периода культивирования отмечено замедление ростовых процессов под действием антибиотика (рисунок 2). Несмотря на увеличение числа корней, длина их уменьшалась, что вызвало уменьшение длины ризогенной зоны. Рост побегов замедлен в вариантах с концентрацией Гентамицина 0,03–0,05 мл/л. В варианте с концентрацией 0,005 мл/л самая высокая в опыте сохранность растений, наибольшая длина ризогенной зоны – 12,8 см и умеренный рост растений – 11,7 см. Растения в этом варианте имеют потенциал для дальнейшего беспересадочного хранения в коллекции.

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ОСМОТИКОВ (САХАРОЗА, СОРБИТ, ФРУКТОЗА) НА РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ МЕРИКЛОНОВ

Одним из способов торможения ростовых процессов является применение осмотически активных веществ в составе питательных сред.

Сахароза для ингибирования ростовых процессов при создании коллекции in vitro

Влияние концентрации сахарозы на рост и развитие растений винограда был заложен на сорте Фиолетовый ранний (таблица 7).

Таблица 7 – Влияние сахарозы на рост и развитие микрочеренков, сорт Фиолетовый ранний, 2018 –2019 гг.

Концентрация, г/л	Гибель, %		Приживаемость, %	Корни			Высота, см	Число листьев, шт.		Скорость роста, мм/сутки	Коэффициент полярности
	ГИ	ОР		число, шт.	длина, см	ризогенная зона, см		всего	на 1 см побега		
120 дней культивирования											
Контроль 20	0	17,9	82,1	1,1	4,9	5,4	10,8	9,9	0,9	0,9	0,5
5	0	21,4	78,6	1,5	2,2	3,3	6,5	8,0	1,2	0,5	0,5
40	0	28,6	71,4	1,7	5,6	9,5	11,9	11,9	1,0	1,0	0,8
60	0	10,7	89,3	1,2	6,6	7,9	12,2	10,2	0,8	1,0	0,6
НСР _{0,95}				–	0,7		2,5				
205 дней культивирования											
Контроль 20	0	42,9	51,7	1,1	4,6	5,1	15,2	13,0	0,9	0,7	0,3
5	0	57,1	42,9	1,6	2,5	4,0	10,7	12,5	1,2	0,5	0,4
40	0	57,1	42,9	1,6	5,2	8,3	15,3	13,6	0,9	0,7	0,5
60	0	35,7	64,3	1,2	6,2	7,4	15,8	13,1	0,8	0,8	0,5
НСР _{0,95}				–	1,4		1,6				
301 дней культивирования											
Контроль 20	0	46,4	53,6	1,1	4,7	5,2	16,2	15,0	0,9	0,5	0,3
5	0	57,1	42,9	1,6	3,1	5,0	11,5	15,2	1,3	0,4	0,4
40	0	67,9	32,1	1,6	5,3	8,5	16,2	16,6	1,0	0,5	0,5
60	0	53,6	46,4	1,5	7,6	11,4	17,0	16,2	1,0	0,6	0,7
НСР _{0,95}				–	1,4		2,3				

Самая высокая сохранность отмечена в контроле – 53,6 %. Увеличение содержания сахарозы в питательной среде до 40–60 г/л способствовало увеличению числа корней, их длины и, как следствие, увеличению ризогенной зоны в 1,7–1,9 раза.

При минимальной концентрации длина ризогенной зоны уменьшилась. Аналогичным образом изменилась высота и облиственность растений: увеличилась при концентрации 60 г/л и уменьшилась при концентрации 5 г/л. Таким образом, при концентрации сахарозы в питательной среде 5 г/л наблюдается торможение ростовых процессов.

Сорбит как ингибитор ростовых процессов

Исследования проведены на растениях сорта Каберне Совиньон на твердой питательной среде в диапазоне концентраций сорбита 5–60 г/л (таблица 8).

Таблица 8 – Влияния препарата сорбит на показатели развития растений, сорт Каберне Совиньон, 2019–2020 гг.

Концентрация сорбита, г/л	Гибель, %		Число сохранившихся жизнеспособных растений, %	Корни			Высота, см	Число листьев на 1 см побега, шт.	Скорость роста, мм/сутки	Коэффициент полярности
	ГИ	ОР		число, шт.	длина, см	ризогенная зона, см				
115 дней культивирования										
20 сахара	14,3	0,0	85,7	4,7	2,1	9,9	8,8	0,9	0,8	1,1
5	0	0,0	100	4,9	1,5	7,4	8,6	1,0	0,7	0,9
7,5	0	0,0	100	4,4	1,5	6,6	7,9	1,0	0,7	0,8
10	0	7,1	92,9	4,3	1,6	6,9	5,3	1,4	0,5	1,3
30	0	7,1	92,9	4,1	1,7	7,0	3,5	1,7	0,3	2,0
60	0	71,4	28,6	3,0	1,7	5,1	1,8	1,9	0,2	2,8
218 дней культивирования										
20 сахара	14,3	7,1	78,6	4,9	2,4	11,8	8,8	1,0	0,4	1,3
5	0	0	100	6,2	2,2	13,6	9,0	1,4	0,4	1,5
7,5	0	0	100	5,7	2,0	11,4	10,3	1,2	0,5	1,1
10	0	7,1	92,9	4,9	2,5	12,3	7,2	1,5	0,3	1,7
30	0	21,4	78,6	4,6	3,4	15,6	4,4	1,8	0,2	3,6
60	0,0	71,4	28,6	3,5	2,8	9,8	2,6	2,2	0,1	3,8
316 дней культивирования										
20 сахара	14,3	21,4	64,3	–	–	–	9,0	0,9	0,3	–
5	0	21,4	78,6	–	–	–	9,9	1,3	0,3	–
7,5	0	7,1	92,9	–	–	–	9,7	1,3	0,3	–
10	0	28,6	64,3	–	–	–	9,0	1,1	0,3	–
30	0	42,9	57,1	–	–	–	6,2	1,4	0,2	–
60	0	92,9	7,1	–	–	–	3,5	1,7	0,1	–

На протяжении десяти месяцев наблюдений в вариантах с сорбитом отсутствует гибель растений от инфекции, которая наблюдается, начиная с четвертого месяца культивирования, лишь в контрольном варианте.

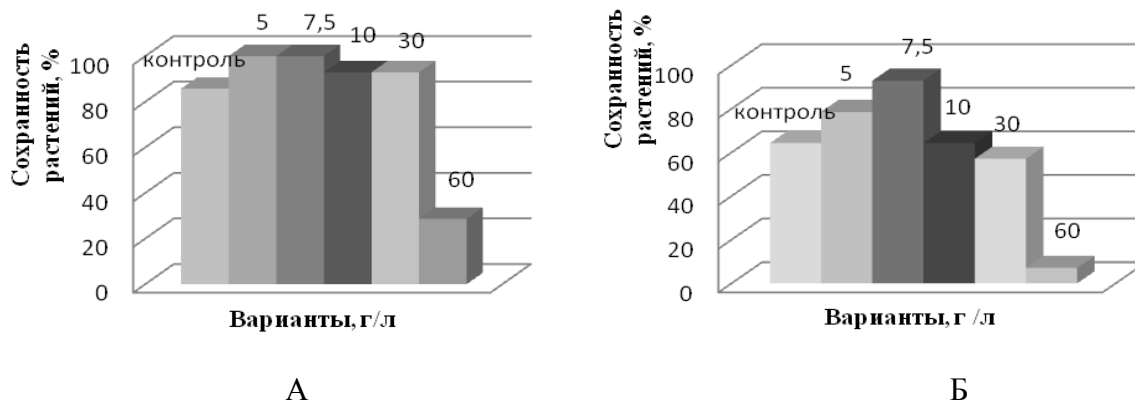


Рисунок 3 – Сохранность растений винограда сорта Каберне Совиньон:
А – 5 месяцев культивирования, Б – 10 месяцев

Максимальная сохранность отмечена в варианте 7,5 г/л – 92,9 % (контроль 64,3 %) (рисунок 3). В варианте 10 г/л сохранность была на уровне контрольной. Необходимо отметить вариант с концентрацией 30 г/л, где сохранность хоть и была несколько ниже контрольной, но в совокупности с явным торможением ростовых процессов может быть рекомендована для применения при хранении растений в коллекции.

Начиная с пятого месяца культивирования отмечено увеличение роста растений при концентрации 5 г/л и, особенно, 7,5 г/л. В вариантах с концентрацией 10, 30 и 60 г/л наблюдалось снижение скорости ростовых процессов в течение всего периода культивирования. Минимальная высота растений зафиксирована в варианте с наибольшей концентрацией сорбита – 60 г/л.

Анализ экспериментального материала дает основание считать, что сорбит может быть успешно применен в составе питательных сред для регулирования скорости ростовых процессов при культивировании *in vitro*, как для массового тиражирования оздоровленного посадочного материала, так и для создания генетической коллекции винограда *in vitro*.

Влияние концентрации фруктозы в питательной среде на скорость роста и развитие микрочеренков растений винограда

В опыте по изучению фруктозы в течение первых 4-х месяцев культивирования приживаемость микрочеренков и сохранность микрорастений была выше в вариантах с фруктозой в количестве 5,0; 10,0; 20,0 г/л (таблица 9, рисунок 4).

Резкое снижение приживаемости произошло при концентрации фруктозы 60,0 г/л. В этом варианте приживаемость с первого месяца культивирования и на протяжении всего опыта была низкая (6,7–3,3 %). Наблюдения за образованием корней, их ростом, длиной ризогенной зоны показало положительное влияние фруктозы на ризогенез. Особенно четко оно проявилось при концентрации 20,0 г/л — самая большая длина ризогенной зоны на протяжении всего периода культивирования.

Таблица 9 – Влияние фруктозы на развитие микрочеренков, сорт Фиолетовый ранний, 2019–2020 гг.

Вариант, г/л	Гибель, %		Приживаемость, %	Корни			Высота, см	Число листьев на 1 см побега, шт.	Скорость роста, мм / сутки	Коэффициент полярности
	ГИ	ОР		число, шт.	длина, см	ризогенная зона, см				
60 дней культивирования										
Контроль	0	3,3	96,7	1,9	2,4	4,6	2,7	1,0	0,5	1,8
5	0	0	100	2,0	1,8	3,6	2,8	1,1	0,5	1,2
10	0	6,7	93,3	1,9	2,3	4,4	2,1	1,0	0,4	2,1
20	0	0	100	2,2	2,6	5,7	1,4	1,2	0,2	4,5
40	0	26,7	73,3	2,6	1,7	4,4	0,4	0,5	0,1	11,9
60	0	93,3	6,7	1,3	0,8	1,0	0	0	0	0
НСР _{0,95}				–	2,2		1,1			
120 дней культивирования										
Контроль	0	3,3	96,7	2,0	3,4	6,8	7,8	0,9	0,7	0,9
5	0	0	100	1,9	3,0	5,7	6,9	1,0	0,6	0,8
10	0	6,7	93,3	2,0	3,3	6,6	5,8	1,1	0,5	1,2
20	0	0	100	2,0	4,4	8,8	4,0	1,0	0,3	2,1
40	0	26,7	73,3	2,3	3,3	7,6	2,0	1,5	0,2	6,3
60	0	76,7	5,3	1,4	0,7	1,0	0	0	0	6,3
НСР _{0,95}				–	3,7		1,3			
210 дней культивирования										
Контроль	0	13,3	86,7	2,1	3,8	8,0	13,9	0,9	0,7	0,6
5	0	16,7	83,3	2,0	3,0	6,0	14,6	1,0	0,7	0,3
10	0	40,0	60,0	1,9	3,4	6,5	14,6	1,0	0,7	0,4
20	0	40,0	60,0	2,3	5,2	12,0	13,0	1,1	0,6	0,9
40	0	76,7	23,3	1,9	2,9	5,5	7,3	1,1	0,3	0,8
60	0	96,7	3,3	1,3	0,4	0,5	1,0	0,9	0,0	0,6
НСР _{0,95}				–	1,7		4,4			



Рисунок 4 – Сохранность растений после 210 суток культивирования

Торможение роста побегов было отмечено уже через 3 месяца культивирования (рисунки 5, 6). Наиболее явным оно было при концентрациях фруктозы 20,0; 40,0 и 60,0 г/л.

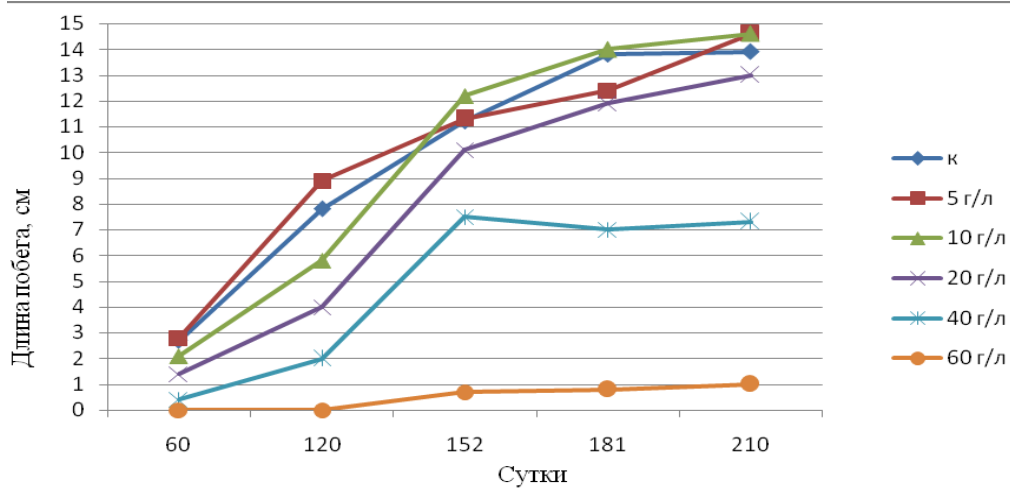


Рисунок 5 – Динамика роста побегов в зависимости от концентраций фруктозы



Рисунок 6 – Минимизация роста побегов при применении фруктозы

При концентрациях 5,0 и 10,0 г/л рост побегов был близок к контрольному. В варианте с концентраций 20,0 г/л выявлена самая развитая в опыте ризогенная зона, хорошая сохранность (60 %) и статистически значимое торможение роста побегов.

Влияние плотности питательной среды на рост и развитие растений

Максимальные показатели ростовых процессов сорта Фиолетовый ранний отмечены при содержании агар-агара 6,0 мг/л. В вариантах с содержанием агар-агара 8,0 мг/л и выше

отмечено уменьшение длины ризогенной зоны в 1,1–1,2 раза. Аналогичным образом – в 1,2 раза уменьшился рост и облиственность растений. То есть, происходит замедление ростовых процессов при высокой приживаемости растений, что необходимо для создания коллекции генофонда винограда *in vitro*.

Лучшая сохранность растений на протяжении всего периода хранения отмечена в варианте с плотностью питательной среды 10,0 г/л. Таким образом, плотность питательной среды может быть одним из параметров длительного беспересадочного хранения растений в культуре *in vitro*.

Регенерация растений после длительного хранения

Продолжительное культивирование на питательной среде с Гентамицином растений сорта Каберне Совиньон (таблица 10) не оказало отрицательного влияния на последующую регенерацию растений и интенсивность у них ростовых процессов. Во всех вариантах отмечено улучшение состояния растений.

Таблица 10 – Последствие длительного хранения растений на питательной среде с различными концентрациями Гентамицина, Каберне Совиньон, 2020 г.

Гентамицин, мл/л	Приживаемость, %	Корни			Высота, см	Листьев, шт.	Коэффициент полярности
		число, шт.	длина, см	ризогенная зона, см			
30 дней культивирования							
0	96,5	3,0	2,8	8,3	2,3	2,5	3,7
0,005	100	2,8	2,6	7,2	3,0	2,9	2,4
0,01	92,9	2,9	2,9	8,2	2,9	3,2	2,9
0,03	89,3	2,9	3,1	9,0	2,6	3,0	3,4
0,05	85,7	2,9	3,1	9,1	2,5	3,0	3,7
75 дней культивирования							
0	89,3	4,1	3,6	14,8	9,8	10,1	1,5
0,005	100	3,8	4,6	17,0	10,2	10,5	1,7
0,01	92,9	4,2	4,3	17,6	10,7	11,0	1,7
0,03	89,3	3,8	4,9	18,7	9,9	10,0	1,8
0,05	85,7	3,8	5,2	19,8	9,8	10,6	2,0

Проведены исследования последствий хранения растений сортов винограда: Варюшкин, Фиолетовый ранний, Кобер 5 ББ, Презент при пониженной положительной температуре 5,5–6,0°C в фармацевтическом шкафу.

Для изучения способности растений к регенерации после длительного хранения были взяты микрочеренки у растений, хранившихся в холодильном шкафу с 2015 года (таблица 11).

Таблица 11 – Состояние растений после длительного хранения

Сорт	Побег	Корень
Фиолетовый ранний	0,3 см	2 см
Варюшкин	3,5 см	2,3 см
Баклановский	0,5 см	2 см

Таким образом, опыт демонстрирует возможность регенерации растений после трехлетнего хладохранения в покое.

***Экономическое обоснование депонирования растений винограда
в коллекции in vitro***

Для расчета показателей экономической эффективности применен расчетно-конструктивный метод, в основе которого методические рекомендации П.Я. Голодриги, В.А. Зленко и др.(1986) и В.И. Кашина, А.А. Борисовой и др. (2001).

В таблице 12 представлена сводная смета затрат на выращивание 10 000 растений-регенерантов. Под мероприятиями следует понимать комплекс рекомендуемых мероприятий, позволяющих снижать частоту пассажей до 1 раза в 12 месяцев.

Таблица 12 – Сводная смета затрат на выращивание 10 000 растений – регенерантов

№ п/п	Затраты по статьям	Сумма, тыс. руб.	
		До предлагаемых мероприятий	После предлагаемых мероприятий
1	Оплата труда	350,792	175,396
	Начисления на фонд оплаты труда (35,8%)	122,78	64,9
2	Оплата коммунальных услуг:		
	– отопление и технологические нужды	91,3	91,3
	– потребление электроэнергии	246,8	246,8
	– водоснабжение помещений	139,7	139,7
3	– содержание помещений	0,3	0,3
	Приобретение предметов снабжения и расходных материалов:		
	– расходные материалы	99,9	99,9
	– реактивы и регуляторы роста	22,7	22,7
4	– мягкий инвентарь	10,0	10,0
	Прочие текущие расходы на закупку товаров и оплата услуг:		
	– текущий ремонт оборудования	5,0	5,0
5	– текущий ремонт зданий и сооружений	10,0	10,0
	Амортизация основных средств	–	–
	Итого прямые затраты	1099,27	867,0
	Накладные расходы (25% от оплаты труда и начислений на ФОТ)	118,4	60,1
	Стоимость затрат на выращивание 10 000 растений	1217,7	927,1
	Себестоимость одного растения	0,122	0,093

Прогнозируемый экономический эффект складывается из снижения расходов на оплату труда и расходных материалов за счет удлинения периода между пересадками с 6 месяцев до 12 вследствие снижения ростовых процессов. Предлагаемые мероприятия позволят сделать содержание растений в коллекции экономичнее на 24 %.

Оздоровление посадочного материала и содержание коллекции винограда *in vitro* – дорогостоящее направление. Однако, ввиду того, что на сегодняшний день является практически единственным надежным способом получения и хранения оздоровленного посадочного материала, оправдывает себя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработка эффективных методов микроклонального размножения является основой работ по сохранению генофонда растений. Одним из ключевых моментов создания коллекции *in vitro* является разработка приёмов введения растительного материала в стерильную культуру.

2. Для оптимизации способа оздоровления от вирусной и фитомикоплазменной инфекции необходимо дополнять культуру апикальных меристем размером 0,1–0,2 мм хемотерапией с применением препаратов Рибавирин (10,0 мг/л) и Цефотаксим (200,0 мг/л).

3. Доказано положительное влияние стимулирующего препарата Мелафена на прохождение этапа ввода меристем в культуру. При этом меристемы следует выделять из нижней и средней части пробирочных растений, а в питательную среду вводить Мелафен в концентрациях 10^{-7} – 10^{-9} .

4. Установлено, что место расположения микрочеренков на побеге оказывает влияние на приживаемость растений, ход ростовых процессов и продолжительность нахождения растения в культуре. У сортов Каберне Совиньон, Платовский, Фиолетовый ранний отмечена лучшая сохранность растений, инициированных из микрочеренков верхней части побегов, у сорта Кобер 5 ББ – из микрочеренков средней части побегов.

5. На этапе размножения мериклонов определены лучшие концентрации антибиотика Цефотаксим для массового микроразмножения (100 мг/л) и ингибирующие для содержания в коллекции (300 мг/л) для сотов винограда Каберне Совиньон, Платовский, Фиолетовый ранний.

6. Выявлено ингибирующее действие антибиотика Гентамицин у сорта Фиолетовый ранний в концентрациях 0,05–0,03 мг/л.

7. Добавление сахарозы в питательную среду в концентрациях 40–60 г/л способствовало улучшению ризогенеза и роста растений, при минимальной концентрации (5 г/л) наблюдалось торможение этих процессов.

8. Ингибирующая роль сорбита (Каберне Совиньон) выявлена при концентрациях 10,0; 30,0, 60,0 г/л; стимулирование ростовых процессов было выявлено при минимальных концентрациях препарата. Введение в питательную среду сорбита способствовало самому продолжительному беспересадочному хранению в сравнении с другими углеводами (сахароза, фруктоза).

9. Торможение роста побегов наблюдалось при концентрациях фруктозы 20,0; 40,0 и 60,0 г/л. В варианте с концентрацией фруктозы 20,0 г/л выявлена самая развитая в опыте ризогенная зона.

10. Установлено, что плотность питательной среды может быть одним из параметров длительного беспересадочного хранения растений в культуре *in vitro*, т.к. с увеличением плотности происходит снижение ростовых процессов.

11. На основании проведенных исследований **разработана стратегия (схема) и методология создания банка асептических растений**: интактные растения → апикальные меристемы + хемотерапия → цикл культивирования *in vitro* → оптимизация параметров продолжительного беспересадочного хранения → сохранение в культуре *in vitro* растений при оптимальных параметрах → создание коллекции генетических ресурсов → осуществление контроля над состоянием растений в процессе хранения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Ввод апикальных меристем размером 0,1–0,2 мм в культуру необходимо дополнять хемотерапией с применением препаратов Рибавирин (10,0 мг/л) и Цефотаксим (200,0 мг/л). Для оптимизации регенерационной способности меристем вводить в питательную среду Мелафен в концентрациях 10^{-7} – 10^{-9} .

2. С целью повышения эффективности оздоровления меристемы следует выделять из пробирочных растений.

3. Проведение предварительного оздоровления на питательной среде с Цефотаксимом (200–300 мг/л) позволит повысить сохранность растений в коллекции *in vitro*.

4. При создании коллекции из пробирочных растений микрочеренки следует отбирать из верхней и средней части побегов.

5. Применять антибиотики Цефотаксим (200–300 мг/л) и Гентамицин (0,005) для увеличения продолжительности беспересадочного хранения растений в коллекции.

6. Для клонального микроразмножения и создания коллекции следует применять углеводы: сахароза, фруктоза, сорбит.

**СПИСОК РАБОТ, В КОТОРЫХ ОПУБЛИКОВАНЫ ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ
ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

1. Пузырнова В.Г., Дорошенко Н.П. Протокол испытаний по созданию коллекции *in vitro* для сорта винограда Фиолетовый ранний // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2021. – № 68 (2). – С. 28–45.
2. Пузырнова В.Г., Дорошенко Н.П. Preserving grapevine variety Fioletoviy Ranniy in the collection *in vitro* // E3S WEB OF CONFERENCES XIV International Scientific and Practical Conference “State and Prospects for the Development of Agribusiness - INTERAGROMASH 2021”. Rostov-on-Don, 2021 С. 1–7.
3. Дорошенко Н.П., Пузырнова В.Г. Влияние осмотика сорбит на ростовые процессы винограда в культуре *in vitro* // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2020. – № 64(4). – С. 190–209.
4. Дорошенко Н.П., Пузырнова В.Г. Biotechnological methods of preservation of the grape gene pool in the *in vitro* collection // BIO Web Conf. – Volume 25 (2020) – <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202504001>
5. Дорошенко Н.П., Пузырнова В.Г. Влияние фруктозы на ростовые процессы и хранение винограда в коллекции *in vitro* // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2020. – № 66(6). – С. 184–197.
6. Дорошенко Н.П., Пузырнова В.Г. Некоторые аспекты создания коллекции генофонда винограда *in vitro* // Актуальные вопросы развития отраслей сельского хозяйства: теория и практика. III Всероссийская научно практическая конференция "Проблемы и перспективы биологического земледелия "Изд. ЮФУ. Ростов-на Дону – Таганрог, 2019. – С 120–127.
7. Дорошенко Н.П., Пузырнова В.Г., Венценосцева Н.С. Плотность питательной среды при культивировании винограда *in vitro* // Русский виноград. – 2019. – Т 9. – С. 13–19.
8. Пузырнова В.Г., Дорошенко Н.П. Разработка приёмов введения растительного материала винограда в стерильную культуру // Виноградарство и виноделие. Сборник научных трудов Том XLVIII Материалы международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. Магарач, 2019. – Т. 48. – С. 40–42.
9. Дорошенко Н.П., Пузырнова В.Г. Оздоровление растений от фитоплазм и микоплазм при клональном микроразмножении винограда // Русский виноград. 2018. – Т. 8. – С. 44–52.
10. Дорошенко Н.П., Куприкова А.С., Пузырнова В.Г. Сахароза как ингибитор роста при хранении растений винограда в коллекции *in vitro* // Приоритетные направления отраслевого научного обеспечения, технологии производства, хранения и переработки сельскохозяйственной продукции: Сборник материалов VII-й Международной дистанционной научно-практической конференции молодых ученых. Краснодар: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия". – 2017. – С. 65–72.
11. Дорошенко Н.П., Куприкова А.С., Пузырнова В.Г. Влияние сахарозы на замедление роста и сохранение растений винограда в коллекции *in vitro* // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2017. – № 46 (4). – С. 33–48.

Научное издание

Пузырнова Валентина Георгиевна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ВИНОГРАДА
ДЛЯ СОЗДАНИЯ КОЛЛЕКЦИИ ГЕНОФОНДА IN VITRO**

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Подписано в печать 18.11.21. Формат 60 x 84_{1/16}

Усл. печ. л. – 1,0. Тираж 100 экз. Заказ № 442

Типография Новочеркасская цифровая. 346400, г. Новочеркасск, ул Пушкинская, 94.