

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МИЧУРИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

МЕЛЕХОВ ИГОРЬ ДМИТРИЕВИЧ

На правах рукописи



**ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛОНАЛЬНОГО
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР РОДА *RUBUS***

Специальность: 4.1.4 Садоводство, овощеводство, виноградарство и
лекарственные культуры

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Муратова С. А.

МИЧУРИНСК-НАУКОГРАД – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОФИЗИКИ В СИСТЕМЕ ВОСПРОИЗВОДСТВА РАСТЕНИЙ РОДА <i>RUBUS</i> L. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	11
1.1 Особенности клонального микроразмножения ягодных культур рода <i>Rubus</i>	11
1.2 Влияние спектрального состава света на морфогенез растений <i>in vitro</i>	27
1.3 Биологическое действие низкоинтенсивного лазерного излучения на растения в условиях <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	32
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ	35
2.1 Место и условия проведения исследования	35
2.2 Биологические объекты исследований	36
2.3 Методика исследований	45
2.3.1 Культивирование ягодных растений рода <i>Rubus in vitro</i>	45
2.3.2 Оценка влияния спектрального состава света на морфогенез растений <i>in vitro</i>	46
2.3.3 Оценка влияния лазерного излучения на морфогенез растений <i>in vitro</i>	49
2.3.4 Адаптация микрорастений	50
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	54
3.1 Культивирование растений рода <i>Rubus</i> на питательных средах разного состава на этапе мультипликации	54
3.2 Укоренение микрочеренков растений рода <i>Rubus in vitro</i>	64

3.3 Влияние спектрального состава света на эффективность размножения, ризогенеза и роста микропобегов ягодных культур рода <i>Rubus</i>	76
3.4 Влияние лазерного облучения на эффективность размножения, ризогенеза и роста микропобегов ягодных культур рода <i>Rubus</i>	88
3.5 Адаптация и дорастивание растений рода <i>Rubus</i>	96
3.5.1 Особенности адаптации микрорастений ягодных культур рода <i>Rubus</i> в условиях защищенного грунта	96
3.5.2 Влияние субстрата и минеральных добавок на приживаемость и рост микрорастений на этапе адаптации	103
3.5.3 Влияние корневых обработок микрорастений бактериальными препаратами на вегетативное развитие растений на этапе адаптации	108
3.6 Экономическая эффективность клонального микроразмножения растений рода <i>Rubus</i>	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	117
РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121

ВВЕДЕНИЕ

Малина, ежевика и ежемалиновые гибриды – популярные ягодные культуры, которые возделываются в промышленных масштабах во многих странах мира. Растет производство ягодной продукции в нашей стране. Например, площадь посадок малины в России по данным BusinesStat за 5 лет выросла на 17,6%: с 20,5 тыс. га в 2018 году до 24,1 тыс. в 2022. В последние годы активному росту производства ягод активно способствует реализация программ импортозамещения, в ходе которых сельхозпроизводителям выделяются субсидии на закладку новых насаждений и уход за ними.

В настоящее время рынок этих ягодных культур направлен на постоянное расширение ассортимента за счет включения в производство новых крупноплодных сортов, обладающих экологической пластичностью и пригодных к интенсивным технологиям возделывания. Растет число производителей ягодной продукции, в том числе в условиях защищенного грунта. При этом в 2022- 2023 годах в результате санкций ограничен доступ к импортным саженцам. По разным оценкам, зависимость России от импортных саженцев плодово-ягодных культур составляет от 40% до 50%. В связи с этим имеет место дефицит качественного посадочного материала ряда ягодных культур, в том числе сортов ежевики с растянутым плодоношением, ремонтантной малины, ежемалиновых гибридов.

Клональное микроразмножение - перспективный способ вегетативного размножения растений, который позволяет ускорить процесс размножения и получить генетически однородные растения, оздоровленные от фитопатогенов, вирусов и других инфекций. Применение этого метода позволяет решить проблему недостаточного объема собственного производства качественных оздоровленных саженцев. В настоящее время во всем мире для закладки плантаций ягодных культур все чаще используется посадочный материал, оздоровленный от вирусов и других патогенов с использованием методов культуры апикальных меристем, термо- и хемотерапии.

Актуальность исследований. Для многих ягодных культур метод клонального микроразмножения разработан достаточно эффективно. В то же время необходимость быстрого размножения селекционных новинок и культур, пользующихся повышенным спросом у производителей и садоводов-любителей, обуславливает необходимость подбора и оптимизации протоколов размножения в зависимости от видовых и сортовых особенностей растений. Ряд аспектов выращивания *in vitro* новых сортов растений рода *Rubus* требуют дополнительной разработки вследствие недостаточного коэффициента размножения, появления хлорозных побегов во время культивирования, низкой эффективности укоренения ряда генотипов. Остаются проблемы на этапе адаптации растений.

Успех культивирования конкретного генотипа определяется множеством факторов, одним из важнейших из них является свет. Свет является не только источником энергии, контролирующим фотосинтез, но и важным фактором, влияющим на дифференциацию и рост эксплантов в культуре тканей. Различные участки спектра влияют на многие аспекты жизнедеятельности растения (Карначук, Головацкая, 1987; Константинова и др., 1998; Белоус и др., 2012; Al-Mayahi, 2016; Gupta, Agarwal, 2017). С каждым годом набирают популярность светодиодные (LED) источники света. По сравнению с другими источниками света они потребляют в 2-3 раза меньше электроэнергии (Юнович, 2003) и позволяют комбинировать светодиоды различных цветов в одном светильнике, что дает возможность сформировать фактически любой спектр для конкретной культуры и фазы ее развития (Gupta, Agarwal, 2017). Применение светодиодов в биотехнологии на сегодняшний день находится на этапе своего становления. Большое практическое значение имеет определение специфичности действия двух основных областей ФАР – синей и красной на морфогенетические процессы на разных этапах культивирования. Искусственное освещение растений в культуральных комнатах и теплицах не может быть заменено каким-либо другим агротехническим приемом или способом выращивания. Правильный выбор

источников излучения – важнейшее условие при выращивании растений в условиях *in vitro* и в защищенном грунте.

Еще одним направлением применения биофизических факторов воздействия для стимуляции морфогенетических процессов *in vitro*, является использование низкоинтенсивного когерентного излучения лазера (НКИ). Степень достигнутого эффекта зависит от типа используемого лазера, режимов облучения, типа и физиологического состояния растительного экспланта и других факторов (Будаговский, 2008). Отсутствие универсальной методики лазерного облучения растительных тканей в условиях *in vitro* определяет необходимость проведения научных исследований с применением разного типа лазеров, подбора наиболее эффективных и технологичных режимов облучения и разработки практических рекомендаций по облучению разных растительных объектов.

Производство качественного отечественного посадочного материала ягодных культур с привлечением методов биотехнологии и биофотоники будет способствовать обеспечению импортонезависимости при закладке производственных насаждений ягодников и увеличению потребления ягодной продукции в нашей стране.

Цель и задачи исследований

Цель исследований: повышение эффективности клонального микроразмножения ягодных культур рода *Rubus* с применением биохимических и биофизических факторов воздействия.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Оптимизировать состав питательных сред на этапах микроразмножения и укоренения микрочеренков *in vitro* применительно к перспективным для средней полосы России сортам ремонтантной малины, ежевики и ежемалиновых гибридов.

2. Изучить влияние спектрального состава света светодиодных и люминесцентных светильников на эффективность клонального микроразмножения ягодных культур рода *Rubus*.

4. Определить влияние низкоинтенсивного когерентного излучения гелий-неонового и полупроводникового лазера на морфометрические показатели микрорастений на разных этапах клонального микроразмножения ягодных культур рода *Rubus*.

5. Разработать приемы повышения эффективности адаптации микрорастений ягодных культур рода *Rubus*.

6. Дать оценку экономической эффективности производства посадочного материала ягодных растений рода *Rubus* методом клонального микроразмножения.

Научная новизна исследований. Впервые с учётом видо- и сортоспецифичности генотипов оптимизированы условия прохождения основных этапов технологии клонального микроразмножения ряда сортов ягодных культур рода *Rubus*: ежевики, ежемалиновых гибридов, ремонтантной малины. Проведена оптимизация минерального, углеводного и гормонального состава питательных сред на этапах размножения и укоренения включенных в исследования генотипов.

Впервые к изучаемым генотипам с целью повышения эффективности клонального микроразмножения применены физические регуляторные воздействия - низкоинтенсивное когерентное излучение (НКИ) лазера и свет разного спектрального состава. Показано, что при использовании светодиодных светильников на этапе ризогенеза, добавление к основному белому свету красного и синего спектра в зависимости от генотипа на 10-14 дней ускоряет процесс образования корней, на 25-50% повышает частоту укоренения и в 1,5-3,2 раза увеличивает число корней на укорененное микрорастение.

Определены наиболее эффективные экспозиции облучения микрочеренков гелий-неоновым и полупроводниковым лазером на разных

стадиях культивирования ягодных культур рода *Rubus*. Показано, что применение лазерного облучения в 1,5-2,3 раза повышает эффективность размножения, укоренения и прирост побегов культивируемых растений. У облученных микрорастений возрастает число и длина корней, прирост побегов по отношению к контролю.

Рекомендован состав субстрата, минеральных подкормок, биопрепаратов на бактериальной основе, повышающих приживаемость микрорастений на этапе адаптации и стимулирующих их рост в условиях защищенного грунта.

Теоретическая и практическая значимость исследований. Разработаны методические подходы, повышающие эффективность клонального микроразмножения и адаптации ягодных культур. Изучены особенности морфогенетического потенциала перспективных сортов ягодных растений рода *Rubus* на основе инициации меристематических тканей. Оптимизирован минеральный и гормональный состав питательных сред, максимально реализующий регенерационную способность растений. Показана целесообразность снижения энергоемкости технологии клонального микроразмножения путем применения методов биофотоники.

Оптимизированная технология получения корнесобственного посадочного материала ягодных культур рода *Rubus* послужит основой для производственного размножения перспективных генотипов ежевики, ежемалиновых гибридов и ремонтантной малины. Усовершенствованные методики клонального микроразмножения с применением низкоинтенсивного когерентного излучения лазера (НКИ) и светодиодного освещения с добавлением к белому красного и синего спектра на разных этапах культивирования растений применимы не только к изучаемым биологическим объектам, но и к растениям других таксономических групп. Разработанные методические приемы направлены на повышение качества посадочного материала ягодных культур и снижение их себестоимости.

Полученные результаты могут быть использованы в учебном процессе в качестве дополнительного материала при проведении лекционных и лабораторно-практических работ для студентов, обучающихся по направлениям подготовки 19.03.01 «Биотехнология», 35.03.05 «Садоводство» и 35.03.03 «Агрохимия и агропочвоведение».

Личный вклад автора. Диссертация является результатом научных исследований, выполненных лично автором на базе учебно-исследовательской лаборатории биотехнологии ФГБОУ ВО Мичуринского ГАУ. Автор участвовал во всех этапах работы: постановка цели и определение задач исследований, выборе методов исследования, постановке экспериментов, в проведение учетов и обработке данных, подготовке публикаций и докладов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Оптимальный минеральный и гормональный состав питательных сред при клональном микроразмножении сортов ягодных культур рода *Rubus*.
2. Оптимальный спектральный состав света при использовании светодиодных и люминесцентных светильников на разных этапах клонального микроразмножения ягодных культур рода *Rubus*.
3. Стимулирующее влияние облучения гелий-неоновым и полупроводниковым лазером растительных тканей на процессы размножения и корнеобразования при культивировании *in vitro* ягодных культур рода *Rubus*.
4. Условия эффективного перевода микрорастений ягодных культур рода *Rubus* из *in vitro* в *in vivo*.

Апробация работы. Основные положения и результаты исследований были представлены автором на: VIII Международной научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира» (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты), (г. Ялта, Республика Крым, 01-05 октября 2018 г); 71-й Международной научно-практической конференции студентов и аспирантов «АПК XXI века: Образование, инновации, перспективы» (ФГБОУ

ВО Мичуринский ГАУ, г. Мичуринск-наукоград РФ, 19-21 марта, 2019), XIV Всероссийской выставке «День садовода-2019» (г. Мичуринск, 12-14 сентября 2019 года); II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 20-летию образования Ботанического сада НИУ «БелГУ» «Ботанические сады в XXI веке: сохранение биоразнообразия, стратегия развития и инновационные решения: сборник научных материалов» (г. Белгород, 23-26 сентября, 2019 г) Национальной научно-практической конференции, посвященной 85-й годовщине со дня рождения профессора, доктора сельскохозяйственных наук, лауреата Государственной премии Потапова Виктора Александровича (г. Мичуринск 11-13 декабря 2019 г.).

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 3 публикации, входящие в перечень журналов ВАК РФ и 2 в МБД.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 144 страницах, содержит 27 таблиц, 73 рисунка, состоит из введения, 3 глав, заключения, рекомендаций производству, список литературы содержит 210 источников.

ГЛАВА 1 ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОФИЗИКИ В СИСТЕМЕ ВОСПРОИЗВОДСТВА РАСТЕНИЙ РОДА *RUBUS* L. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Особенности клонального микроразмножения ягодных культур рода *Rubus*

Ягодные культуры рода *Rubus* активно размножают традиционными способами вегетативного размножения: корневыми отпрысками, зелеными черенками и верхушечными отводками. Вегетативное размножение малины чаще всего основано на способности образовать на корнях адвентивные почки, что позволяет достаточно успешно размножать малину корневыми отпрысками (Казаков и др., 2007). Стелющиеся формы ежевики, ежемалиновых гибридов и малины черной достаточно легко размножить верхушечными отводками, однако, количество растений, получаемых с одного маточного куста, невелико.

В настоящее время ягодные культуры активно тиражируют и в условиях *in vitro*. Применение метода клонального микроразмножения растений позволяет проводить работы круглогодично, на основе единичных исходных экземпляров получить большое количество генетически однородного материала в достаточно короткие сроки, тиражировать растения, которые трудно размножить традиционными способами, в сочетании с термо- и хемотерапией переходить к производству безвирусного посадочного материала, что делает его практически незаменимым способом воспроизводства широко востребованных сортов и перспективных гибридов. Этот метод успешно применяется для ускоренного размножения декоративных, ягодных и плодовых культур (Высоцкий, 1986; 1989; 1998; 2000; Митрофанова, 1997; Вечернина, 2004; Калашникова, Родин, 2007; Иванова и др., 2014; Молканова и др., 2010; 2016).

Благодаря развитию методов биотехнологии растений создаются банки генотипов растений в виде коллекций стерильных культур *in vitro* (Дунаева и др., 2018; Молканова и др., 2016; 2020). Исключительную ценность этот метод представляет для поддержания биоразнообразия коллекций ботанических садов и сохранения генофонда растений, особенно в тех случаях, когда вид или сорт представлен в единичных экземплярах. Методы культивирования растительных тканей *in vitro* лежат в основе исследований по тканевой селекции и генетической инженерии растений.

Широкое применение технологии клонального микроразмножения растений стало возможным во второй половине двадцатого века, а в последние десятилетия этот метод размножения стал основой массового промышленного производства растений, отвечающего запросам современного рынка посадочного материала. Лидерами в этой области являются такие страны как Польша, Италия, Нидерланды, США, Индия, Израиль. В основном эта перспективная технология ориентирована на производство декоративных, ягодных, лекарственных и лесных культур. В то же время, этот метод справедливо считается трудоемким и дорогостоящим, т.к. для его успешного применения необходима организация лаборатории, оснащенной необходимым оборудованием и расходными материалами и имеющей в своем штате высококвалифицированный персонал, способный выполнять большой объем ручного труда.

Методы культивирования растений рода *Rubus in vitro* служат основой получения высококачественного оздоровленного посадочного материала. Это весьма актуально для растений рода *Rubus* L, так как они сильно поражаются грибными и вирусными инфекциями, которые могут снизить урожайность до 30-80%, ухудшить качество плодов и даже привести к преждевременной гибели растений (Jones, 1986; Казаков и др., 2009). Некачественный посадочный материал может стать источником распространения корневой гнили, малинной галлицы, почкового клеща что существенно снизит урожайность и качество плодов. Чтобы обеспечить закладку промышленных

насаждений качественным посадочным материалом необходима как тщательная проверка донорных растений на наличие патогенной инфекции перед введением в культуру *in vitro*, так и соблюдение всех требований технологии производства оздоровленного материала.

Применение методов биотехнологии позволяет получать в достаточном количестве вегетативное потомство трудно размножаемых в обычных условиях видов и сортов растений. Так, метод клонального микроразмножения активно используется для размножения гибридных ремонтантных форм малины, имеющих низкие коэффициенты размножения при традиционных способах вегетативного размножения (Казаков, Евдокименко, 2007). Кроме того, есть данные, что растения-регенеранты после прохождения культуры *in vitro* обладают повышенной способностью к вегетативному размножению (Pliego–Alfare, 1988).

Клональное микроразмножение - сложный многофакторный процесс, который состоит из двух принципиально разных этапов: *in vitro* и *ex vitro* и зависит от целого комплекса факторов. К наиболее значимым из них следует отнести: биологические особенности генотипа и условия культивирования (минеральный состав питательной среды, соотношение и концентрация регуляторов роста, тип и концентрация углеводов, рН и консистенция питательной среды, температура, освещение (интенсивность и спектр) (Бутенко, 1999; Вечернина, 2004; Калашникова, Родин, 2007; Иванова и др., 2014; Калашникова, 2022).

Реализацию свойство тотипотентности клеток высшего растения можно как путем соматического эмбриогенеза, так и органогенеза (Катаева, Бутенко, 1983; Бутенко, 1999; Першина, 2000; Калашникова, 2022).

Общепринятой классификации методов размножения растений *in vitro* нет. Большинство отечественных исследователей придерживаются классификации Н.В. Катаевой и Р.Г. Бутенко (1983), которые выделяют два основных типа микроразмножения:

- 1) активация развития имеющихся в растении меристем апикальных,

пазушных и спящих почек, что обеспечивает генетическую идентичность регенерантов;

2) регенерация побегов или эмбриоидов *de novo*: прямым путем – непосредственно из специализированных тканей или непрямым путем – из первичной или пересадочной каллусной ткани, а также клеток суспензионной культуры. В этом случае сначала происходит дедифференциация существующих специализированных тканей с последующей их дифференциацией, а затем развиваются почки и побеги, что может привести к возникновению мутаций (Деменко, 2007).

Поэтому при производстве посадочного материала чаще всего используют метод активации пресформированных меристем апикальных или латеральных почек. Меристемы почек наиболее стабильны в генетическом отношении, поэтому включение их в цикл размножения максимально обеспечивает соответствие растений-регенерантов исходному генотипу. Генетическую стабильность полученных регенерантов контролируют методами цитогенетического и ПЦР-анализов (Иванникова, 2012; Божидай и др., 2016).

Традиционно выделяют четыре основных этапа клонального микроразмножения: введение в культуру *in vitro*, собственно микроразмножение, укоренение микропобегов, адаптация растений к условиям *in vivo* (Катаева, Бутенко, 1983; Бутенко, 1999). В ряде случаев схема размножения может включать дополнительные этапы: подращивание стерильной культуры перед высадкой микрочеренков на среды укоренения; дорращивание микрорастений на гидропонной установке перед высадкой их в почву (Катаева, Бутенко, 1986; Бутенко, 1999; Картель, Кильчевский, 2005).

На первом этапе работ по клональному микроразмножению растений правильный выбор исходного растения-донора, эффективной схемы стерилизации и выбор питательной среды введения, обеспечивающей рост эксплантов, во многом определяет успех всей работы.

Исходные растения-доноры должны быть максимально здоровыми. Для обеспечения максимальной эффективности стерилизации и генетической стабильности клонируемого материала стараются использовать молодые, слабодифференцированные ткани, не пораженными грибковыми, бактериальными и вирусными болезнями, с растений, которые находятся в состоянии интенсивного роста. Схема стерилизации зависит от типа и особенностей экспланта и подбирается индивидуально. Как правило, чем меньше размер исходного экспланта, тем ниже его регенерационная способность. Однако при использовании крупных эксплантов повышается вероятность присутствия патогенов. Успешность выбранной методики стерилизации определяется количеством полученного жизнеспособного материала, пригодного для дальнейшего культивирования.

Для поверхностной дезинфекции растительного материала применяют широкий набор химических реагентов. В настоящее время разработано и активно используется множество схем стерилизации, адаптированных к специфике культуры и типу экспланта. Выбор стерилизатора и схемы стерилизации определяется, прежде всего, типом экспланта.

Выделенные экспланты перед стерилизацией тщательно отмывают проточной водой, иногда с моющими средствами, очищают от излишних тканей. С корнеплодов и корней снимают кожуру, с побегов – кору, с почек – кроющие чешуи (Бутенко, 1999; Першина, 2000; Муратова и др., 2008; Калашникова, 2022).

Для освобождения от микроорганизмов экспланты подвергают поверхностной стерилизации растворами ртутьсодержащих или галогенсодержащих препаратов и тщательно промывают стерильной водой. Для стерилизации используют растворы сулемы (0,1%), нитрата ртути (0,2%), спирта (70%), гипохлорита натрия или кальция, йода (0,01%), бенлата (0,2%) (Dixon, 1985; Бутенко, 1999). Применяют простую стерилизацию (один стерилизующий агент) или ступенчатую стерилизацию (последовательно несколько стерилизующих агентов). Этиловый спирт часто применяют для

предварительной стерилизации, протирая им поверхность материала или погружая растительный материал на несколько секунд в абсолютный спирт.

Поверхностная стерилизация часто не решает проблему стерильности, особенно при использовании эксплантов, взятых со взрослых многолетних растений, поскольку они могут быть сильно заражены внутренней инфекцией, что значительно затрудняет обеспечение асептики материала.

Для борьбы со скрытыми инфекциями в питательные среды введения добавляют антибиотики и фунгициды. Однако, это может способствовать размножению экземпляров, пораженных патогенными микроорганизмами (Высоцкий, Валиков, 2014).

Эффективность стерилизации, жизнеспособность исходных эксплантов и их дальнейшее развитие в условиях *in vitro* и от времени их изоляции с маточных растений. Многие авторы (Высоцкий, 1986; Матушкина, Пронина, 1989; Муратова и др., 2005; 2008; Пронина, Матушкина, 2009; Borkowska, 1993) считают, что лучшим сроком введения в культуру *in vitro* является фаза выхода растений из состояния покоя и фаза активного роста побегов.

Если не ставится задача избавления от вирусной инфекции обычно используют экспланты размером от 0,2 до 1,0 см, например, почки или узлы молодого побега. Для получения каллусных культур чаще всего используют листья и фрагменты стебля.

Для введения в культуру *in vitro* представителей рода *Rubus* в качестве исходного экспланта обычно используют апикальные и латеральные почки или узлы растущих побегов (Муратова и др., 2008; Соловых и др., 2010; Иванова-Ханина, 2014). Как правило, чем больше по размеру и более организован исходный эксплант, тем легче и быстрее происходит его регенерация в культуре (Иванова-Ханина, 2014). В то же время, если стоит задача получения безвирусного растительного материала для введения в культуру традиционно используют апикальные меристемы.

Оптимальным сроком введения эксплантов ягодных растений в стерильную культуру часто называют конец апреля – май, т.е. период активной вегетации (Муратова и др., 2005; 2008; Соловых и др., 2010). В то же время, есть данные, что использование молодых, нежных растительных тканей в весенний период может привести к сильному их повреждению стерилизующими агентами и в связи с этим использование в качестве эксплантов вызревших почек с плотными покровами малины и ежевики в осенний период может повысить долю жизнеспособных эксплантов (Иванова-Ханина, 2014).

Дополнительную трудность на этапе введения может представлять выделение из поврежденных растительных тканей в питательную среду продуктов окисления фенольных соединений, что приводит к ингибированию регенерационных процессов и нередко к некрозу тканей (Таварткиладзе, Вечернина, 2007; Соловых, 2009; Соловых и др., 2010). Визуально это это проявляется в почернение срезов эксплантов и питательной среды вокруг них (Упадышев, 2008).

Для минимизации отрицательного действия окислительных процессов в растительных тканях используют различные методические приемы. Такие как: добавление в питательную среду антиоксидантов (аскорбиновая кислота, лимонная кислота, поливинилпирролидон, глутатион восстановленный и др.), применение жидких питательных сред, частые пересадки эксплантов и другие (Бутенко, 1999; Першина, 2000; Муратова и др., 2008; Калашникова, 2022).

На этапе введения в стерильную культуру представителей рода *Rubus* обычно используют среду Мурасиге-Скуга с добавлением 6-бензиламинопурина (Пронина, 2009; Оразбаева и др., 2012). Применяют также провокационные питательные среды, стимулирующие рост микроорганизмов, с последующей выбраковкой зараженные эксплантов (Деменко, 2007).

Основные принципы культивирования растительных тканей даны в специализированных руководствах и обзорах (Калинин и др., 1980; Dixon, 1985; Калинин и др., 1992; Бутенко, 1999; Кушнір, Сарнацька, 2005;

Калашникова, 2022). На практике, в зависимости от типа экспланта и качества растительного материала при введении в культуру приходится вносить существенные коррективы в общепринятые методики

На этапе субкультивирования главная цель – массовое тиражирование побегов путем регулярных пересадок на свежие питательные среды. На этом этапе определяющую роль играют видовые и сортовые особенности культивируемых растений, состав среды и физические условия культивирования.

Известно большое количество питательных сред, используемых для культивирования тканей растений. Все среды для растений содержат минеральные соли, углеводы, витамины и фитогормоны (Калинин и др., 1980; 1992; Катаева, Бутенко, 1986; Бутенко, 1999; Першина, 2000; Джигадло и др., 2005). Для размножения ягодных культур используют питательные среды Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962), Woody Plant Medium (Lloyd, McCown, 1980), Андерсона (Anderson, 1984), Кворина-Лепуавра (Quoirin, Lepoivre, 1977), Гамборга и Эвелега В₅ (Gamborg, 1968) и DKW (Driver, Kuniyuki, 1984). Минеральный состав данных сред приведен в таблице 1.

Размножение растений рода *Rubus* наиболее часто проводят на средах с минеральным составом по прописи MS (Расторгуев, 1996; Упадышев, Высоцкий, 1991; Муратова и др., 2004; Упадышев, Гуськов, 1996; Джигадло и др., 2005; Соловых, 2009). Хорошие результаты по размножению ежевики получены и на питательной среде Ли и де Фоссарда (Ташматова и др., 2014).

При выборе питательной среды стараются учитывать не только коэффициент размножения и прирост побегов, но и качество образовавшихся микропобегов. Обращают внимание на отсутствие или наличие признаков витрификации или хлороза, внешний вид листьев и побегов и степень их развития.

Постоянно ведутся работы по корректировке и оптимизации состава питательных сред в зависимости от культивируемых генотипов.

Таблица 1 - Минеральный состав питательных сред

Компоненты	Концентрация в питательной среде, мг/л					
	MS	B5	Андерсон	QL	WPM	DKW
Макросоли						
NH ₄ NO ₃	1650,0	2500,0	400,0	400,0	400,0	1416,0
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	–	150,0	380,0	–	–	–
KNO ₃	1900,0	–	480,0	1800,0	–	–
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440,0	150,0	440,0	–	96,0	147,0
CaCl ₂	–	–	–	–	–	–
Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O	–	–	–	833,8	556,0	1811,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370,0	250,0	370,0	0,76 или	370,0	740,0
MgSO ₄ ангидрат	–	–	–	175,8	–	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	–	134,0	–	–	–	–
KH ₂ PO ₄	170,0	–	–	270,0	170,0	258,0
K ₂ SO ₄	–	–	–	–	990,0	1560,0
Хеллат железа						
Na ₂ ·EDTA	37,3	37,3	74,5	37,3	37,3	36,7
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8	55,7	27,8	27,8	–
Микросоли						
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	10,0	–	1,0	–	–
MnSO ₄ ·H ₂ O	–	–	16,9	–	–	33,8
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	2,0	8,6	8,6	8,6	21,2
H ₃ BO ₃	6,2	3,0	6,2	6,2	–	12,4
KJ	0,83	0,75	0,3	0,08	–	–
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	–	0,5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,25	0,05
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	–	0,05

Например, при культивировании сортов ремонтантной ежевики в среду вносили 25–50 мг/л аморфного диоксида кремния (Немцова и др., 2020). Результаты исследований, полученные при культивировании двух сортов, были разными. Выявлен положительный эффект внесения 25–100 мг/л аморфного диоксида кремния в среду при культивировании ежевики сорта Рубен. На среде, содержащей 50 мг/л аморфного кремнезёма, коэффициент размножения этого сорта превышал контрольный вариант в 1,5 раза. В то же время при использовании аморфного диоксида кремния «Ковелос» наблюдалась тенденция к уменьшению длины побега и коэффициента размножения растений ежевики сорта Прайм-Арк Фридом (Немцова и др., 2020).

Для повышения коэффициента размножения побегов снимают

апикальное доминирование путем удаления верхушки побега с последующим микрочеренкованием и/или добавлением в среду экзогенных цитокининов, стимулирующих развитие пазушных почек. Тип используемого цитокинина и его концентрация во многом определяют эффективность размножения растения в условиях *in vitro*. Показано, что самые высокие коэффициенты мультипликации *in vitro* имеют виды, которые быстро поглощают и метаболизируют экзогенные цитокинины (Высоцкий, 1986; Деменко, 2007).

Наиболее часто для снятия апикального доминирования и развития боковых почек растений на этапе собственно микроразмножения в качестве вещества с цитокининовой активностью применяется 6-бензиламинопурин. Как следует из результатов многих авторов (Упадышев, Высоцкий, 1996; 2000; Упадышев, 1993; Расторгуев, 1996; Ковалева и др., 2000; Клоконос, 2001), этот регулятор роста хорошо подходит для размножения многих видов растений, в том числе представителей рода *Rubus*. Показана также эффективность применения Цитодефа (0,2 мг/л) и эпина (0,1 мг/л) при размножении ежевики сорта Эдриенн (Макаров, Кузнецова, 2017). При этом максимальное количество побегов ежевики (в среднем 8,1 шт.) образовывалось при использовании цитодефа в концентрации 0,2 мг/л.

Хорошие результаты по клональному микроразмножению ремонтантных сортов малины были получены при использовании низких концентраций цитокининов: 1,0 мкМ– 5,0 мкМ 6-БАП (Кульханова и др., 2012). При использовании в качестве цитокинина TDZ получены сходные коэффициенты размножения, однако, при этом отмечалось нежелательное каллусообразование у основания побега (Кульханова и др., 2012).

Для повышения активности роста микропобегов в питательные среды добавляют гибберелловую кислоту в концентрации 0,2-0,5 мг/л (Муратова и др., 2004; 2011).

Важнейший этап клонального микроразмножения - этап ризогенеза микрочеренков *in vitro* (Деменко и др., 2010), поскольку формирование качественной корневой системы и развитых побегов при культивировании

микрорастений во многом определяет успешность прохождения микрорастениями этапа адаптации и последующего роста (Трунов, Хорошкова, 2020). Как показывает практика, большие потери материала при переводе микрорастений в нестерильные условия могут быть связаны со слабым или аномальным развитием корневой системы и неразвитостью листового аппарата микрорастений.

Процесс адвентивного корнеобразования включает несколько этапов: индукцию, инициацию, образование корней (Кефели, 1966). Продолжительность первых двух этапов составляет 10–15 дней (Высоцкий, 1986). Затем начинается визуально заметное появление корней.

Установлена зависимость процесса ризогенеза от генотипа растения, типа и концентрации ауксина, минерального и углеводного состава среды, ее консистенции, веществ фенольной природы, светового и температурного режима культивирования, последствий условий этапа пролиферации, длины укореняемых побегов и других факторов (Harry, Thorpe, 1994; George, 2008; Деменко и др., 2010; Лебедев, Шестибратов, 2012).

На этапе укоренения обычно используют обедненные питательные среды. Для этого разбавляется минеральная основа основной среды размножения и снижается концентрация сахарозы до 1-2% (Калинин и др., 1980; Катаева, Бутенко, 1986; Nemeth, 1986; Moncousin, 1991). При укоренении многих культур часто используется половинная концентрация солей макроэлементов питательной среды по прописи Мурасиге-Скуга (Garland, Stoltz, 1981; Zimmerman, Broome, 1981; Gadidasu et al., 2011), кроме того используется и разбавленная в два или четыре раза минеральная основа основной среды размножения (Сковородников, 2003; Акимова, 2014; Skirvin, Chu, 1979; Sayd et al., 2010; Watt, 2014).

В качестве индукторов ризогенеза широко используются ауксины: β -индолилмасляная (ИМК), β -индолилуксусная (ИУК) и α -нафтилуксусная (НУК) кислоты, которые активизируют деятельность камбия, что приводит к заложению корневых меристем и формированию придаточных корней

(Турецкая, 1969; Фаустов и др., 1985). Обычно используют концентрации ауксинов в пределах 0,5-5,0 мг/л. Практикуют несколько основных методик укоренения и последующей адаптации растений.

Укоренение микрочеренков на питательной среде с ауксином и высадка укорененных микрорастений на адаптацию в теплицу.

При укоренении плодовых и ягодных культур в среды укоренения чаще всего добавляют ИМК в концентрации 0,5-2,0 мг/л (Pietropaolo, Reish, 1984; Neskovic, 1985; Корнацкий, 1991; 2017; Мохаммед, 1998, Фролова, 2003, Сквородников, 2003; Куклина и др., 2003; Хорошкова и др., 2020). Ежевику и малину черную укореняли на среде с 0,5 мг/л ИМК (Упадышев, Высоцкий, 1991). В литературе имеются сообщения об использовании ИМК и в более низкой концентрации. Так, микропобеги актинидии коломикта успешно укореняли на среде $\frac{1}{2}$ QL с 0,1 мг/л ИМК (Фирсов, 1996), малину красную на среде, содержащей $\frac{1}{5}$ нормы солей MS и 0,01 мг/л ИМК (Мохаммед, Бутенко, 1998).

Достаточно широко при укоренении ягодных культур применяется природный ауксин - β -индолилуксусная кислота. При укоренении ежевики в среды ризогенеза добавляли 0,5 и 1 мг/л ИУК (Упадышев, Высоцкий, 1991). При укоренении ремонтантной малины, оптимальная концентрация ИУК в среде составила 0,75 мг/л. При этом для ряда форм более эффективным оказалось применение ИМК в концентрации 0,5 мг/л (Нам и др., 1998).

НУК на этапе укоренения микрочеренков обычно используется в низких концентрациях, поскольку может вызывать формирование обильного каллуса, который затрудняет рост корней и изменяет их структуру (Катаева, Бутенко, 1983; Nemeth, 1986). Sharma и Padhya (1996) наблюдали индукцию ризогенеза у *Crataeva nurvala* через 7 дней на среде MS с низкой концентрацией НУК (0,5 мкМ). В исследованиях Zaki Mehbooba et al. (2011), проведенных на микрочеренках шелковицы *Morus nigra* L. показано, что применение НУК в концентрации 0,5 мг/л, было более эффективным, чем применение ИУК и ИМК. Хорошие результаты получены при использовании НУК в

концентрации 0,01 мг/л с добавлением 0,1 мг/л 6-БАП для укоренения сливы (Шелифост и др., 1993).

Фенолкарбоновые кислоты, добавленные в среду укоренения, могут оказывать положительное последствие на приживаемость растений в нестерильных условиях, особенно у культур рода *Rubus* (Упадышев, Гуськов, 1996; Упадышев, Петрова, 1998).

Добавление элиситеров - эмистима и экофуса (10-5) в среду укоренения приводило к ускорению ризогенеза на 14-16 дней у сортов ежевики Торнфри и Агавам (Карпова, 1999; 2000).

Ауксин в составе среды, при общей стимуляции ризогенеза, может ингибировать рост корней (Полевой, 1982; 1991). Поэтому используют и другие способы применения ауксинов, например, обрабатывая основания микрочеренков (время обработки составляет от нескольких часов до нескольких дней) препаратами с ауксиновой активностью с последующим помещением черенков на среды без регуляторов роста или же непосредственно в субстрат (Высоцкий, 1986; Starbuck, Preczewski, 1986; Туровская, 1989; Пронина, 1998). При предварительном 16-часовом выдерживании микропобегов малины сортов Барнаульская и Новость Кузьмина в растворе ИМК в концентрации 25 мг/л эффективность ризогенеза микрочеренков составила 75-92% (Оразбаева и др., 2012).

С целью экономии затрат материалов и ручного труда предпринимались попытки объединения этапов укоренения и адаптации растений (Zimmerman, Fordham, 1985; Cherubini et al., 1992).

Предварительная обработка микрочеренков ИУК (2 мг/л) и высадка их на мох сфагнум обеспечили высокую приживаемость и хорошее развитие надземной части малино-ежевичного гибрида Тайберри (Ковалева и др., 2000). Высокая приживаемость в условиях *ex vitro* на мхе сфагнум и агроперлите была получена и при укоренении микрочеренков ежевики (Гашенко, Кухарчик, 2022). Однако данная методика применима не для каждого вида растений.

Адаптация является ключевым этапом технологии размножения растений *in vitro*. Только отработка эффективных способов перевода микрорастений в нестерильные условия делает возможным промышленное микроразмножение садовых культур.

Длительное нахождение эксплантов в условиях *in vitro* вызывает у растений разнообразные анатомические и физиологические аномалии. Н.В. Катаева (1987) отмечает, что у пробирочных растений, выращенных почти при 100% влажности воздуха, устьица широко открыты. Высокая влажность и отсутствие солнечной радиации при культивировании *in vitro* приводят к уменьшению образования эпикутикулярный воска на листьях, количества проводящих жилок увеличению пористости паренхимы листа и уменьшению числа ее слоев (Smith, Kand Drew, 1990). Условия *in vitro* усиливают транспирацию и снижают фотосинтетическую способность растений (Sutter et al., 1984; Кутас, 1997). В течение первых 10-14 дней после пересадки устьица пробирочных растений не функционируют, и растения теряют воду (Drainerd, 1981). Частичная потеря способности хлоропластов стерильных растений к фотосинтезу связана с низкой концентрацией углерода в культуральных сосудах и высоким содержанием углевода в питательной среде. Показано, что в открытом грунте растения поглощают в 4-5 раз больше CO₂ чем пробирочные (Deng, Donnelly, 1993).

Эффективность адаптации зависит от многих факторов: температуры и влажности воздуха, типа субстрата, освещенности, степени развития листового аппарата и корневой системы и других (Высоцкий, 1998; Корнацкий, 1999; 2001; Батукаев и др., 2011; Sutter, Hutzell, 1984; Sutter et al., 2088; Preece, 2002).

Для перевода микрорастений в нестерильные условия используют адаптационные помещения, климатические камеры с регулируемыми параметрами влажности, температуры и освещения, или емкости с почвенным субстратом устанавливают под укрытие из полиэтиленовой пленки в теплицы.

Для стимуляции фотосинтеза пробирочных растений увеличивают интенсивность освещения и проницаемость культуральных сосудов для углекислого газа, открывая сосуды на несколько дней до посадки в нестерильные условия (Росок, 1984; Ван-Ункан, 2014). За две недели до пересадки на адаптацию рекомендуется выращивать микрорастения при освещенности 10000 лк (Bowden, 1985).

Кроме несовершенного водного обмена пробирочных растений есть и другие причины их гибели в нестерильных условиях.

Растения, полученные *in vitro*, нередко имеют корневую систему со слабо развитой проводящей системой, без корневых волосков (Filiti et al., 1987; Sutter et al., 1988; Высоцкий, 1998).

При адаптации микрорастений важная роль принадлежит почвенному субстрату. Наиболее часто используют субстраты, состоящие из следующих компонентов в различных соотношениях: перлит, торф, торф и песок (2:1), перлит и торф (1:1; 1:2; 1:3), сфагновый мох, сфагновый мох и вермикулит, торф, песок и хвойная земля (1:1:1), керамзит (Деменко, Лебедев, 2011; Плаксина, 2011; Эрст и др., 2012), цеолит (Батукаев, 2002), кроме того, использовалось сочетание торфа и осадков городских сточных вод (ОГСВ) (Аладина и др., 2009), последовательно в два этапа – стерильный кварцевый песок, затем смесь песок : торф : дерновая земля (1:2:1) (Набиева, 2011), смесь торф : дерновая земля : вермикулит в соотношении 1:3:3 и смесь дерновая земля и вермикулита (1:1) (Шакина, 2020). Ионообменные субстраты БИОНА успешно применяли при выращивании косточковых культур (Дженеев и др., 1990) и герберы (Вайновская и др., 2010).

Имеет значение и фитосанитарное состояние субстрата. Субстраты, составленные на основе органических компонентов, могут содержать патогенную микрофлору и нуждаться в обеззараживании (Гиголашвили, 1998; Батукаев, 1999; Росок, 1984). Однако некоторые авторы говорят о несущественной разнице между использованием стерильного и нестерильного субстрата (Высоцкий, 1998; Паскеев, 2001).

На этапе адаптации положительный эффект дают корневые и внекорневые обработки микрорастений, например, минеральной основой среды МС (Тарашвили, Высоцкий, 1983), раствором кальциевой (Orlikowska, 1988) или аммиачной селитры (Бьядовский, 2007), микробиологическими препаратами (Хорошкова, Муратова, 2019; Трунов, Хорошкова, 2020).

На рост и развитие микрорастений в процессе адаптации большое влияние оказывают условия освещенности в теплице и спектральный состав света (Donnelly, Vidaver, 1984; Бьядовский, 2007). Активному росту растений ежевики на этапе адаптации способствовал красный свет с длиной волны 611-660 нм (Pierik et al., 1992).

На сегодняшний день в практике отечественного и зарубежного садоводства накоплен большой опыт культивирования *in vitro* ягодных культур, в том числе и рода *Rubus*. Определённые успехи по клональному размножению достигнуты в отношении таких представителей рода *Rubus*, как малина красная (Расторгуев, 1996; Verstesy, 1979; Оразбаева и др., 2012; Плаксина и др., 2017; Плаксина, Гусев, 2021), ежевика (Упадышев, 1991; Муратова, Янковская, 2004; Упадышев, 1996; Джигадло Е.Н., Джигадло М.И., 2005; Соловых, 2009; Макаров, 2019), малино-ежевичные гибриды (Упадышев, 1996), малина чёрная (Упадышев, Высоцкий, 1991; Соловых, 2013, 2014), ремонтантная малина (Казаков и др., 1998; Вовк, 2000; Сковородников, 2003; Кульханова и др., 2012; Малаева, Молканова, 2017; Корнацкий и др., 2017). Однако далеко не все формы рода *Rubus* (в частности, ежемалиновые гибриды, ряд сортов малины красной) эффективно размножаются *in vitro*. Многочисленные исследования, проведенные на представителях разных родов, показывают, что методики клонального микроразмножения требуют уточнения для каждого генотипа, не только вида, но и сорта.

1.2 Влияние спектрального состава света на рост и развитие растений *in vitro*

Анализ научной литературы показывает, что свет разного спектрального состава регулирует рост и развитие, а также фотосинтетические процессы и продуктивность растений (Воскресенская, 1975; Корначук, Головацкая, 1998; Константинова и др., 1998; Карначук, Гвоздева, 1998; Белоус и др., 2012; Маркова, Сомова, 2016; 2017; Muratova et al., 2018; Евлаков и др., 2020; Nhut et al., 2000; Lian et al., 2002; Edesi et al., 2014; Hung et al., 2015; Al-Mayahi, 2016; Gupta, Agarwal, 2017). Адаптация к световому режиму затрагивает различные уровни организации автотрофного организма, конечным результатом которой может быть оптимизация всей деятельности растений (Карначук и др., 1987). Морфогенез растений и связанные с ним аспекты в основном регулируются различными фоторецепторами, которые активируются фотонами в синей, красной и дальней красной областях светового спектра.

Для растений наиболее важна фотосинтетически активная, находящаяся в пределах от 380 до 710 нм, и физиологически активная радиация (300-800 нм), при этом наиболее значимы красные лучи (600 до 720 нм) (Карначук, Гвоздева, 1998; Белоус и др., 2012).

Красный спектр способствует выработке хлорофилла а, влияет на развитие корневой системы, вытягивание растений, цветение, созревание плодов.

Синяя часть спектра может влиять на морфологию растения: размер и форму куста/листьев, длину стебля. Синий спектр способствует синтезу белка, способствует выработке хлорофилла b, делению и функционированию хлоропластов, сдерживает рост стебля. Влияет на увеличение зеленой массы, утолщение стеблей, закладку новых побегов (Белоус и др., 2012).

Система освещения для культуры *in vitro* должна обеспечивать освещение в спектральной области которая участвует в фотосинтезе и в

фотоморфогенных ответах растений (Seabrook, 2005). Использование источников света, излучающих фотоны в широком спектральном диапазоне в целом отвечает этим двум требованиям к освещению.

Среди возможных вариантов источников освещения в фитотронах широко используются люминесцентные лампы (Economou, Read 1987). Значительная часть спектрального излучения, излучаемого GDI лампами, не используется культурами растений (Gupta, Jatothu, 2013). М. Касахара с коллегами установил (Kasahara et al., 2004), что избыточное световое излучение вызывает фотоингибирование и фотоокислительное повреждение растений, т. е. GDI не могут быть оптимальным выбором для освещения культур *in vitro*.

Газоразрядные лампы излучают белый свет в диапазоне излучения от 400 до 700 нм при фиксированной интенсивности (Kozai, Smith, 1995). Такой широкий диапазон длин волн объективно не нужен растениям и фактически обладает низким качеством для стимулирования роста растений, а сама система освещения потребляет много электрической энергии с выработкой большого количества тепла в фитотроне. Поскольку эти лампы излучают тепло, культуры не могут быть размещены близко к источнику света, поскольку они могут быть повреждены или испытывать фотостресс.

Набирают популярность светодиодные (LED) источники света, которые потребляют в 2-3 раза меньше электроэнергии. Комбинация светодиодов различных цветов в одном светильнике с возможностью независимого управления позволяет сформировать фактически любой спектр для конкретной культуры и фазы ее развития.

Д. Гупта и А. Агарвал (Gupta, Agarwal, 2017) считают, что успех размножения растений *in vitro* во многом зависит от спектрального качества и фотонной эффективности искусственных источников света. По их мнению, светодиоды являются идеальным источником, который может обеспечить только необходимые спектральные характеристики для стимуляции органогенных, а также эмбриогенных реакций.

Влияние светодиодного освещения на органогенез и соматический эмбриогенез *in vitro* изучали на разных видах растений. Большинство исследований было сосредоточено на оценке влияния монохроматических и смешанных синего (440-480 нм) и красного (630-665 нм) светодиодного освещения. Кроме этого некоторые исследования были посвящены влиянию белого, дальнего красного, зеленого, желтого и оранжевого светодиодов (Gupta, Agarwal, 2017).

Результаты значительного количества исследований показали стимулирующую роль различных комбинаций красных и синих светодиодов при регенерации побегов и последующем росте регенерированных растений (Nhut et al., 2000; Lian et al., 2002; Edesi et al., 2014; Hung et al., 2015; Al-Mayahi, 2016). Было показано, что биологический ответ зависит от вида растения и типа культивируемого экспланта.

Проведены работы, которые показывают стимулирующий эффект обработки монохроматическими красными или синими светодиодами на органогенез побегов (Jao et al. 2005; Poudel et al. 2008; Wu, Lin 2012). Обработка монохроматическим синими светодиодами способствовала индукции и размножению побегов *Anthurium* (Budiarto 2010) и *Dendrobium* (Lin et al., 2011). Более высокая эффективность регенерация побегов отмечена у *A. distichum* при обработке как синими, так и красными светодиодами (Lee et al., 2014). Применение светодиодов дальнего красного света привело к улучшению роста листьев побегов *Oncidium* (Chung et al., 2010) и каштана (Park, Kim 2010). Определено, что высокий процент красного света ускоряет рост побегов-регенерантов у винограда (Neo et al. 2006; Poudel et al. 2008).

Проведены исследования влияния различных качеств светодиодных источников света на рост и накопление углеводов у виноградного подвоя «Teleki 5BV», культивируемого *in vitro* (Neo et al. 2006). Масса побегов и скорость фотосинтеза увеличивались, когда растения подвергались флуоресцентному освещению (контроль), красному свету или сочетанию синего и красного. Удлинение побегов значительно стимулировалось красным

светом, тогда как комбинация синего и красного света давала самые короткие побеги. Тем не менее, количество междоузлий было одинаковым при обоих способах освещения. При монохромном синем или красном свете содержание сахара и накопление крахмала увеличивалось, в сравнении с использованием со смешанным освещением. На замедление роста побегов под действием синего света указывали и другие авторы. Подобный эффект наблюдали при укоренении микрочеренков жимолости синей (Несмелова и др., 2015).

В исследованиях, проведенных на лилии кавказской, показано, что синий свет замедлял рост листовых пластин, в то время как красная область спектра способствовала более интенсивному увеличению площади листьев по сравнению с белой (в 1,4 раза) (Протасова, 1982).

В последнее время в отечественной научной литературе появилось также достаточно много информации об успешной стимуляции роста и развития разных видов растений в условиях *in vitro*, при использовании светодиодных ламп и установок освещения на основе светодиодов (Панькова, Несмелова, 2008; Маляровская, 2013; Соловых и др., 2014; Несмелова и др., 2015; Маркова, Сомова, 2016; 2017; Muratova et al., 2018; Евлаков и др., 2020).

Применение светодиодных обличительных установок с источниками света различного спектрального состава, способствовало значительному увеличению укореняемости микропобегов и улучшению качества корневой системы микрорастений.

Совместное применение регулятора роста НВ-101 и светодиодных установок с соотношением в спектре красного, синего и белого света 2:1:1 и 1:1:1 сократило этап ризогенеза и обеспечило 100%-е укоренение земляники *in vitro* (Маркова, Сомова, 2017). При изучении влияния светодиодного освещения с содержанием 80% красного и 20% синего света на рост растений-регенератов трех сортов *F. × ananassa* Duch. в процессе их укоренения в условиях *in vitro* отмечено увеличение частоты ризогенеза, длины корней, массы корней, высоты розеток и площади листовых пластинок под

воздействием освещения светодиодными источниками света в сравнении с люминесцентным освещением (Амброс и др., 2017).

Ранее Ханг с соавторами (Hung et al., 2015) показали эффективность применения светодиодных источников для земляники в условиях *in vitro* и *ex vitro* по сравнению с люминесцентным освещением. Установлено, что для индукции морфогенеза растений в условиях *in vitro* оптимальным было соотношение 90% красного и 10% синего света. Использование источников с 70% красного и 30% света положительно влияло на рост как *in vitro*, так и *ex vitro*. Применение светодиодных источников освещения повышало жизнеспособность эксплантов, значительно ускоряло их развитие, положительно влияло на ростовые параметры растений-регенерантов, увеличивало содержание хлорофилла у растений.

В работе других авторов установлено положительное влияние синего спектра света на процесс ризогенеза земляники садовой сорта Мерлан как в условиях *in vitro*, так и *ex vitro*. Увеличение доли красного света в свою очередь положительно влияло на накопление биомассы надземной части растений-регенерантов (Мороз и др., 2019). Полученные результаты согласуются с исследованием D. T. Nhut с соавторами (Nhut et al., 2000), проведенном на землянике, в котором под воздействием 70% красного и 30% синего света с интенсивностью освещения $60 \text{ мкмоль} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ отмечено увеличение ростовых параметров регенерантов при выращивании в культуральных системах, обогащенных CO_2 .

Спектральный состав может оказывать сильное воздействие на оптические свойства листьев, изменяя их поглощательную способность, а также на размеры и толщину листовой пластинки (Тихомиров и др., 1991). Кроме того, он оказывает существенное действие на структуру фотосинтетического аппарата и его функционирование, а также влияет на метаболизм в клетке, газообмен при фотосинтезе (Воскресенская, 1975; Карначук, Головацкая, 1998). Фотосинтетическая способность клеток и тканей растений, выращенных *in vitro*, играет жизненно важную роль в обеспечении

их выживания вне инкубационной среды. С. Дутта Гупта и А. Агарвал (Gupta, Agarwal, 2017) в своей работе показали, что использование светодиодов в качестве источника света во время развития микропобегов *in vitro* и последующих этапов акклиматизации увеличивает выживаемость растений по сравнению с люминесцентными лампами.

Как следует из анализа проведенных исследований применение светодиодов в биотехнологии на сегодняшний день находится на этапе своего становления и имеет большое практическое значение.

1.3 Биологическое действие низкоинтенсивного лазерного излучения на растения в условиях *in vivo* и *in vitro*

Среди фотобиологических процессов наблюдают феномен значительного повышении функциональной активности живых организмов под воздействием света с высокой статистической упорядоченностью (когерентностью) (Будаговский, 2008). Наиболее распространёнными и технологичными источниками высококогерентного излучения являются лазеры.

Лазер – это устройство, преобразующее световую, электрическую, тепловую и химическую энергию в энергию когерентного, монохроматического, поляризованного и узконаправленного потока электромагнитного излучения. Большинство работ по изучению влияния низкоинтенсивного когерентного излучения (НКИ) лазера на растительные объекты посвящено практическому применению лазерного облучения для стимуляции процессов роста и развития, увеличения всхожести и энергии прорастания семян и, в конечном итоге, для увеличения урожайности культурных растений (Букатый, Карманчиков, 1999). Накопленные данные убеждают в практической значимости этих исследований.

Метод воздействия лазером (метод лазерной фотоактивации) при клональном микроразмножении концентрирует в себе достаточное количество преимуществ:

1) возможность повышения эффективности размножения и укоренения микропобегов на 10-30% (в зависимости от сорта, вида культур, кратности обработки) за счет активизации пролиферации и усиления ростовых процессов;

2) повышение устойчивости растений к поражению различными заболеваниями;

3) безвредность обработки при клональном размножении;

4) безопасность обслуживающего персонала и наименьший вред окружающей среде.

Проведенные разными авторами исследования убедительно показывают, что НКИ является эффективным фоторегуляторным фактором, способным повышать функциональную активность растений. Лазерное облучение тканей *in vitro* способствует активации метаболизма, процессов каллусогенеза и морфогенеза, увеличению регенерационной активности меристем и улучшению ризогенеза растений (Smoljar, 1996; Саляев и др., 2001; Будаговский, Муратова, 2007; Евсеева, 2008, Будаговский и др., 2012; Муратова и др., 2012, 2016; 2017; 2019; Соловых и др., 2012, 2014; Хорошкова и др., 2018). Применение генерируемого лазерами низкоинтенсивного когерентного излучения может существенно повысить эффективность использования экзогенных регуляторов роста, тем самым повышая экономический эффект применения культуры тканей растений при минимальных дополнительных затратах (Будаговский, 2008).

Лазерная обработка существенно повысила метаболическую активность клеток мака (Абдвахитова, 1990). Облучение азотным (337,1 нм; 3 мВт) и гелий-неоновым (632,8 нм; 2 мВт) лазерами использовали для повышения темпа роста каллусной массы лавандина (Капелев, 1989). Облучение микрочеренков в течение 15 минут с помощью гелий-неонового

лазера (632,5 нм) мощностью 15 мВт существенно повлияло на ризогенез сливы (Smoljar, 1996). Комбинированное действие СВЧ и когерентного лазерного излучений в 2,5 раза повысило регенерационную способность эксплантов винограда (Дорошенко, 1997).

По имеющимся в литературе данным, результатом лазерного облучения растительных тканей может быть, как стимуляция различных процессов, так и отсутствие ответа на воздействие, а в некоторых случаях, и ингибирование изучаемого процесса (Smoljar, 1996; Саляев и др., 2001; Дударева, 2004; Будаговский, Муратова, 2007; Евсеева, 2008, Будаговский и др., 2012; Муратова и др., 2012, 2016; 2017; 2019; Соловых и др., 2012, 2014). Несомненная перспективность практического использования НКИ для облучения растительных объектов в условиях культуры *in vitro* определяют необходимость расширения исследований по данной тематике.

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Место и условия проведения исследований

Работа выполнена в учебно-исследовательской лаборатории биотехнологии (рис. 1, рис. 2) и отапливаемых теплицах научно-исследовательского тепличного комплекса ФГБОУ ВО Мичуринского ГАУ (рис. 3).



Рисунок 1 - Комната для приготовления питательных сред



Рисунок 2 - Операционная учебно-исследовательской лаборатория биотехнологии



Рисунок 3 - Теплица учебно – исследовательского тепличного комплекса Мичуринского ГАУ.

Лаборатория имеет соответствующим образом оборудованные помещения для проведения работ по культуре растительных тканей *in vitro*:

- моечную, оборудованную дистиллятором и сушильным шкафом;
- комнату для приготовления и хранения питательных сред, маточных растворов, оборудованную техническими и аналитическими весами, дистиллятором, магнитной мешалкой, холодильниками;
- автоклавную с сухожарочными шкафами и автоматическими автоклавами;
- операционной комнату, оборудованной ламинар-боксами;
- культуральную комнату, оборудованную кондиционером и 3-х ярусными стеллажами с люминесцентными лампами белого света (Osram L36W/765 Cool Daylight).

2.2 Биологические объекты исследования

В качестве растительного материала выбраны: сорта ежевики Блэк Сэтин (Black Satin), Навахо (Navaho), Трипл Краун (Tripl Croun), Логан Торнлесс (Logan Thornless), Дирксен Торнлесс (Dirksen Thornles), ежемалиновые гибриды: Тайберри (Tayberry), Букингем Тайберри (Buckingham Tayberry), Бойзенберри (Boysenberry), Логанберри (Loganberry), малина обыкновенная ремонтантные сорта: Оранжевое чудо, Геракл, Бриллиантовая из коллекции *in vitro* учебно-исследовательской лаборатории биотехнологии ФГБОУ ВО Мичуринского ГАУ.

Краткое описание сортов приведено ниже.

Ежевика:

Блэк Сэтин (Black Satin). Сорт создан в 1974 г. Северо-Восточным зональным научно-исследовательским центром, штат Мериленд, США. Авторство принадлежит Д. Скотту. Родительскими формами послужили сорта Дарроу и Торнфри. Среднеспелый, бесшипный, урожайный сорт. Куст мощный с длинными, жёсткими побегами, требует садовой опоры. Ягоды

крупные, продолговатоокруглой формы, весом в среднем 3-4, на концах побегов до 7-8 г, чёрного цвета, блестящие, сочные, собраны в роскошные многоягодные кисти (рис. 4) (<https://fermilon.ru/sad-i-ogorod/kustarniki/ezhevika-blek-satin.html>). Вкус ягод кисло-сладкий с лёгким приятным ароматом. Срок созревания — с середины августа до середины сентября. Урожайность высокая до 25 кг с куста.

Ежевика Блэк Сатин устойчива ко многим заболеваниям и вредителям, не требует никакого особенного ухода в летний период. Посадку ежевики можно производить ранней весной или осенью. Срок созревания ягод август-сентябрь.

Трипл Краун – Тройная корона (Tripl Crown).

Трипл Краун с английского языка переводится как «тройная корона». Селекция проводилась совместными усилиями американских ученых из штатов Мэриленд и Орегон. Для создания нового гибрида задействовали сорта Блэк Мэджик и Коламбия Стар. Работы были завершены к 1996 году, но последующие 8 лет полученный сорт проходил испытания в том же штате Орегон.

Кустистая ежевика Трипл Краун формирует мощный куст с побегами полустелющегося типа. Побегообразовательная способность хорошая. Уже в первый год после посадки плети вырастают до 2 м, позже без прищипки они достигают 3 м. Шипы отсутствуют по всей длине побега. Корневая система мощная. Цветы и ягоды формируются на приросте прошлого года. Ягоды крупные, отличного десертного вкуса, средним весом 7-9 г, собраны в кисти. Форма у них может быть округлой, слегка вытянутой или овальной, цвет – черный, с характерным глянцевым блеском (рис. 5) (<https://fermilon.ru/sad-i-ogorod/kustarniki/ezhevika-tripl-kraun-triple-crown.html>).

Сорт не является зимостойким. В средней полосе России побеги нуждаются в укрытии на зиму. Для этого их снимают со шпалер и укладывают на землю, защищая от морозов укрывным материалом. Устойчив к жаре и

засухе, неприхотлив к типу почвы и обладает хорошим иммунитетом к болезням.

Срок созревания – среднепоздний. В отечественных широтах первый урожай готов к сбору в середине августа. Созревание плодов продолжается до первых октябрьских холодов.



Рисунок 4 - Плоды ежевики
Блэк Сатин



Рисунок 5 - Плоды ежевики Трипл Краун

Навахо (Navaho). Сорт ежевики Навахо – перспективная селекционная разработка знаменитого Арканзасского университета. Выведен путем успешного скрещивания сортов ежевики Чероки и Торнфри, назван в честь коренной народности Америки.

Кустарники этого сорта формируют прямостоячие, достаточно мощные побеги высотой до 2 м. Стебли гладкие, без шипов и колючек, требуют особого подхода в обрезке.

Костянки среднего размера, достигают массы 4–7 г, при этом сорт очень урожайный благодаря рекордному количеству ягод на кусте (на одном побеге может созревать до 400 ягод). В промышленном выращивании продуктивность сорта составляет более 9 тонн/1 гектар.

Полного созревания ягоды достигают в августе – начале сентября. Ягоды короткие, конической формы, темно-синего, а при полной зрелости черного окраса (рис. 6) (<https://fermilon.ru/sad-i-ogorod/kustarniki/ezhevika->

navaho.html). Поверхность ягод глянцевая, мякоть плотная и упругая. Спелые ягоды обладают очень мягким, изысканным десертным вкусом с ежевичным ароматом. Отличаются выраженными товарными качествами – костянки имеют одинаковый размер и форму, долго и хорошо хранятся, легко переносят транспортировку.

Сорт достаточно устойчив к болезням и низким температурам – растения успешно зимуют при температуре -20°C .



Рисунок 6 - Плодоношение ежевики Навахо

Дирксен Торнлесс (Dirksen Thornless)

Данный сорт ежевики был выведен в 70-х годах XX века доктором Скоттом в г. Beltsville, штат Мериленд. Он появился при скрещивании таких сортов, как Merton Thornless, Eldorado, Darrow и Thornfree.

Бесшипный полустоячий сорт. Кусты крупные, раскидистые, довольно сильные, длина побегов достигает 5 м, побеги замещения многочисленны. Дирксен Торнлесс начинает цвести в конце мая или начале июня. Первые ягоды поспевают в конце июля, плодоношение длится до конца сентября. Ягоды крупные, сочные, массой 5-7 г, красного цвета, приобретают черный цвет только при полном созревании. (рис. 7) (<https://myblackberryplants.com/ru/varieties/dirksen-thornless>). Вкус кисло-сладкий. С одного куста можно получить от 8 до 20 килограммов ягод.

Отличается устойчивостью к болезням и вредителям, а также хорошей транспортабельностью ягод. Зимостойкость до минус 25⁰С.

Логан Торнлесс (Logan Thornless)

Куст стелющийся, мощный. Побеги бесшипные, граненные. Ягода средняя по величине, 3-3,5 г, тупоконической формы. Мякоть сочная, приятная, освежающая. Вкус сладкий, при полном вызревании сладкий с тонким приятным ароматом. Ягода хорошо переносит перевозку. Ягодная кисть разветвленная, повислая (рис. 8) (<https://саженцы13.рф/product/ezhevika-tornless-logan/>). В кисти обычно от 25 до 60 ягод. Урожайность с куста более 10 кг. Сроки созревания: середина августа — середина сентября.

Сильноплодоносящие кусты без укрытия часто подмерзают, но куст хорошо восстанавливается. Желательно укрывать на зиму.



Рисунок 7 - Плодоношение ежевики Дирксен Торнлесс



Рисунок 8 - Плодоношение ежевики Логан Торнлесс

Ежемалиновые гибриды:

Логанберри. Сорт Логанберри получен в 1889-м году путем перекрестного опыления ежевики «Аугинбауг» и малина «Рэд Антверп» американским селекционером и юристом Д.Х. Логаном, поэтому его иногда называют Логанова ягода. Образует раскидистые кусты с дугообразными стелющимися побегами. В средней полосе зацветает в середине июня и цветет 1-1,5 месяца. В период цветения и плодоношения кусты декоративны. Плоды крупные, массой 5-10 г, удлинено-конические, красно-пурпуровые (рис. 9)

(<https://fermilon.ru/sad-i-ogorod/kustarniki/ezhemalina-loganberri-loganberry-opisanie-sorta-osobennosti-vyraschivaniya-obrezka.html>). Мякоть – сочная, кисло-сладкая со своеобразным ароматом. Ягоды созревают постепенно – с середины августа и до заморозков. Урожайность умеренная, зимостойкость средняя. Корневой поросли не образует.

Бойзенберри – ежемалиновый гибрид, выведенный в 30-е гг. XX века, калифорнийцем Р. Бойзенем. Куст стелящейся формы, с бесшипными 5-6-метровыми побегами. Плоды вытянутой конической формы, крупные, весом 9-12 гр. Созревают в кистях по 5-6 штук. Кожица спелых ягод темно-фиолетового, практически черного, цвета с рубиновым отсветом (рис. 10) (<https://fermilon.ru/sad-i-ogorod/kustarniki/ezhemalina-boysenberri-bojsenberri-opisanie-sorta-posadka-i-uhod-video.html>). Мякоть – сочная с выраженным малиновым ароматом.

Сорт характеризуется растянутым плодоношением, ягоды начинают созревать с конца июня. Мало восприимчив к вредителям и заболеваниям. У гибрида средний уровень морозостойчивости, способен выдерживать понижение температуры до -18°C .



Рисунок 9 - Плоды ежемалинового гибрида Логанберри

Рисунок 10 - Плоды ежемалинового гибрида Бойзенберри

Тайберри. Получен в Великобритании в 1981-м году селекционером Дженнингсом в шотландском научно-исследовательском институте

садоводства путем опыления ежевики «Аврора» пыльцой малины «Моллинг Джуел». Сорт популярен в Европе и Северной Америке. Имеет сильношиповатые стелющиеся побеги. Ягоды конусообразно-вытянутой формы достигают в длину 5 см и веса 5-10 г. Созревают в августе, в кистях по 4-6 ягод. с куста можно собрать до 5 кг ягод. Плоды сначала красноватые, при созревании почти черные (рис. 11) (<https://vashnil.ru/o-nas/blog/ezemalina/ezemalina-tajberri>). Мякоть – сочная, кисло-сладкая с карамельным ароматом. Плодоношение в основном на коротких боковых веточках.

Сорт урожайный, достаточно засухоустойчивый, но с низкой зимостойкостью.

Букингем Тэйберри - ближайший родственник ежемалины Тэйберри, отличающийся полным отсутствием шипов на побегах, меньшей энергией роста и более поздними сроками созревания. Автор сорта учёный Дерек Дженнингс. Побеги стелющиеся, гладкие, длиной 2,5-4 м гибкие, без шипов, требуют подвязки. Плоды конической продолговатой формы, очень крупные – длина 4-5 см, вес 7-15 гр. Кожица спелой ежемалины – бордового цвета с типичным для ежевики блеском. Мякоть – сочная, кисло-сладкая, с выраженным малиново-карамельным ароматом. Плоды созревают в кистях по 6-8 ягод (рис. 12) (<https://vashnil.ru/o-nas/blog/ezemalina/ezemalina-bukingem-tajberi-buckingham-tayberry>).



Рисунок 11 - Плодоношение ежемалинового гибрида Тайберри



Рисунок 12 - Плодоношение ежемалинового гибрида Букингем Тайберри

Малина:

Бриллиантовая. Ремонтантный сорт. Авторы – И.В. Казаков, С.Н. Евдокименко, В.Л. Кулагина и И.Я. Нам. Куст среднерослый – до 1,5 м высотой, раскидистый, образует по 5 – 6 побегов замещения и 1 – 3 корневых отпрыска. Однолетние побеги средней толщины и пониклости, слабошиповатые с сильным восковым налетом.

Плодоношение обильное, зона плодоношения занимает более половины длины побега. Ягоды крупные (средняя масса 4,0 – 4,5 г, максимальная – 7,2 г), конической формы, рубиновой окраски, блестящие (рис. 13), хорошо отделяются от плодоложа, транспортабельные (<https://timacad.com/0513brilliant.html>). Вкус кисло-сладкий, десертный, мякоть сочная. Продуктивность высокая – до 2,5-3,0 кг ягод с куста или до 16 т/га. Плодоношение растянутое, с первой половины августа.

Возделывается с ежегодным удалением надземной части после плодоношения.

Геракл. Крупноплодный ремонтантный сорт с пряморослыми побегами, не требующими опоры. Получен от скрещивания сорта Оттом близ и межвидового отборного сеянца 14-205-4 как новый сорт зарегистрирован в 1996 г. Авторы – И.В. Казаков и С.Н. Евдокименко.

Куст среднерослый, слабораскидистый, побегообразовательная способность низкая (3 – 4 побега замещения). Побеги прочные, пряморослые, средней толщины, с восковым налётом и тонкими жесткими шипами. Зона плодоношения занимает половину их длины.

Ягоды плотные, транспортабельные, очень крупные (средняя масса 5 – 6 г, максимальная – 10 г), усеченно-конической формы, насыщенного рубинового цвета (рис. 14) (<https://vstisp.org/vstisp/images/stories/Yagody/gerakl.htm>). Вкус ягод кисло-сладкий. Начинают созревать в первой декаде августа, плодоношение растянутое. Продуктивность 2,0-2,5 кг с куста или 10 – 12 т/га.

Устойчив к грибным болезням и малинному клещу.



Рисунок 13 - Плоды малины ремонтантной, сорт Бриллиантовая



Рисунок 14 - Плоды малины ремонтантной, сорт Геракл

Оранжевое чудо. Крупноплодный ремонтантный желтоплодный сорт (ВСТИСП, И.В. Казаков). Куст среднерослый (1,5 – 1,7 м), побегообразовательная способность умеренная (5 – 7 побегов замещения), порослеобразование хорошее. Ягоды крупные, массой 5,0 – 7,0 г (максимальная – 9,0 г), удлинённо-тупоконической формы, насыщенно-оранжевого цвета с блеском (рис. 15) (<https://vstisp.org/vstisp/index.php/2013-07-24-07-03-02/manufacture/11-icetheme/sample-news/1457-oranzhevoe-chudo>). Ягоды десертного кисло-сладкого вкуса с тонким «малинным» ароматом. Начало созревания ягод – середина августа, плодоношение продолжительное. Урожайность 2,0 – 2,5 кг с куста (11 – 18 т/га).

Сорт устойчив к основным грибным болезням и вредителям.



Рисунок 15 - Плоды малины ремонтантной, сорт Оранжевое чудо

2.3 Методика проведения исследований

2.3.1 Культивирование ягодных культур *in vitro*

Исследования по культивированию *in vitro* изолированных тканей и органов ягодных культур проводили согласно общепринятым рекомендациям (Калинин и др., 1992; Катаева, Бутенко, 1986; Бутенко, 1999; Першина, 2000).

Для культивирования растений *in vitro* использовали минеральную основу питательных сред MS (Murashige, Skoog, 1962), QL (Quorin, Leroivre, 1977) и DKW (Driver, Kuniyuki, 1984) с добавлением 30 г/л сахарозы или 20 г/л глюкозы, 100 мг/л мезоинозитола, 8 г/л агара (питательные среды MS и QL) или 11 г/л агара (среда DKW), комплекса витаминов по Мурасиге-Скугу (Murashige, Skoog, 1962). Среда модифицировали по источнику кальция и содержанию хелата железа. рН питательной среды устанавливали в пределах 5,7-5,8 с помощью децинормального раствора NaOH.

Среды стерилизовали автоклавированием (1 атм., 20 мин.). Регуляторы роста и витамины стерилизовали ультрафильтрацией через фильтры Millipore (диаметр пор 0,22 μm) и добавляли в среды после автоклавирования.

На этапе микроразмножения применяли регуляторы роста растений: 6-бензиламинопуридин (6-БАП) – 0,5-2,0 мг/л, гибберелловую кислоту (ГК) - 0,25-0,5 мг/л, β -индолил-3-масляную кислоту (ИМК) или β -индолилуксусную кислоту (ИУК) - 0,1-0,2 мг/л.

На среды ризогенеза высаживали побеги, достигшие на среде размножения длины 1,5-2,0 см. Для культивирования микрочеренков на этапе укоренения использовали минеральную основу питательных сред MS (Murashige, Skoog, 1962) и QL (Quorin, Leroivre, 1977) со сниженной в 2 раза концентрацией макросолей с добавлением 20 г/л сахарозы, 50 мг/л мезоинозитола, комплекса витаминов по Мурасиге-Скугу, 8 г/л агара. В среду добавляли β -индолилмасляную кислоту (ИМК), β -индолилуксусную кислоту (ИУК) или α -нафтилуксусную кислоту (НУК) в концентрации 0,125-1,0 мг/л.

Субкультивирование побегов осуществляли в широкогорлых конических колбах емкостью 250 мл с 80 мл среды или банках емкостью 400 мл со 100 мл среды. Колбы закрывали тонкой алюминиевой фольгой и герметизировали липкой лентой.

Растений выращивали в культуральной комнате (рис. 16) при 16-часовом световом дне с освещенностью 2200-2400 люкс (люминесцентные лампы Osram L36W Cool Daylight), температуре воздуха $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ и влажности воздуха 40-50%.



Рисунок 16 - Фитостеллажи с люминесцентными лампами

2.3.2 Оценка влияние спектрального состава света на морфогенез растений *in vitro*

Опытные растения были размещены на фитостеллажах со встроенными светодиодными фитосветильниками с регулируемым на каждой полке в отдельности спектром и интенсивностью излучения разработки и производства ООО «Интеграл» (г. Старый Оскол) и производства ООО «ЭЛСИС БелГУ».

Стеллаж производства ООО «Интеграл» оснащен светодиодными фитолампами с длинами волн от 445 до 660 нм, при уровне освещенности на полках 2600-3000 лк.

В качестве опытных вариантов выбраны следующие четыре режима работы светодиодных модулей FitoLED (в процентах от максимального уровня):

вариант 1: синий – 50%, красный – 50%, белый 25%

вариант 2: синий – 50%, красный – 50%;

вариант 3: синий – 76%, красный – 24%;

вариант 4: синий – 50%, красный – 50%, белый 50%.

В качестве контроля были использованы два типа ламп:

- основной контроль (K1) – люминесцентные лампы OSRAM L36W/765 Cool Daylight с холодным оттенком белого света (6 шт.);

- второй, дополнительный контроль (K2) – сочетание на одной полке стеллажа люминесцентных ламп OSRAM L36W/765 Cool Daylight холодного оттенка белого дневного света (5 шт.) и люминесцентной лампы PHILIPSMASSTERTL-DFood 36W/79 SLV/25 красного света (1 шт.).

Стеллаж производства ООО «ЭЛСИС БелГУ» оснащен фитолампами с длинами волн от 365 до 750 нм (рис. 17). В качестве опытных вариантов выбраны следующие четыре режима работы светодиодных модулей X-bright FitoLED (в процентах от максимального уровня):

вариант 1: синий – 50%, красный – 25%, белый 25%;

вариант 2: синий – 50%, красный – 50%; белый 5%;

вариант 3: синий – 50%, красный – 0%; белый 45 %;

вариант 4: синий – 0%, красный – 25%, белый 40%.

В пятом варианте опыта использовали специализированные светодиодные фитолампы Feron AL7000. (3 шт) и белые светодиодные (LED) лампы общего назначения FERON LB-213 18W (3 шт.)

В качестве контроля были использованы люминесцентные лампы (6 шт.) OSRAM L36W/765 Cool Daylight с холодным оттенком белого света (контроль

1) и белые светодиодные (LED) лампы общего назначения (5 шт.) FERON LB-213 18W (контроль 2). Во всех режимах уровень освещенности растений составлял 2800-3000 люкс.

Экспериментальную оценку спектральных кривых проводили с помощью спектрометра UPRtek MK350 NPremium. Контроль уровня освещенности осуществляли цифровым люксметром СЕМДТ-1309.



Рисунок 17 - Фитостеллаж со светодиодными модулями освещения X-bright FitoLED с возможностью регулирования спектрального состава и интенсивности излучения

Культивирование растений осуществляли в культуральной комнате при 16-часовом световом дне и температуре воздуха $24 \pm 20^{\circ}\text{C}$. Контрольные и опытные растения находились в одних условиях культивирования, но были оптически изолированы друг от друга.

Учет результатов производили с периодичностью 1 раз в 7 дней. Учитывали число эксплантов с размножением, число и длину побегов, число укоренившихся побегов, число и длину корней на укорененный микрочеренок, длину укоренившихся побегов. В каждом варианте опыта было по 25-30

эксплантов. Повторность опытов трехкратная. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Excel.

2.3.3 Оценка влияние лазерного излучения на морфогенез растений in vitro

Стерильные микрочеренки обрабатывали излучением гелий-неонового лазера ГН – 40 (длина волны 632,8 нм) и полупроводникового HLDPМ12-655-10НJ (длина волны 655 нм) с плотностью мощности светового потока 2 Вт/м² и диаметром светового пятна 14 см при различных экспозициях (30, 60, 120, 240, 480, 960 с) на 3-4 сутки после высадки их на среду укоренения непосредственно в культуральных сосудах. Расчет более длительного периода облучения производили путем удвоения предыдущего временного отрезка. Для равномерного облучения колбу с эксплантами ставили на вращающуюся с постоянной скоростью подставку (рис. 18). Все опыты по лазерному облучению растений проводили под руководством доктора технических наук Будаговского А.В.

Побеги культивировали в широкогорлых конических колбах емкостью 250 мл и стеклянных банках емкостью 400 мл. После облучения сосуды с растениями переносили в культуральную, и в целях чистоты эксперимента разделяли перегородками. Таким образом, контрольные и опытные растения находились в одних условиях культивирования, но также были оптически изолированы друг от друга.



Рисунок 18 - Обработка растений когерентным оптическим излучением *in vitro*

Учитывали число жизнеспособных эксплантов, укоренившихся микрочеренков, число образовавшихся побегов или корней и их длину. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Excel.

2.3.4 Адаптация микрорастений

Адаптацию микрорастений проводили в рассадном отделении зимней отапливаемой теплицы. Теплица поликарбонатная, многорядная, построена по проекту французской фирмы «Ришель», общая площадь 5000 м² (0,5 га). Рассадное отделение имеет общую площадь 75 м. в длину и 9,6 м. в ширину. В нем размещено 36 стеллажей УГС-4, по 18 штук с каждой стороны.

Рассадное отделение оснащено лампами досвечивания, что позволяет выращивать растения в зимнее месяцы, при недостатке естественного освещения. Регулировка микроклимата в теплице автоматизирована.

В почву высаживали укорененные микрорастения, имеющие не менее 4-5 листьев длиной 4-7 см. Растения длинным пинцетом вынимали из колб и убирали с корней излишки агара. Чтобы избежать подсушивания микрорастений до высадки в почву их держали в закрытых контейнерах с погруженными в воду корнями.

Растения высаживали в субстрат на основе нейтрального минерализованного верхового сфагнового торфа марки "Агробалт-С". Субстрат полностью готов к работе и имеет следующие характеристики: рН 5,5-6,6, N=150 мг/л, P₂O₅=150 мг/л, K₂O=250 мг/л, Mg=30 мг/л, Ca= 120 мг/л. Этих элементов питания в целом хватает на весь срок от высадки до пересадки в горшки или грунт.

Для адаптации использовали кассеты (евростандарт) на 54 ячейки (515 x 330 мм, объем ячейки 85 мл). в кассеты и помещали в плёночные минитеплицы (рис. 19, 20). От прямых солнечных лучей растения затеняли укрывным материалом «Спанбол». Минитеплицы устанавливали на подвижных стеллажах УГС-4 (установка гидропонная стеллажная, модель 4) в рассадном отделении зимней отапливаемой теплицы. Эта установка оборудована

герметичным пластиковым поддоном, на котором имеются глубокие продольные и мелкие поперечные канавки для равномерного распределения воды по поверхности они же, придают поддону необходимую жесткость. Пластиковый поддон установлен на металлическом каркасе, позволяющем регулировать высоту и уклон. Установка оснащена клапаном подачи раствора, что обеспечивает технологию полива «прилив – отлив». Допустимая нагрузка на пластиковый поддон – 70 кг/м². Стол имеет размеры 1,8 м на 8 м, на него устанавливается 75 стандартных кассет на 54 ячейки.

Первые две недели в минитеплицах поддерживалась высокая относительная влажность воздуха (до 97-100 %) и температура 24-28°C, после чего влажность воздуха в тепличках постепенно снижали, приоткрывая укрытия и через 3,5-4 недели плёнку полностью снимали. В пасмурные дни растения досвечивали, поддерживая освещенность 3-3,5 лк. не менее 12 часов в сутки.

Изучали влияние различных добавок в базовый субстрат. Использовали следующие варианты: 1) субстрат на основе верхового сфагнового торфа "Агробалт-С" (контроль); 2) торф : песок (4:1); 3) торф : перлит (4:1); 4) торф : цеолит (4:1); 5) торф : песок : почва (3 : 1: 1); 6) торф : перлит : почва (3 : 1: 1); 7) торф : цеолит : почва (3 : 1: 1).

В опыте по влиянию минеральных подкормок через 21 и 35 дней после высадки в почву растения подкармливали раствором минеральных солей, используемом для выращивания огурца по гидропонной технологии на минераловатном субстрате (NH_4^+ - 1,0; K^+ - 7,55; Ca^{2+} - 5,3; Mg^{2+} - 2,25; NO_3^- - 15,65; SO_4^{2-} - 3,3; H_2PO_4^- 1,4 ммоль/л), разбавленным в 4 раза раствором минеральных солей среды Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962) или комплексным минеральным удобрением (Азофоска, 20 г/10 л раствора).



Рисунок 19 - Минитеплицы для высадки микрорастений



Рисунок 20 – Подготовленная для адаптации минитеплица

В опыт с микробиологическими удобрениями были включены следующие биопрепараты: Байкал ЭМ 1; Азотовит, Фосфатовит, Пралин-Экстра.

Все с классом опасности 4. Класс опасности: 4 (мало опасный продукт) нетоксичен, непатогенен, пожаровзрывобезопасен.

Байкал ЭМ-1: Действующее вещество - фотосинтезирующие бактерии, молочнокислые бактерии, дрожжи, актиномицеты и ферментирующие грибы.

Применяется для создания более благоприятных условий для роста растений, повышения общего иммунитета, снижения роста патогенной микрофлоры, полива почвы или любых органических остатков. Улучшает качество урожая большинства культур, повышает его сохранность и зимнюю лежкость, повышает устойчивость растений к болезням, вредителям и неблагоприятным погодным факторам.

Азотовит: Действующее вещество — живые клетки и споры бактерий *Azotobakter chroococcum*, штамм В-9029. Концентрация: (титр живых или продукта их жизнедеятельности) — не менее $5,0 \times 10^9$ КОЕ/г.

Применяется в органическом земледелии в качестве удобрения, повышает всхожесть семян и рост надземной части растения. Активирует иммунную систему растений. Бактерии вырабатывают антибиотики,

подавляющие фитопатогенную микрофлору (корневые гнили, ризоктониоз и др.).

Фосфатовит: Действующее вещество— живые клетки и споры бактерий *Bacillus mucilaginosus*, штамм В-8966. Концентрация (титр живых или продукта их жизнедеятельности) - не менее $0,12 \times 10^9$ КОЕ/г.

Мобилизует труднодоступные формы фосфора и калия, обеспечивая растения фосфорным и калийным питанием, является стимулятором корнеобразования и роста растений. Подавляет патогенную микрофлору. Повышает урожайность сельскохозяйственных культур.

Пралин-Экстра: Действующее вещество— живые клетки и споры бактерий *Bacillus subtilis*. Концентрация (титр живых или продукта их жизнедеятельности) - не менее 10^{10} КОЕ/г.

Применяется в качестве лечебного и профилактического средства, эффективно подавляет возбудителей грибных и бактериальных заболеваний

Через 4 недели после высадки растений в почву проводили корневую подкормку биопрепаратами (3 мл/1 л воды). В качестве контроля выступал субстрат Агробалт – С без дополнительного внесения органических, минеральных удобрений и микроорганизмов.

Через 4 и 8 недель определяли приживаемость микрорастений в нестерильных условиях, оценивали динамику роста надземной части и корневой системы растений. Учеты проводили раз в неделю. Повторность опыта – трехкратная, в каждой повторности не менее 54 растений. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Excel.

Для защиты от насекомых - вредителей каждые 2 недели растения опрыскивали препаратом Фитоверм (4 мл/л).

По мере роста растений их рассаживали в большие емкости (горшок 1,0л Д13М) со свежим субстратом. Дальнейшее выращивание адаптированных растений соответствовало принятой агротехнике выращивания ягодных культур рода *Rubus*.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Культивирование растений рода *Rubus* на питательных средах разного состава на этапе мультипликации

При размножении садовых культур *in vitro* необходимо учитывать видовую и сортовую специфику растений. Для культивирования определенного вида, как правило, подходят не одна, а несколько питательных сред. Размножение растений рода *Rubus* традиционно проводят на средах с минеральным составом по прописи Мурасиге–Скуга (Murashige, Skoog, 1962) (Расторгуев, 1996; Упадышев, Высоцкий, 1991; Муратова и др., 2004; Упадышев, Гуськов, 1996; Джигадло и др., 2005; Соловых, 2009; Сквородников, Казаков, 2012; Сквородников и др., 2015; Малаева, Молканова, 2017). Малину красную размножают и на среде Андерсона (Расторгуев, 1996).

В наших исследованиях для культивирования растений рода *Rubus* за основу были взяты прописи трех питательных сред: MS (Murashige, Skoog, 1962), QL (Quorin, Lepoivre, 1977) и DKW (Driver, Kuniyuki, 1984). Использовали также модификации питательных сред MS и QL, добавив в среду MS в качестве источника кальция нитрат кальция вместо хлорида, заменив в обеих средах 30 г сахарозы на 20 г глюкозы и увеличив вдвое концентрацию хелата железа, поскольку известно, что малина и ее гибриды чувствительны к количеству железа в составе питательной среды.

Полученные результаты показали, что растения рода *Rubus* можно размножать на всех питательных средах, включенных в исследования.

Наивысшие коэффициенты размножения для большинства сортов ежевики получены на среде QL_m, малины – на среде MS_m (таблица 2). Ежемалиновые гибриды практически одинаково развивались как на среде QL_m, так и на среде MS_m. Имела место и сортовая специфика. Побеги сортов ежевики Дирксен Торнлесс, Блэк Сатин, Навахо быстрее росли на среде QL, чем на среде

MS. Сорта ежевики Трипл Краун и Логан Торнлесс практически одинаково развивались как на среде Кворина-Лепуавра, так и на среде Мурасиге- Скуга.

На среде DKW побеги отличались максимальным развитием и наиболее интенсивно росли в длину (рис. 21). Следует учесть, что культивирование эксплантов на средах с глюкозой, в том числе на среде DKW требовало регулярных и своевременных пересадок, т.к. в противном случае при достаточно высоком исходном коэффициенте размножения отмечали признаки оводнения побегов, либо побеги через некоторое время могли начать некротизировать. Такой эффект мы наблюдали на сортах ремонтантной малины (рис. 22).



Рисунок 21 - Размножение ежемалинового гибрида Тайберри на среде QL (слева) и среде DKW (справа) при содержании 6-БАП 0,5 мг/л



Рисунок 22 - Размножение малины (сорт Бриллиантовая) на среде DKW (слева) и среде MSm (справа) при содержании 6-БАП 0,5 мг/л

Таблица 2 - Эффективность размножения растений рода *Rubus* на средах разного минерального состава с 6-БАП - 0,5 мг/л и ИУК - 0,1 мг/л

Сорт	Число побегов (шт.) на питательной среде				
	MS	MS _m	QL	QL _m	DKW
<i>Ежевика</i>					
Блэк Сэтин	4,6±0,5	5,3±0,4	5,5±0,4	6,3±0,5	5,4±0,5
Логан Торнлесс	3,7±0,4	4,7±0,3	3,6±0,4	4,9±0,5	4,5±0,5
Дирксен Торнлесс	4,8±0,5	5,4±0,4	5,8±3,3	6,7±0,4	5,3±3,3
Навахо	4,4±0,3	4,7±0,4	4,4±0,3	5,3±0,4	4,1±0,3
Трипл Краун	3,7±0,4	3,8±0,3	3,6±0,4	4,3±0,4	3,4±0,4
<i>Ежемалиновые гибриды</i>					
Логанберри	3,3±0,3	3,9±0,3	3,5±0,3	4,3±0,3	3,8±0,3
Бойзенберри	3,9±0,4	4,6±0,3	4,3±0,4	5,5±0,4	4,5±0,3
Тайберри	3,7±0,3	4,3±0,3	3,9±0,2	4,2±0,4	4,4±0,3
Букингем Тайберри	3,3±0,2	3,8±0,2	3,6±0,2	4,9±0,2	4,1±0,3
<i>Малина</i>					
Геракл	3,6±0,5	4,2±0,4	3,1±0,2	4,0±0,2	4,4±0,4
Бриллиантовая	4,4±0,4	5,3±0,3	3,4±0,3	3,7±0,3	4,6±0,4
Оранжевое чудо	3,4±0,3	4,0±0,2	3,6±0,2	3,8±0,2	4,1±0,3

Поскольку известно, что малина и ежемалина чувствительны к изменению содержания железа в составе питательной среды (Соловых, 2009), мы изменяли концентрацию хелата железа относительно базового состава. Установлено, что микропобеги малины лучше развиваются на питательных средах с двойным содержанием хелата железа. При повышенном содержании железа у этой культуры формируются хорошо развитые побеги с крупными листьями темно-зеленого цвета (рис. 23), тогда как при пониженной по отношению к контролю (стандартная среда MS) концентрации железа формируются укороченные побеги с бледно-зелеными или желтоватыми

листьями. Подобные результаты получили и при культивировании ежемалиновых гибридов. Увеличение вдвое содержания хелата железа в среде MS у всех изучаемых генотипов приводит к формированию хорошо развитых побегов насыщенно-зеленого цвета. В то же время дальнейшее увеличение концентрации железа в питательной среде не дало положительного результата. Эффективность размножения всех культур на средах с тройным содержанием железа была ниже, чем на средах с одинарной и двойной нормой.



Рисунок 23 - Размножение малины (сорт Оранжевое чудо) на среде MS 2Fe с глюкозой (20 г/л) с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л ИУК

На сортах ежевики не получено статистически достоверного повышения коэффициента размножения при увеличении концентрации хелата железа в среде в 2 раза. В ряде случаев имела место тенденция снижения коэффициента размножения при повышении концентрации хелата железа в среде. Например, коэффициент размножения ежевики Блэк Сэтин на модифицированной среде MS, содержащей 1,0 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л ИМК при стандартной концентрации железа составил $6,1 \pm 0,5$, при двойной норме $4,4 \pm 0,4$, при тройной норме $3,2 \pm 0,3$ побега на эксплант. Кроме того, на средах с повышенным содержанием железа у всех генотипов уменьшалась доля побегов, подходящих для укоренения. Так, у малины Геракл доля побегов более 1,5 см на модифицированной среде MS при концентрации 6-БАП 1,0 мг/л и ИМК 0,1 мг/л составила 46,2%, на среде с двойным содержанием железа

13,7%, на среде с тройным содержанием железа 4,1%. Средняя длина побегов соответственно составила $10,1 \pm 0,7$ мм, $8,6 \pm 0,6$ мм, $7,7 \pm 0,7$ мм. Доля побегов длиннее 1,5 см ежевики Блэк Сэтин на среде MS, содержащей глюкозу и стандартное количество хелата железа при концентрации 6-БАП 1,0 мг/л и ИМК 0,1 мг/л составила 35,0%, на среде с двойным содержанием железа 11,1%, на среде с тройным - 7,2%. Следует отметить общую тенденцию к увеличению коэффициента размножения микропобегов, культивируемых на средах с глюкозой, но в большинстве случаев различия между вариантами находились в пределах ошибки. Достоверно показано увеличение длины побегов на этих средах, по сравнению со средами, содержащими сахарозу (таблица 3).

Таблица 3 - Доля побегов (%) растений рода *Rubus* $\geq 1,5$ см на средах разного минерального состава с 6-БАП - 0,5 мг/л и ИУК - 0,1 мг/л

Сорт	Питательная среда				
	MS	MS _m	QL	QL _m	DKW
<i>Ежевика</i>					
Блэк Сэтин	43,5	54,4	50,1	60,1	65,8
Логан Торнлесс	46,6	61,4	52,2	65,0	71,3
Дирксен Торнлесс	44,0	51,9	53,5	67,5	70,1
Навахо	50,5	62,3	53,4	65,9	79,3
Трипл Краун	38,9	49,1	49,4	60,0	68,4
<i>Ежемалиновые гибриды</i>					
Логанберри	63,3	74,2	68,7	73,1	76,7
Бойзенберри	56,7	68,1	59,4	70,0	74,3
Тайберри	45,4	56,7	52,8	70,9	71,6
Букингем Тайберри	52,5	60,0	50,8	65,9	65,3
<i>Малина</i>					
Геракл	73,5	75,7	66,2	74,6	84,1
Бриллиантовая	66,7	78,1	69,4	70,0	80,3
Оранжевое чудо	47,1	66,7	53,6	57,5	80,5

Использование модифицированных сред Мурасиге-Скуга и Кворина-Лепуавра, а также среды DKW позволяет получать хорошо развитые побеги с развернутыми листьями ярко зеленого цвета, пригодные как для укоренения, так и для постановки дальнейших опытов (рис. 24, 25).



Рисунок 24 - Размножение ежевики
Блэк Сэтин на среде MS_m2Fe с
0,5 мг/л 6-БАП



Рисунок 25 - Размножение ежевики
Трипл Краун на среде DKW с
0,25 мг/л 6-БАП

Другим важным фактором, ответственным за размножение побегов *in vitro*, является гормональный состав среды. Наиболее часто для снятия апикального доминирования и развития боковых почек в культуре тканей растений рода *Rubus* применяют цитокинин аденинового ряда - 6-бензиламинопурин (Упадышев, Высоцкий, 1996; 2000; Упадышев, 1993; Расторгуев, 1996; Ковалева и др., 2000; Клоконос, 2001; Немцова и др., 2020). Этот цитокинин наиболее доступен и дает хорошие результаты при размножении самых разных видов растений.

Мы применяли 6-бензиламинопурин в концентрации 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мг/л в комбинации с одним из ауксинов ИМК или ИУК в концентрации от 0,025 до 0,2 мг/л. Как следует из полученных результатов, рост концентрации 6-БАП в питательной среде способствовал увеличению коэффициента размножения растений рода *Rubus* (таблица 4, 5, 6). Увеличение количества микропобегов в конгломератах при повышении концентрации цитокинина в среде коррелировало с уменьшением их средней длины.

Таблица 4 - Интенсивность размножения ежевики на среде QL_m, содержащей разные концентрации 6-БАП и ИМК

Сорт	Концентрация в питательной среде, мг/л		Число побегов, шт.	
	6- БАП	ИМК	6 недель	8 недель
Дирксен Торнлесс	0,25	0,025	3,4±0,2	4,0±0,3
	0,5	0,05	3,5±0,3	4,2±0,3
	1,0	0,1	3,8±0,4	5,1±0,4
	1,5	0,15	4,0±0,3	8,1±0,4
	2,0	0,2	3,7±0,3	6,4±0,4
Блэк Сэтин	0,25	0,025	3,2±0,2	4,3±0,3
	0,5	0,05	3,5±0,1	4,8±0,2
	1,0	0,1	3,9±0,1	5,5±0,3
	1,5	0,15	3,7±0,3	6,4±0,4
	2,0	0,2	4,4±0,2	7,3±0,4
Навахо	0,25	0,025	3,6±0,2	4,3±0,3
	0,5	0,05	3,8±0,3	4,7±0,4
	1,0	0,1	3,9±0,3	4,8±0,3
	1,5	0,15	4,3±0,4	5,2±0,4
	2,0	0,2	4,7±0,4	5,8±0,3
Логан Торнлесс	0,25	0,025	3,0±0,2	3,4±0,4
	0,5	0,05	2,8±0,2	3,5±0,4
	1,0	0,1	3,3±0,3	3,9±0,3
	1,5	0,15	3,0±0,2	4,4±0,3
	2,0	0,2	3,4±0,2	5,7±0,3
Трипл Краун	0,25	0,025	3,3±0,2	4,5±0,3
	0,5	0,05	3,7±0,3	4,4±0,4
	1,0	0,1	4,1±0,3	5,4±0,3
	1,5	0,15	4,3±0,4	5,4±0,4
	2,0	0,2	4,4±0,4	5,3±0,3

Таблица 5 - Интенсивность размножения ежемалиновых гибридов на среде MS_m, содержащей разные концентрации 6-БАП и ИУК

Сорт	Концентрация в питательной среде, мг/л		Число побегов, шт.	
	6- БАП	ИУК	6 недель	8 недель
Логанберри	0,25	0,05	3,4±0,2	4,2±0,3
	0,5	0,1	3,8±0,4	4,9±0,4
	1,0	0,2	4,0±0,3	5,1±0,4
	1,5	0,3	3,7±0,3	5,3±0,3
	2,0	0,4	3,7±0,3	5,3±0,3
Бойзенберри	0,25	0,05	3,5±0,1	4,8±0,2
	0,5	0,1	3,9±0,1	5,1±0,3
	1,0	0,2	3,7±0,3	5,4±0,3
	1,5	0,3	4,3±0,2	5,5±0,4
	2,0	0,4	4,0±0,3	6,3±0,3
Тайберри	0,25	0,05	3,8±0,2	4,4±0,4
	0,5	0,1	3,9±0,3	4,8±0,3
	1,0	0,2	4,3±0,4	5,2±0,4
	1,5	0,3	4,7±0,4	5,6±0,3
	2,0	0,4	4,5±0,3	6,0±0,3
Букингем Тайберри	0,25	0,05	2,8±0,2	3,5±0,4
	0,5	0,1	3,1±0,3	3,6±0,3
	1,0	0,2	3,3±0,2	3,8±0,3
	1,5	0,3	3,4±0,2	4,7±0,3
	2,0	0,4	3,7±0,3	5,3±0,3

Важным показателем эффективности этапа размножения является получение максимального числа побегов, пригодных к укоренению. Как

правило, такими считаются микропобеги длиной 1,5 см и более, поэтому одним из показателей оценки среды размножения считают выход таких побегов.

Таблица 6 - Интенсивность размножения малины на среде MSm, содержащей разные концентрации 6-БАП и ИУК

Сорт	Концентрация в питательной среде, мг/л		Число побегов, шт.	
	6- БАП	ИУК	6 недель	8 недель
Геракл	0,25	0,05	2,4±0,2	3,2±0,3
	0,5	0,1	2,8±0,3	3,9±0,3
	1,0	0,2	3,1±0,3	4,4±0,4
	1,5	0,3	3,1±0,3	4,3±0,3
	2,0	0,4	3,3±0,3	4,5±0,3
Бриллиантовая	0,25	0,05	2,6±0,1	3,8±0,2
	0,5	0,1	3,5±0,1	4,1±0,3
	1,0	0,2	3,7±0,3	4,4±0,4
	1,5	0,3	4,0±0,3	4,5±0,4
	2,0	0,4	3,7±0,3	4,3±0,3
Оранжевое чудо	0,25	0,05	2,3±0,2	3,4±0,4
	0,5	0,1	2,3±0,2	3,8±0,3
	1,0	0,2	2,3±0,3	3,4±0,4
	1,5	0,3	2,7±0,3	3,6±0,3
	2,0	0,4	2,9±0,3	4,3±0,3

По результатам наших исследований, изменение концентрации 6-БАП в среде размножения влияло на коэффициент размножения и долю побегов, пригодных к укоренению. Через месяц культивирования для всех включенных в исследования генотипов максимальное количество побегов хорошо развитых побегов, достигших длины 1,5 см и пригодных для укоренения

отмечено в диапазоне концентраций 6-БАП 0,5-1,0 мг/л, поэтому эти концентрации выбраны в качестве рабочих. Дальнейшее повышение концентрации цитокинина в среде размножения представляется нецелесообразным, т.к. даже если побегов образуется больше, качество их снижается.

Проведенная нами модификация питательных сред по источнику углерода и содержанию железа также способствовала лучшему развитию побегов. При этом самые мощные побеги получены на средах с содержанием цитокинина 0,25-0,5 мг/л (рис. 26, 27).



а

б

в

Рисунок 26 - Размножение ежемалинового гибрида Букингем Тайберри на средах разного состава: а - MS_m 6-БАП 0,25+ ИУК-0,025 мг/л; б - MS_m 6-БАП 0,5+ ИУК-0,05 мг/л; в - MS_m 6-БАП 1,0+ ИУК-0,1 мг/л



Рисунок 27- Размножение ежемалинового гибрида Логанберри на среде MS_m при содержании 6-БАП 0,5 мг/л, ИМК- 0,1 мг/л

Обобщая полученные результаты, можно сделать следующие выводы. Для размножения растений рода *Rubus* эффективно использовать минеральную основу питательных сред Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962), Кворина-Лепуавра (Quorin, Lepoivre, 1977) и DKW (Driver, Kuniyuki, 1984). Модификация состава питательных сред по источнику кальция (замена хлорида кальция на нитрат), источнику углерода (замена сахарозы на глюкозу) и увеличение концентрации хелата железа в два раза в средах для культивирования малины, позволяет повысить коэффициент размножения и увеличить долю побегов более 1,5 см, пригодных для укоренения.

Повышение концентрации 6-БАП в питательной среде способствует увеличению коэффициента размножения растений рода *Rubus*. Увеличение количества микропобегов в конгломератах при повышении концентрации цитокинина в среде коррелирует с уменьшением их средней длины.

Максимальное количество побегов хорошо развитых побегов, достигших длины 1,5 см и пригодных для укоренения отмечено в диапазоне концентраций 6-БАП 0,5-1,0 мг/л, поэтому эти концентрации рекомендуются в качестве рабочих.

3.2 Укоренение микрочеренков растений рода *Rubus in vitro*

Наличие развитой корневой системы у микрорастений способствует более быстрой адаптации растений к почвенным условиям и большему приросту побегов на этапе адаптации. Поэтому так важно для каждого вида растений подобрать оптимальный состав среды укоренения.

На этапе укоренения как правило используется разбавленная в два или четыре раза минеральная основа среды размножения и снижается концентрация сахарозы до 1-2% (Калинин и др., 1980; Катаева, Бутенко, 1983; Nemeth, 1986; Moncousin, 1991). Уменьшение содержания питательных элементов в среде должно стимулировать развитие корневой системы для обеспечения нормального питания растений и снижать интенсивность

каллусообразования на срезах микрочеренков (Вечернина, 2004). В наших исследованиях мы использовали половинную концентрацию солей макроэлементов питательной среды на основе прописи Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962) и Кворина-Лепуавра (Quoirin, Leroivre, 1977) и снижали концентрацию сахарозы до 20 г/л.

Важнейшим условием, обеспечивающим эффективное укоренение микрочеренков *in vitro*, является грамотное использование экзогенных индукторов ризогенеза.

Поскольку эндогенный баланс фитогормонов у разных видов существенно отличается, различные виды и сорта культурных растений существенно отличаются по способности к образованию корней *in vitro*. Существует мнение, что виды, которые обладают высокой способностью к вегетативному размножению и легко образуют корни при размножении одревесневшими и зелеными черенками, отличаются высокой способностью к ризогенезу в культуре *in vitro*. При выборе оптимального индуктора ризогенеза стараются добиться хорошего развития корневой системы при незначительном образовании каллуса.

Полученные нами результаты говорят о том, что ежевика укореняется и на средах без гормонов, но для интенсивного развития корневой системы требуется применение ауксина. Результаты опытов, проведенных на сортах Дирксен Торнлесс и Блэк Сатин с использованием трех наиболее применяемых ауксинов (ИМК, ИУК, НУК), показали, что ежевика укореняется с высокой частотой на средах с разными ауксинами при различных концентрациях (таблица 7, 8). При этом у полученных микрорастений качество корневой системы и побегов существенно отличаются в зависимости от используемого ауксина (рис. 28).

Так на средах с ИУК формируется более слабая корневая система с тонкими темными корешками, при этом частота ризогенеза высокая. На средах с ИУК побеги развиваются нормально, хотя и отстают в росте по сравнению с побегами, культивируемыми на средах с ИМК и НУК. Применение НУК было

удачным только при концентрации ауксина 0,125-0,25 мг/л, при этих концентрациях ауксина получена достаточно хорошо развитая корневая система и максимальный прирост укорененных побегов. Более высокие концентрации этого ауксина (0,5-1,0 мг/л) приводили к образованию каллуса на корнях и частичному оводнению побегов или некрозу листьев.

Таблица 7 - Влияние типа и концентрации ауксина на эффективность ризогенеза ежевики *in vitro* (сорт Дирксен Торнлесс)

Концентрация ауксина, мг/л	Частота укоренения, %	Число корней, шт.	Длина корней, см	Длина побегов, см
0,125 ИМК	96,4	4,3±0,4	1,8±0,2	4,3±0,3
0,25 ИМК	100	4,4±0,3	1,9±0,2	3,8±0,2
0,5 ИМК	94,3	3,7±0,4	2,7±0,2	3,6±0,3
1,0 ИМК	90,2	3,1±0,3	2,2±0,5	3,4±0,2
0,125 ИУК	100	3,4±0,3	1,6 ±0,2	3,1±0,2
0,25 ИУК	100	3,9±0,4	1,5 ±0,2	3,2±0,2
0,5 ИУК	100	3,8±0,2	1,5 ±0,2	3,2±0,2
1,0 ИУК	100	5,8±0,4	1,2±0,1	3,1±0,2
0,125 НУК	85,3	3,5±0,4	3,9±0,5	6,6±0,4
0,25 НУК	93,5	3,3±0,4	2,3±0,2	4,7±0,4
0,5 НУК	86,4	3,5±0,3	2,0±0,2	3,9±0,3
1,0 НУК	80,7	3,4±0,4	2,3±0,2	3,9±0,2

Наиболее оптимального развития корневой системы укорененных микрочеренков достигли на средах, содержащих ИМК. На средах с β -индолилмасляной кислотой получено максимальное количество корней на окорененный микрочеренок у ежевики Дирксен Торнлесс при концентрации 0,125-0,25 мг/л, и у ежевики Блэк Сэтин при концентрации 0,5-1,0 мг/л. На

средах с этим ауксином корни светлые, нормальной толщины, с корешками второго порядка.

Таблица 8 - Влияние типа и концентрации ауксина на эффективность ризогенеза ежевики *in vitro* (сорт Блэк Сэтин)

Концентрация ауксина, мг/л	Частота укоренения, %	Число корней, шт.	Длина корней, см	Длина побегов, см
0,125 ИМК	90,3	3,0±0,3	1,4±0,3	4,4±0,3
0,25 ИМК	93,7	3,3±0,4	2,4±0,2	4,1±0,3
0,5 ИМК	100	4,3±0,3	3,9 ±0,2	4,9±0,3
1,0 ИМК	95,3	4,5±0,4	3,3±0,5	3,6±0,3
0,125 ИУК	85,9	2,5±0,3	1,6 ±0,2	3,2±0,2
0,25 ИУК	89,8	2,7±0,3	1,5 ±0,3	3,0±0,2
0,5 ИУК	90,6	3,7±0,3	1,3 ±0,2	3,1±0,3
1,0 ИУК	93,2	3,9±0,4	1,1±0,1	3,5±0,3
0,125 НУК	91,8	2,6±0,4	2,0±0,3	6,5±0,4
0,25 НУК	96,3	2,5±0,3	2,8±0,3	5,8±0,4
0,5 НУК	91,1	2,8±0,3	3,2±0,3	4,6±0,3
1,0 НУК	86,3	2,4±0,4	3,0±0,4	4,2±0,3

Применение ИМК в концентрации 0,5 мг/л в составе среды укоренения позволило достичь частоты укоренения 85-95% у всех включенных в исследования сортов. Кроме того, при этой концентрации ауксина на срезах микрочеренков формируется незначительное количество каллуса.

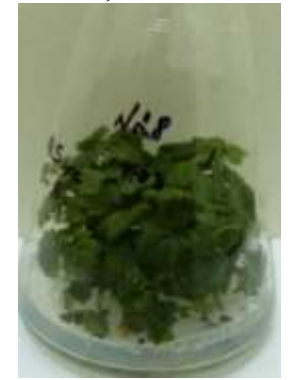


0,125 ИМК

0,25 ИМК

0,5 ИМК

1,0 ИМК



0,125 ИУК

0,25 ИУК

0,5 ИУК

1,0 ИУК



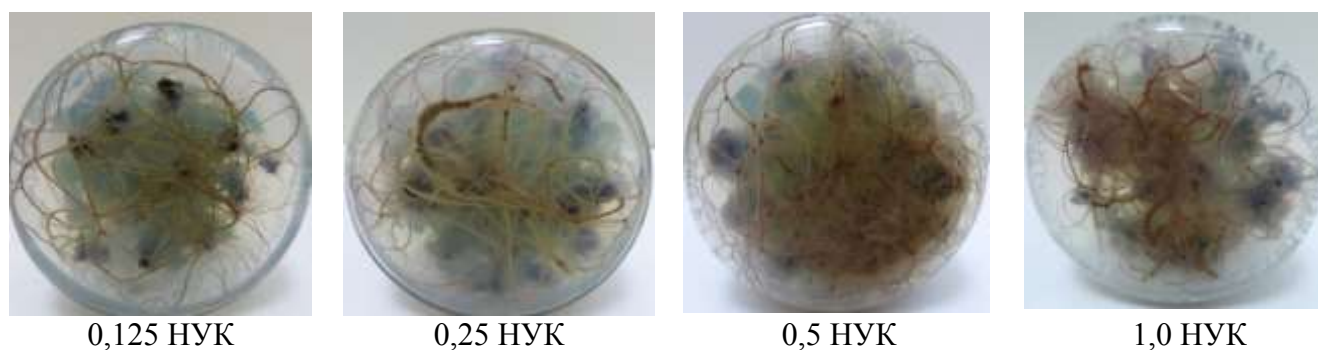


Рисунок 28 - Влияние типа и концентрации ауксина (мг/л) на ризогенез и развитие побегов ежевики (сорт Дирксен Торнлесс) на среде $MS_{ук}$

Эффективность укоренения ежемалиновых гибридов в целом была несколько ниже. На безгормональных средах частота укоренения составляла 61,8-75,8% (рис. 29). Результаты опытов показали, что все три используемых нами ауксина можно успешно применять для укоренения микрочеренков ежемалины, но оптимальная концентрация каждого в питательной среде будет разная. Как и в случае с ежевикой, применение НУК было оптимальным при концентрации 0,2-0,25 мг/л, добавление ИМК и ИУК в состав питательной среды давало максимальный эффект при концентрации ауксина 0,4-0,5 мг/л. Наибольшее число корней на укорененный микрочеренок образуется на средах с ИМК и количество их растет с повышением концентрации этого ауксина в питательной среде (рис. 30).

На примере ежемалинового гибрида Тайберри показало, что рост числа укоренившихся побегов коррелирует с ростом концентрации ауксина только до определенных значений для каждого индуктора ризогенеза. Дальнейшее повышение концентрации ауксина не целесообразно, т.к. может вести к снижению частоты укоренения (рис. 31, 32). Как и у других культур меньше всего корней образовалось на средах без гормонов и эти корни наиболее активно росли (рис. 34). Во всех случаях корни были нормальной морфологии, светлые, без каллусного разрыхления (рис. 35).

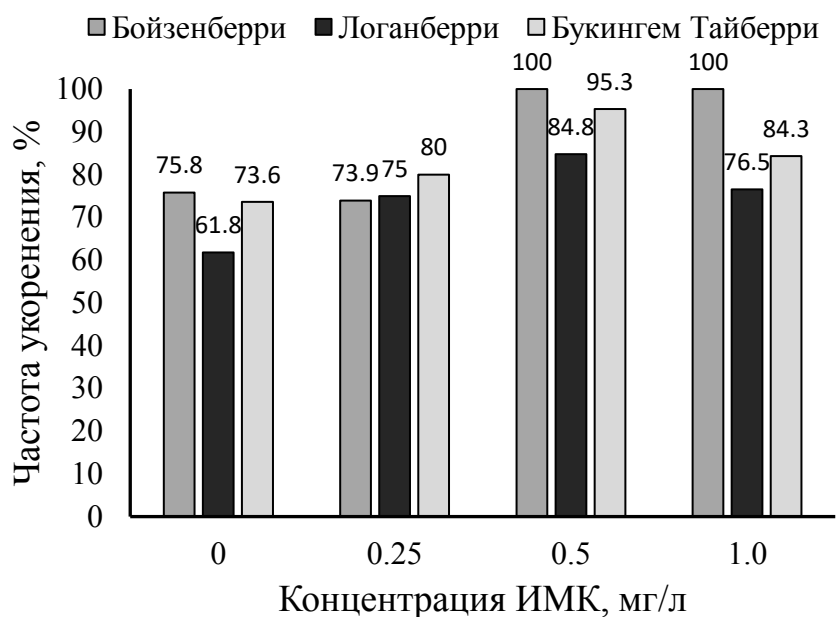


Рисунок 29 - Влияние концентрации ИМК в среде MSук на частоту Ризогенеза ежемалиновых гибридов

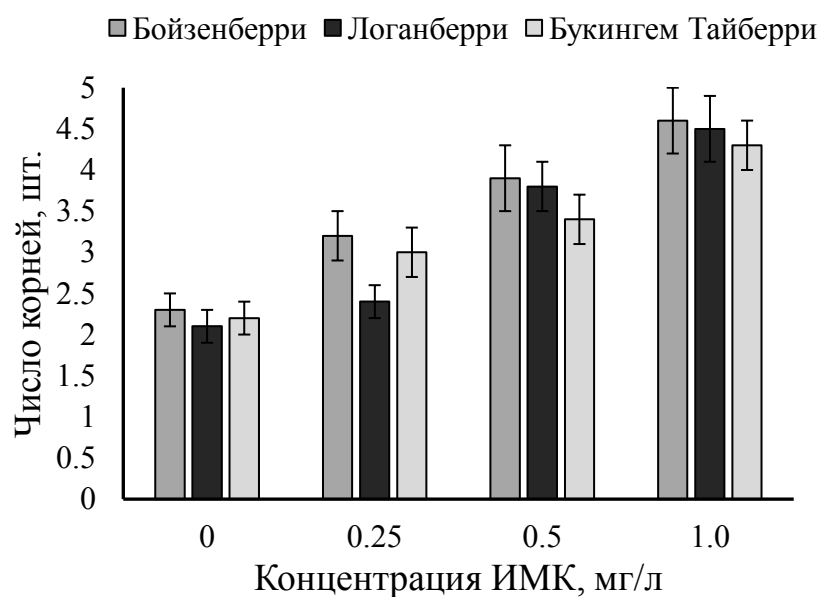


Рисунок 30 - Влияние концентрации ИМК в среде MSук на образование корней на микрочеренках ежемалиновых гибридов

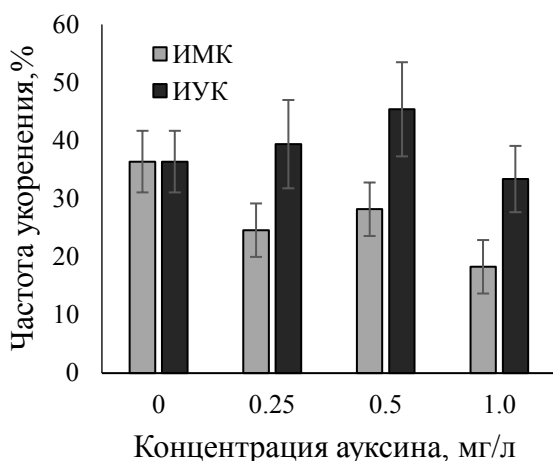


Рисунок 31 - Частота ризогенеза микрочеренков ежемалинового гибрида Тайберри на среде MS_{УК} (1 учет)

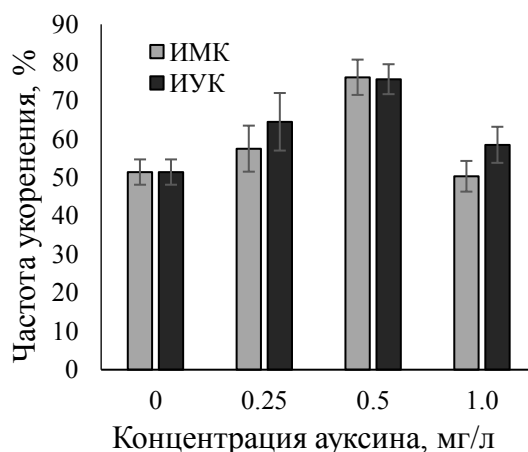


Рисунок 32 - Частота ризогенеза микрочеренков ежемалинового гибрида Тайберри на среде MS_{УК} (итог)

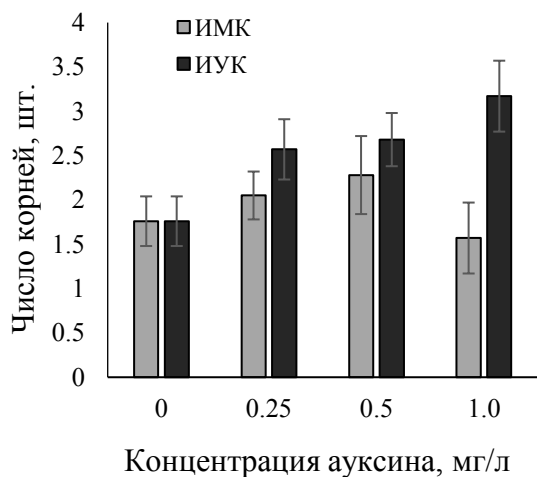


Рисунок 33 - Интенсивность образования корней на микрочеренках ежемалинового гибрида Тайберри на среде MS_{УК} (итог)

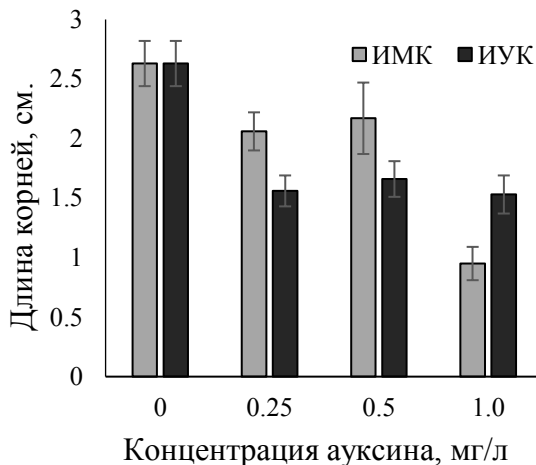


Рисунок 34 - Рост корней у ежемалинового гибрида Тайберри на среде MS_{УК} (итог)

Подобные результаты получены и при укоренении других ежемалиновых гибридов. Частота укоренения на средах с ауксинами при оптимальной концентрации каждого составила 84,8-100%. Максимальное число корней образовывалось на средах с ИМК (рис 36, 37).



без гормонов



НУК 0,25 мг/л



ИМК 0,25 мг/л



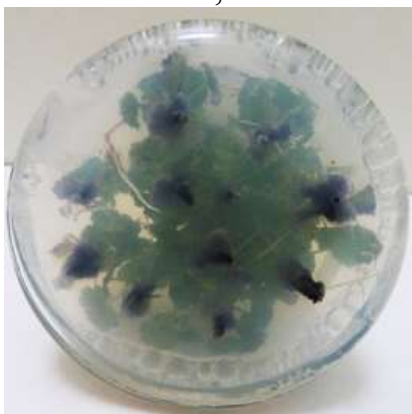
ИУК 0,25 мг/л



ИМК 0,5 мг/л



ИУК 0,5 мг/л



ИМК 1,0 мг/л



ИУК 1,0 мг/л

Рисунок 35 - Влияние типа и концентрации ауксина (мг/л) на ризогенез ежемалинового гибрида (сорт Тайберри) на среде MS_{УК}



Рисунок 36 - Укорененные на среде QLUk с 0,5 мг/л ИМК микрорастения ежемалинового гибрида Бойзенберри



Рисунок 37 - Укорененные на среде MSuk с 0,5 мг/л ИМК микрорастения ежемалинового гибрида Логанберри

Подобные результаты получены и при укоренении ремонтантной малины. Ремонтантная малина на безгормональных средах ризогенеза укореняется на 40,2-60,5% в зависимости от генотипа. Меньше всего корней образуется на безгормональных средах. На средах с ауксинами процесс формирования корней проходит быстрее и возрастает число корней на укорененный микрочеренок ремонтантной малины. Большинство изучаемых нами генотипов достаточно эффективно укореняются как на средах, содержащих 0,25-1,0 мг/л ИМК, так и на средах с 0,25-1,0 мг/л ИУК. Так, частота укоренения сорта Бриллиантовая - 57,1- 75,0% на средах с ИМК и 60,5 - 69,2 % на средах с ИУК (рис. 38). Число корней возрастало с увеличением концентрации ИМК в питательной среде, на средах с ИУК образовалось примерно равное число корней при всех концентрациях ауксина (рис. 39). При этом корни росли существенно быстрее на средах с ИУК (рис. 40).

Эффективность ризогенеза сорта Оранжевое чудо была 88,9-90,0% при концентрации ИМК в питательной среде 0,25-0,5 мг/л. Для сорта Геракл максимальная частота ризогенеза достигнута при добавлении в среду 1,0 мг/л ИМК (рис. 41). Число корней на укорененный микрочеренок при увеличении концентрации ауксина в среде возрастает или остается примерно на одном

уровне (рис. 42). При этом на средах с более низкой концентрацией ауксина корни росли быстрее. По сравнению с другими представителями рода *Rubus* на микрочеренках малины образуется сравнительно небольшое число корней: от 1,4 до 2,4 шт. на безгормональных средах и от 2,6 до 4,5 шт. на средах с ауксином. Качество корневой системы у малины было схожим на средах с ИМК и ИУК (рис. 43).

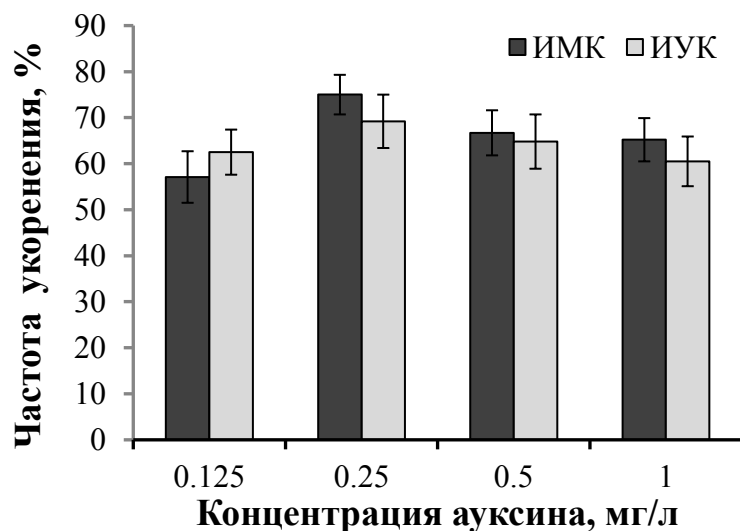


Рисунок 38 - Эффективность укоренения ремонтантной малины (сорт Бриллиантовая) на средах с разными ауксинами

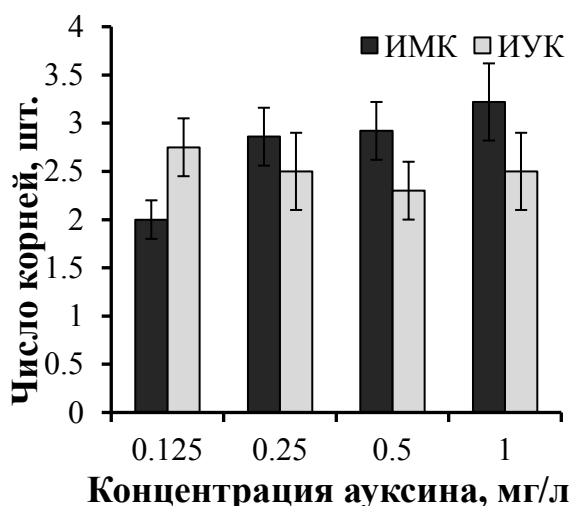


Рисунок 39 - Интенсивность образования корней на микрочеренках ремонтантной малины (сорт Бриллиантовая) на среде MS_{УК}

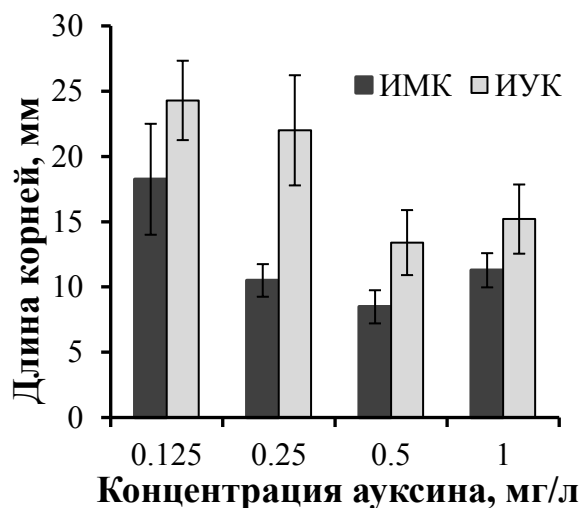


Рисунок 40 - Влияние типа и концентрации ауксина на рост корней малины (сорт Бриллиантовая) на среде MS_{УК}

Таким образом, при правильно подобранных условиях укоренения микрочеренков формируются хорошо развитые микрорастения с крепкими побегами и мочковатой корневой системой.

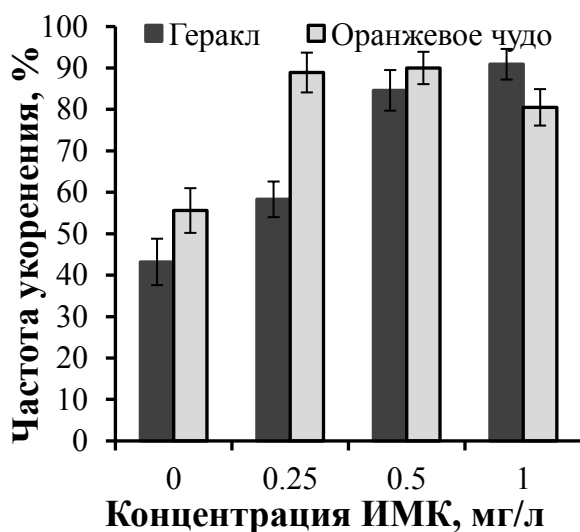


Рисунок 41 - Частота ризогенеза ремонтантной малины на средах с ИМК

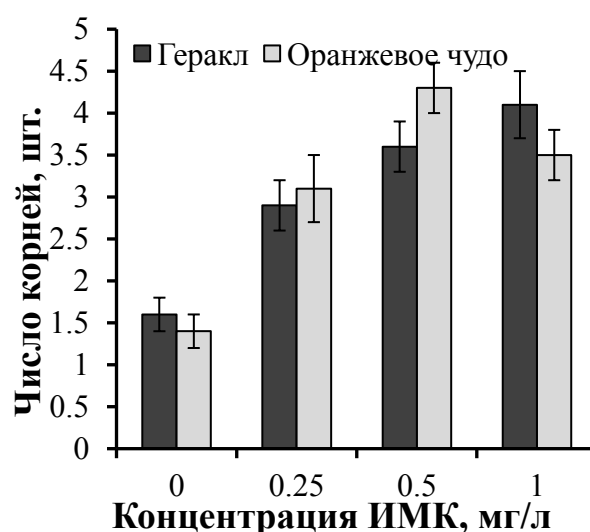


Рисунок 42 - Интенсивность образования корней на микрочеренках ремонтантной малины



Рисунок 43 - Развитие корневой системы у малины Оранжевое чудо на среде QL_{ук} слева - ИМК – 0, 5 мг/л, справа - 0,5 мг/л ИУК

При выборе оптимальных условий корнеобразования старались добиться образования мочки корней при незначительном образовании каллуса

Обобщая полученные результаты можно сделать следующее заключение. Ежевика в условиях *in vitro* укореняется и на безгормональных средах, но для 100%-ного укоренения микрочеренков и оптимального

развития корневой системы рекомендуется добавить в среду ризогенеза ИМК в концентрации 0,25-0,5 мг/л или НУК в концентрации 0,125- 0,25 мг/л.

Для укоренения микрочеренков ежемалиновых гибридов можно успешно применять ИМК, ИУК, НУК. Частота укоренения на средах с ауксинами при оптимальной концентрации каждого составляет 84,8-100%. Наибольшее число корней на укорененный микрочеренок образуется на средах с ИМК и количество их растет с повышением концентрации этого ауксина в питательной среде.

Ремонтантная малина на безгормональных средах ризогенеза укореняется на 40,2-60,5% в зависимости от генотипа. На средах с ауксинами процесс формирования корней проходит быстрее и возрастает число корней на укорененный микрочеренок. Частота ризогенеза сорта Бриллиантовая 57,1-75,0% на средах с ИМК и 60,5 - 69,2 % на средах с ИУК. Для сорта Геракл максимальная эффективность ризогенеза достигнута на среде с 1,0 мг/л ИМК (90,9%). Число корней на укорененный микрочеренок при увеличении концентрации ауксина в среде возрастает от 2,6 до 4,5 шт, при этом на средах с более низкой концентрацией ауксина корни растут быстрее.

3.3 Влияние спектрального состава света на эффективность размножения, ризогенеза и роста микропобегов ягодных культур рода *Rubus*

Современные светодиодные светильники позволяют сформировать сложные спектры освещения растений. Светодиодные энергосберегающие лампы для растений, разработанные для продления светового дня, имеют особый спектр излучения с преобладанием синего и красного цветов, способствующий фотохимическим процессам (Воскресенская, 1975; Константинова и др., 1998; Карначук, Гвоздева, 1998; Белоус и др., 2012; Маркова, Сомова, 2016; 2017; Евлаков и др., 2020; Nhut et al., 2000; Lian et al., 2002; Edesi et al., 2014; Al-Mayahi, 2016; Gupta, Agarwal, 2017) и могут

заменить лампы накаливания и линейные люминесцентных лампы, обычно используемые для дополнительного освещения растений.

В наших исследованиях в первой серии опытов, проведенных с использованием фитотеллажа производства ООО «Интеграл» при интенсивности освещения 2600-3000 лк на этапе микроразмножения побегов не было получено однозначных результатов при использовании светодиодных светильников с разным спектром света. Растения ежевики сорта Блэк Сэтин хорошо развивались практически при всех вариантах освещения с достаточным коэффициентом размножения. Во втором и третьем варианте опыта при светодиодном освещении коэффициент размножения этого сорта достоверно превышал контроль 1 (белые люминесцентные лампы). Микропобеги были хорошо развиты и имели насыщенно зеленые листья. Эффективность размножения в первом и четвертом варианте опыта со светодиодным освещением была на уровне контроля 2 (белые люминесцентные лампы + красная фитолампа) (рис. 44). В то время как коэффициент размножения ежевики сорта Логан Торнлесс был максимальным в контроле с белыми люминесцентными лампами (рис. 44).

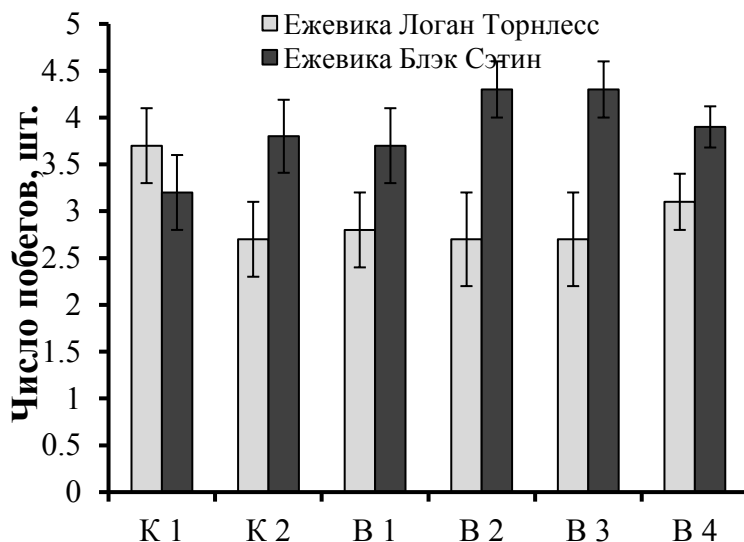


Рисунок 44 - Влияние спектрального состава света на эффективность размножения ягодных культур (1 учет)

Как следует из полученных при учете длины образовавшихся побегов результатов, использование светодиодных светильников в целом замедляло

рост побегов. Средняя длина побегов ежевики была ниже в вариантах со светодиодным освещением по сравнению с контролем 1 (рис. 45). Добавление красного света к белым люминесцентным лампам также снижало длину побегов. Максимальное замедление роста побегов получено в третьем (0,9 см) и четвертом варианте (1,1 см) на ежевике сорта Логан Торнлесс (контроль 1 – 1,9 см, контроль 2 – 1,4 см). На замедление роста побегов под действием синего света указывали и другие авторы. Подобный эффект наблюдали при укоренении микрочеренков жимолости синей сорта Нимфа (Несмелова и др., 2015). Лучшим по качеству побегов при светодиодном освещении является 4 вариант «камера 4 - мультиспектр» (рис. 46). При освещении только синим и красным светом несколько нарушалась пигментация листьев.

Полученные данные говорят о том, что все варианты освещения можно использовать на этапе микроразмножения побегов, однако, в целом нет преимущества (без учета экономической составляющей) светодиодного освещения растений перед люминесцентными лампами.

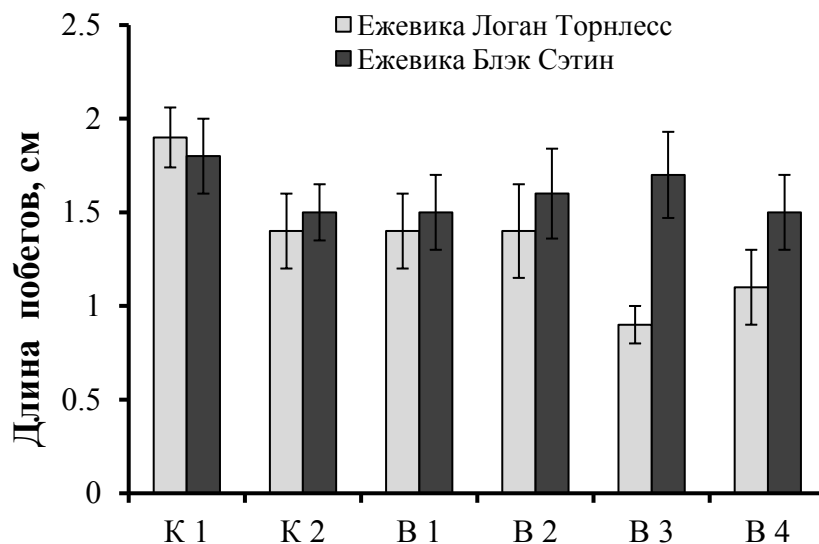
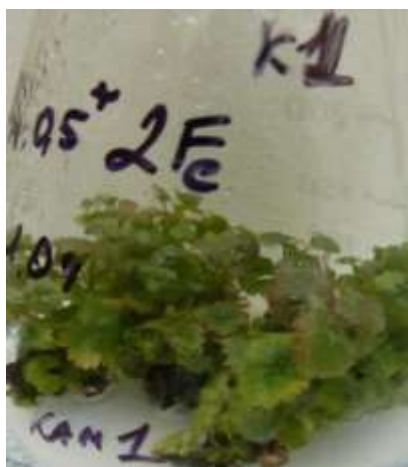


Рисунок 45 - Влияние спектрального состава света на рост микропобегов ягодных культур



Вариант 1



Вариант 2



Вариант 3

Вариант 4
(мультиспектр)Контроль 1 (только
белые)Контроль (белые + 1
красная)

Рисунок 46 - Влияние спектрального состава света на рост и развитие микропобегов ежевики Логан Торнлесс на среде MSm с 0,5 мг/л 6-БАП

Использование светодиодных облучателей с разным спектральным составом света на этапе ризогенеза достаточно существенно влияло на эффективность укоренения микрочеренков и рост корней и побегов.

Процесс ризогенеза у всех культур проходил быстрее всего в контроле 2 при использовании люминесцентных ламп белого в сочетании с красным светом (рис. 47). В то же время по сравнению со стандартным контролем (люминесцентные лампы OSRAM L36W/765 Cool Daylight холодного белого света) светодиодное освещение с добавлением синего и красного спектра существенно ускоряло процесс ризогенеза у ремонтантной малины и ежевики

Логан Торнлесс (рис. 47). Результаты, полученные на другом сорте ежевики Блэк Сэтин не были столь однозначными.

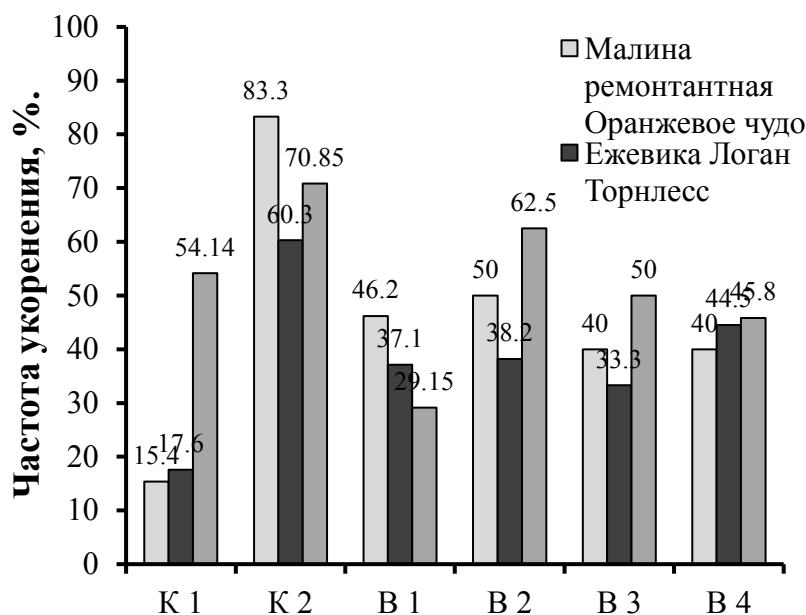


Рисунок 47 - Влияние спектрального состава света на эффективность укоренения ягодных культур (1 учет)

Итоговая максимальная частота укоренения ремонтантной малины также была получена при использовании люминесцентных ламп белого в сочетании с красным светом: вариант 1 – 46,2%, вариант 2 - 75,0%, вариант 3- 50,0%, вариант 4- 60,0%, Контроль 1 (только белые) – 69,2%, Контроль 2 (белые + 1 красная) - 90,9% (рис. 48).

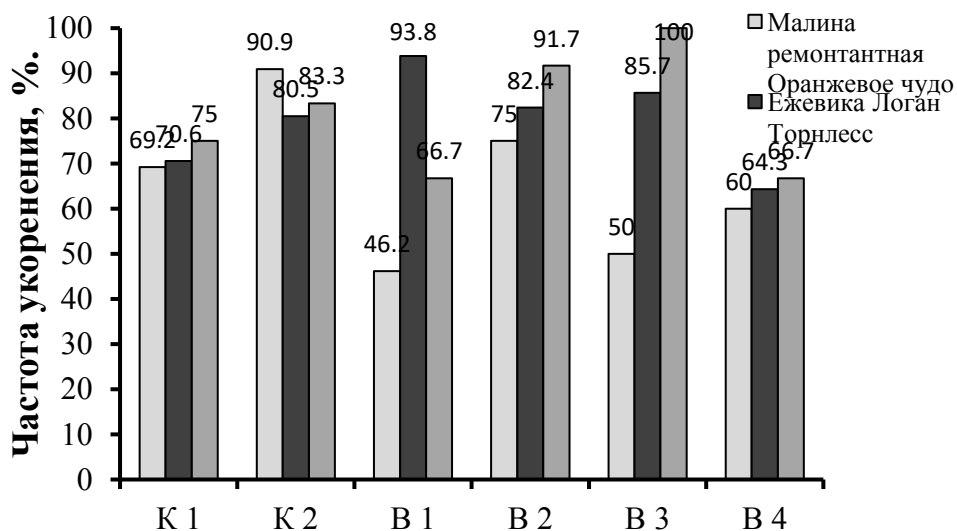


Рисунок 48 - Влияние спектрального состава света на эффективность укоренения ягодных культур (итоговый учет)

В то время как максимальное число укорененных побегов ежевики было получено при использовании светодиодных светильников. Итоговая частота укоренения ежевики Логан Торнлесс составила: вариант 1 – 93,8%, вариант 2- 82,4%, вариант 3 - 85,7%, вариант 4- 64,3%, Контроль 1 (только белые) – 70,6%, Контроль 2 (белые + 1 красная) - 60,0%.

Итоговая частота укоренение ежевики Блэк Сэтин: вариант 1 – 56,7%, вариант 2- 91,7%, вариант 3- 100 %, вариант 4- 66,7%, Контроль 1 (только белые) – 75,0%, Контроль 2 (белые + 1 красная) - 83,3%. Вариант 4 был худшим для всех изучаемых культур, дав минимальную частоту укоренения (рис. 48).

Не было выявлено четких закономерностей влияния светодиодных светильников на качество сформированной корневой системы. Минимальное число корней на микрочеренках малины ремонтантной сформировалось в 1 варианте опыта (таблица 9). У ежевики Логан Торнлесс минимальное число корней на микрочеренков было получено в 3 варианте (таблица 10). Во всех остальных вариантах разница с контролем была статистически не достоверна. Корни в целом быстрее росли при светодиодном освещении.

Таблица 9 - Эффективность ризогенеза микрочеренков ремонтантной малины сорта Оранжевое чудо в зависимости от типа освещения

Вариант опыта	Частота укоренения, %	Число корней, шт.	Длина корней, см	Длина побегов, см.
Контроль 1	69,2	2,5±0,4	1,7±0,3	4,9±0,3
Контроль 2	90,9	2,6±0,3	3,0±0,9	3,9±0,5
Вариант 1	46,2	1,8±0,4	6,3±0,5	3,6±0,3
Вариант 2	75,0	2,4±0,3	2,2±0,3	3,1±0,3
Вариант 3	50,0	2,8±0,4	2,9±0,4	4,2±0,6
Вариант 4	65,0	2,4±0,4	3,9 ±0,6	5,1±0,5

При культивировании ягодных культур на полках с различным освещением анализировали биометрические показатели побегов (длина побега, длина междоузлий, число листьев, длина и ширина листовых пластинок).

Таблица 10 - Эффективность ризогенеза микрочеренков ежевики сорта Логан Торнлесс в зависимости от типа освещения

Вариант опыта	Частота укоренения, %	Число корней, шт.	Длина корней, см	Длина побегов, см
Контроль 1	70,6	3,0±0,4	1,7±0,2	3,8±0,3
Контроль 2	80,5	2,6±0,3	1,8±0,2	7,9±0,5
Вариант 1	93,8	3,1±0,5	2,8±0,3	6,1±0,4
Вариант 2	82,4	3,3±0,6	2,0±0,2	6,0±0,3
Вариант 3	85,7	1,4±0,4	2,2±0,2	7,6±0,6
Вариант 4	64,3	2,8±0,3	2,3 ±0,3	5,7±0,5

В наших исследованиях облиственность микрорастений (количество листьев) в опытных вариантах была на уровне контрольного варианта или была незначительно меньше контроля, при этом листовые пластинки были более темного цвета и могли быть немного скручены (рис. 49, 50).



Рисунок 49 - Микрорастения ежевики (сорт Блэк Сэтин) укорененные при освещении люминесцентными лампами



Рисунок 50 - Микрорастения ежевики (сорт Блэк Сэтин) укорененные при освещении светодиодами

Во второй серии экспериментов, проведенных на стеллаже производства ООО «ЭЛСИС БелГУ», использовано семь вариантов освещения с различным спектральным составом света. Спектральные кривые используемых источников искусственного освещения существенно различаются. Люминесцентные лампы OSRAM L36W/765 Cool Daylight (контроль 1) и светодиодные (LED) лампы общего назначения FERON LB-213 18W (контроль 2) дают холодный оттенок белого света. Их спектральные кривые имеют полимодальный характер. Один локальный максимум в области синей области спектра – 436 нм у люминесцентных ламп и 448 нм – у светодиодных и другой в диапазоне 480-640 нм. Интенсивность излучения используемых контрольных моделей ламп не превышает 120 мВт/м².

Спектральные кривые источников искусственного освещения в опытных вариантах – одномодальная с локальным максимумом в области синей области спектра в 3 варианте, двумодальная с локальными максимумами в синей и красной области спектра – в остальных вариантах, из них 2 вариант с ярко выраженным максимумом в красной области спектра (660 нм) (рис. 51).

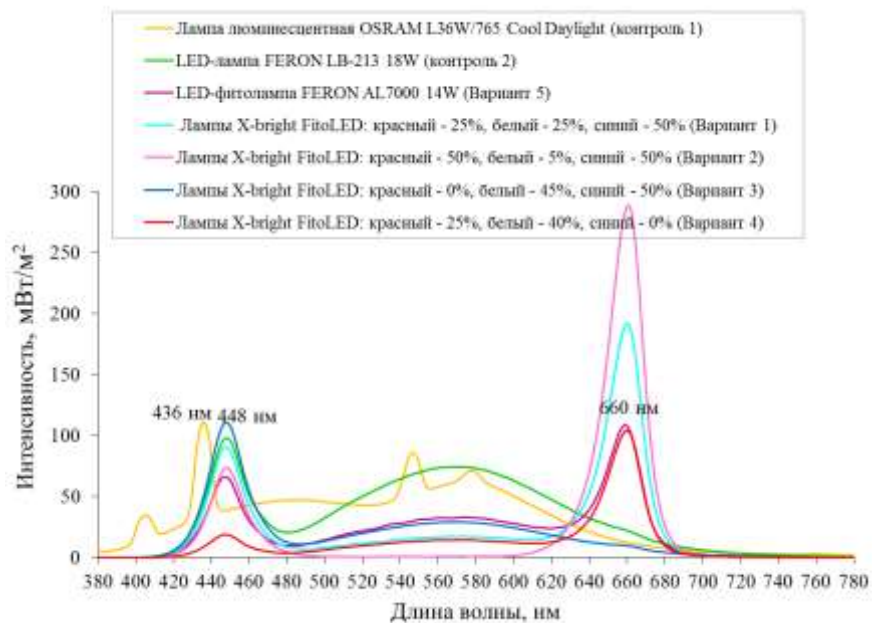


Рисунок 51- Спектральные кривые источников искусственного освещения при клональном микроразмножении нетрадиционных ягодных культур в условиях *in vitro*

Результаты наших исследований показали существенное влияние спектрального состава освещения на процесс ризогенеза микрочеренков ягодных культур.

Процесс образования корней на микрочеренках проходил намного быстрее в опытных вариантах при использовании светодиодов. Например, через две недели культивирования частота укоренения ежевики сорта Навахо в опытных вариантах была от 28,6 до 61,4%, тогда как в контрольных – 16,7 и 20,0%. Быстрее всего микрочеренки укоренялись при преобладании в освещении синей (400-500 нм) и красной (620-680 нм) областей спектра.

Подобные результаты были получены и на сорте ежевики Дирксен Торнлесс (рис. 52). Частота укоренения этого сорта после двух недель культивирования микрочеренков на среде укоренения в среднем в 6 раз превышала контрольные значения во втором варианте опыта и в 8 раз в пятом варианте опыта. Освещение белым светом с добавлением красного и синего позволило в лучших вариантах опыта в несколько раз увеличить число корней на укорененный микрочеренок и ускорить их рост. Особенно многочисленные корни образовались у ежевики сорта Навахо (рис. 53, 54).

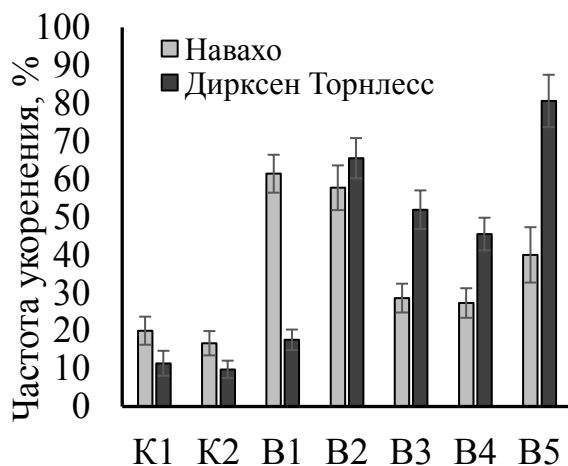


Рисунок 52 - Влияние спектрального состава света на эффективность укоренения ежевики на среде $QL_{ук}$ с 0,5 мг/л ИМК через 2 недели культивирования

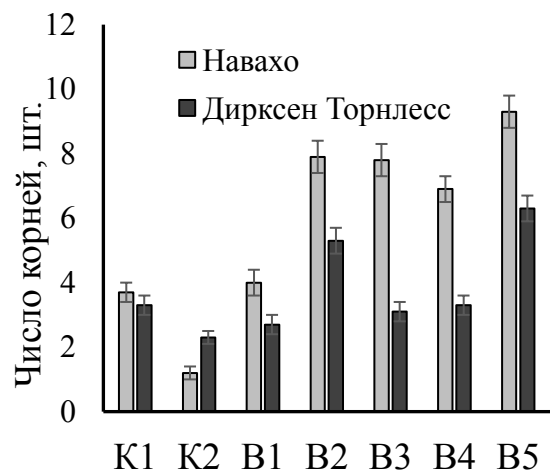


Рисунок 53 - Влияние спектрального состава света на образование корней на микрочеренках ежевики на среде $QL_{ук}$ с 0,5 мг/л ИМК через 6 недель культивирования

С течением времени количество микрочеренков образовавших корни в контрольных и опытных вариантах выравнилось. Однако, использование светодиодных облучателей с комбинированным спектральным составом света заметно улучшило качество микрорастений. В опытных вариантах биометрические показатели микрорастений существенно различались (таблица 11, 12).

Таблица 11 - Влияние спектрального состава света на эффективность ризогенеза ежевики сорта Навахо на среде $QL_{ук}$ с 0,5 мг/л ИМК

Вариант опыта	Частота укоренения, %		Число корней, шт.	Длина корней, см	Длина побегов, см	Число листьев, шт.
	2 недели	6 недель				
Контроль 1	20,0	87,2	2,9 ±0,4	4,4±0,4	3,0 ±0,2	7,7±0,4
Контроль 2	16,7	66,7	2,4 ±0,4	3,5±0,4	2,7 ±0,1	7,6±0,4
1	61,4	93,5	4,0±0,4	4,7±0,4	2,3 ±0,1	6,9±0,5
2	57,7	92,6	6,9±0,5	5,7±0,3	3,0±0,2	7,9±0,4
3	28,6	66,7	5,8±0,2	5,6±0,4	2,7 ±0,2	7,4±0,4
4	27,3	77,1	3,5±0,6	5,6±0,4	2,9 ±0,2	9,2±0,5
5	40,0	80,0	6,3±0,5	4,4±0,4	2,9 ±0,2	7,2±0,3

Под светодиодами сформировались более крепкие микрорастения с хорошо развитой корневой системой (рис. 55). Прирост побегов у ежевики Навахо в опытных вариантах был на уровне контроля, у ежевики Дирксен Торнлесс в большинстве случаев в опытных вариантах побеги были длиннее. Исключение первый вариант с преобладание синего спектра света. На замедление роста побегов под действием синего света указывали и другие авторы (Протасова, 1982; Несмелова и др., 2015). Облиственность микрорастений (количество листьев) в опытных вариантах была на уровне контрольного варианта или была несколько выше контроля, при этом листовые пластинки были более крупного размера.

Таблица 12 - Влияние спектрального состава света на эффективность ризогенеза ежевики сорта Дирксен Торнлесс на среде QL_{ук} с 0,5 мг/л ИМК

Вариант опыта	Частота укоренения, %		Число корней, шт.	Длина корней, см	Длина побегов, см	Число листьев, шт.
	2 недели	6 недель				
Контроль 1	11,4	65,0	1,7 ± 0,2	1,9 ± 0,2	2,5 ± 0,1	7,4 ± 0,4
Контроль 2	9,8	57,6	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,2	2,4 ± 0,1	8,4 ± 0,4
1	17,6	65,6	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,2 ± 0,1	6,9 ± 0,2
2	65,5	78,6	5,2 ± 0,5	4,1 ± 0,4	3,1 ± 0,2	8,4 ± 0,2
3	51,9	64,3	2,9 ± 0,3	2,4 ± 0,3	2,8 ± 0,2	8,4 ± 0,3
4	45,5	60,0	2,4 ± 0,4	3,6 ± 0,5	2,8 ± 0,1	7,3 ± 0,2
5	80,6	90,3	6,5 ± 0,5	3,1 ± 0,2	3,9 ± 0,4	6,7 ± 0,3



контроль 2 (СД)



вариант 1



вариант 2



вариант 3



вариант 4



вариант 5

Рисунок 54 - Влияние спектрального состава света на ризогенез ежевики (сорт Навахо)



контроль 1 (люминисцентные лампы)



контроль 2 (СД лампы)



вариант 1



вариант 2



вариант 3



вариант 4



вариант 5

Рисунок 55 - Влияние спектрального состава света на развитие ежевики (сорт Дирксен Торнлесс)

Лучшими по совокупности показателей были второй вариант с равным соотношением синих и красных лучей в спектре и пятый вариант опыта, в котором использовали равное количество специализированных светодиодных фитоламп Feron AL7000 также имеющих красно-синий спектр свечения и белых светодиодных ламп общего назначения. Следует отметить, что без учета экономической составляющей, использование светодиодных белых

ламп общего назначения FERON LB-213 18W не давало преимущества по сравнению с применением белых люминесцентных ламп. В то же время проведенные нами расчеты показывают, что замена люминесцентных ламп на светодиодные в среднем в два раза снижает затраты на электроэнергию и замену ламп, поскольку последние гораздо долговечнее. Кроме того, следует учесть, что у люминесцентных ламп есть существенный недостаток. В их стеклянных трубках находится высокотоксичный металл – ртуть, в парах которого происходит электрический разряд и образуется поток ультрафиолетового излучения. С точки зрения безопасности для окружающей среды и прежде всего здоровья человека, вышедшие из строя, а особенно разбившиеся люминесцентные лампы, нужно сдавать на специальные пункты переработки. Светодиодные светильники в этом плане гораздо безопасней.

3.4 Влияние лазерного облучения на эффективность размножения, ризогенеза и роста микропобегов ягодных культур рода *Rubus*

На этапах размножения и укоренения микрочеренков для стимуляции морфогенетических процессов применяли обработку растений когерентным низкоинтенсивным излучением лазера. Несмотря на то, что стимулировать рост и развитие растений могут источники когерентного излучения почти всей видимой части спектра, оптимальными длинами волн являются те, которые соответствуют максимуму поглощения фитохромов, то есть в спектральном интервале 600...690 нм (Волотовский, 1992). Таким образом, для облучения растений с целью стимуляции их роста, размножения и корнеобразования перспективно использовать гелий-неоновые ($\lambda=632,8$ нм) и красные полупроводниковые лазеры ($\lambda=655$ нм) (Будаговский и др., 2012).

Результаты наших исследований показали, что лазерное облучение может существенно улучшить размножение и рост побегов культивируемых растений. При оптимальных экспозициях облучения коэффициент размножения ягодных культур был существенно выше контроля.

Положительный эффект был в большей степени выражен на культурах, имеющих в контроле более низкий коэффициент размножения (рис. 56).

Сравнение действия гелий-неонового и полупроводникового лазера показало, что стимулирующий эффект может быть достигнут как при использовании гелий-неонового лазера, так и полупроводникового, но нередко при разных экспозициях облучения (рис. 57).

Например, среднее число побегов ежевики сорта Блэк Сэтин на эксплант через месяц культивирования в контроле без облучения составило $3,9 \pm 0,3$, максимальное – 6 побегов на один исходный эксплант, после облучения гелий-неоновым лазером среднее число побегов ежевики на эксплант через месяц культивирования составило $4,4 \pm 0,5$, максимальное – 12 побегов/эксплант при экспозиции 60 с и среднее $4,6 \pm 0,4$, максимальное – 11 побегов/эксплант при экспозиции 120 с. В этих вариантах с облучением не было ни одного экспланта с коэффициентом размножения меньше двух.

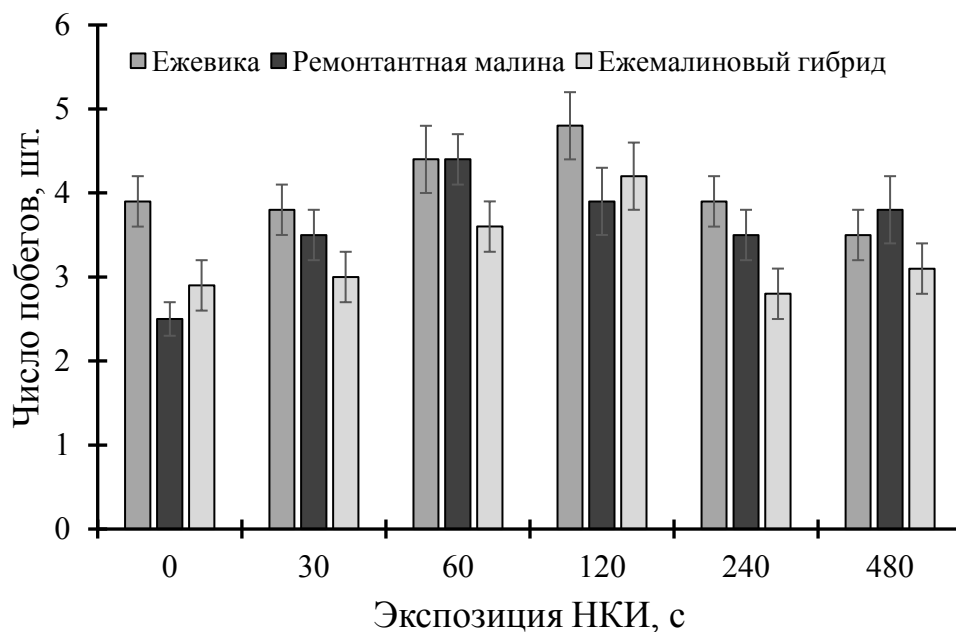
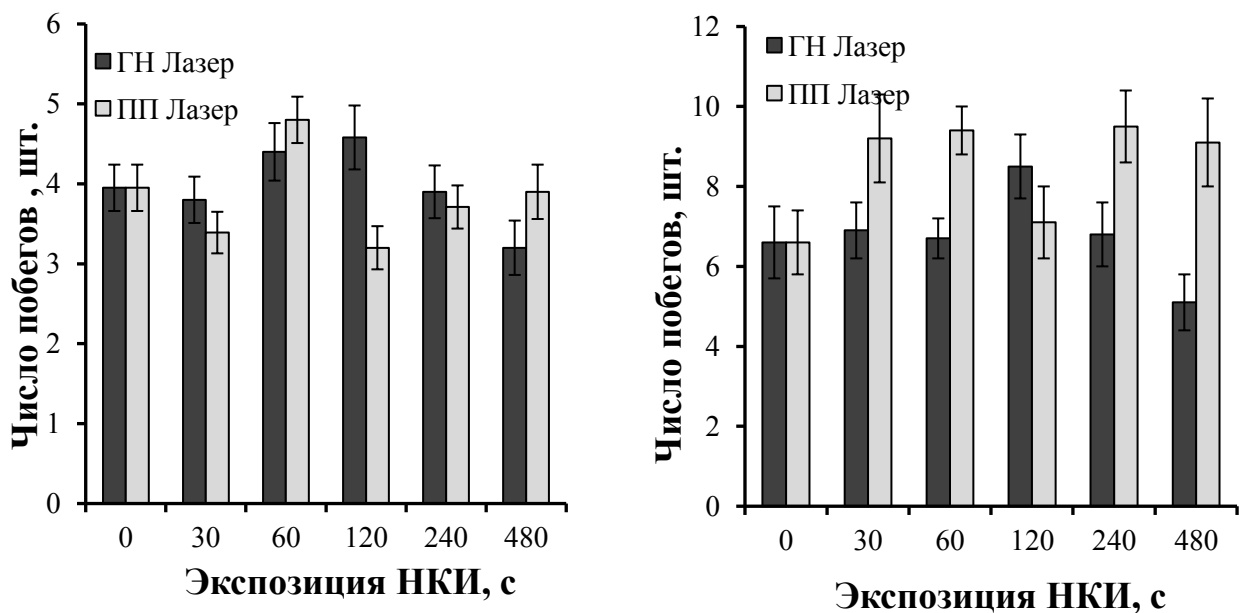


Рисунок 56 - Влияние облучения гелий–неоновым лазером растений рода *Rubus* на эффективность размножения ежевики сорта Трипл Краун, ремонтантной малины сорта Оранжевое чудо, ежемалинового гибрида Тайберри.

После облучения полупроводниковым лазером через месяц культивирования среднее число побегов ежевики на эксплант составило $4,8 \pm 0,3$, максимальное – 7 побегов/эксплант при экспозиции 60 с. Экспозиция облучения 120 с была не эффективна при использовании полупроводникового лазера. В конечном итоге нам удалось повысить коэффициент размножения микропобегов ежевики с 6,9 в контроле до 9,5 в лучших вариантах с лазерным облучением (рис 57 б), что существенно повысило выход полученных микрорастений. При этом эффект облучения гелий-неоновым лазером больше был выражен на начальном этапе культивирования, тогда как воздействие полупроводникового лазера имело выраженный стимуляционный эффект практически при всех экспозициях облучения при более продолжительном периоде культивирования.



а б
Рисунок 57 - Влияние лазерного облучения на эффективность размножения ежевики Блэк сэттин: а – 4 недели культивирования; б- итоговый учет

Степень развития побегов при одинаковых экспозициях облучения также отличалась в зависимости от типа применяемого лазера (рис. 58). Побеги в лучших вариантах опыта были более крепкими, с крупными листьями, без

некротов. В вариантах с лазерным облучением возросло число побегов длиной более 1,5 см., используемых для укоренения. Так, в контроле доля таких побегов у ежевики Блэк Сэтин составляла 46,7% при лазерном облучении от 60,0 до 84,3%.



Рисунок 58 - Рост и развитие микропобегов ежевики (сорт Блэк сэтин) при облучении гелий-неоновым (слева) и полупроводниковым лазером (справа) с экспозицией 60 с

Результаты наших исследований показали, что лазерное облучение микрочеренков может существенно влиять на эффективность ризогенеза и рост побегов культивируемых растений. Эффект лазерного излучения был наиболее выражен при обработке культур с более низким морфогенетическим потенциалом.

Так, существуют определенные трудности на этапе укоренения микрочеренков ремонтантной малины *in vitro*. В целом, процесс укоренения микрочеренков ремонтантной малины достаточно длителен (до двух месяцев). В результате на укорененном микрочеренке образуется 2-4 длинных корня с корешками второго порядка. Поэтому прибегают к различным способам стимуляции ризогенеза, как путем применения препаратов с ауксиновой активностью, биопрепаратов, так и регуляцией спектрального состава света на этапе укоренения (Маркова, Сомова, 2016; Корнацкий, 2017).

В проведенных нами исследованиях применение НКИ в 1,5-2,2 раза повысило эффективность ризогенеза малины ремонтантной сорта Геракл (рис. 59). При применении лазерного облучения процесс образования корней у ремонтантной малины значительно ускорился во всех вариантах опыта. Через шесть недель культивирования в контроле частота укоренения составила всего 34,5%, тогда как при облучении гелий-неоновым лазером от 50,0 (экспозиция 480 с) до 72,9% (экспозиция 60 с), при облучении полупроводниковым лазером от 38,9% (экспозиция 480 с) до 68,6% (экспозиция 240 с). В лучших вариантах опыта увеличилось количество корней на укорененный микрочеренок и корни росли быстрее. Так, средняя длина корней при облучении гелий-неоновым лазером при экспозиции 60 с была 4,7 см, при экспозиции 120 с -4,5 см, при облучении полупроводниковым лазером 4,7 см при экспозициях 60 с и 480 с по сравнению с 3,5 см в необлученном контроле. Практически во всех вариантах опыта длина облученных побегов превышала контроль.

Более мощное развитие корневой системы привело и к более быстрому росту побегов облученных микрорастений уже на этапе укоренения (рис. 60).

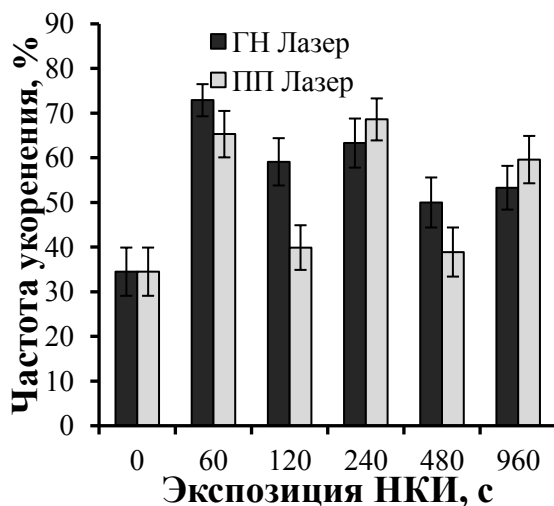


Рисунок 59 - Влияние лазерного облучения на эффективность укоренения ремонтантной малины сорта Геракл

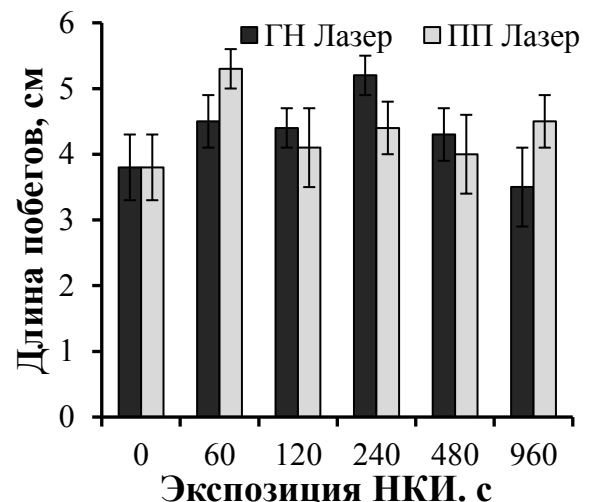


Рисунок 60 - Влияние лазерного облучения на рост побегов ремонтантной малины сорта Геракл

Подобные результаты получены и на других сортах ремонтантной малины и ежемалиновых гибридов. Так, удалось повысить частоту укоренения микрочеренков ремонтантной малины сорта Бриллиантовая на среде MS_{УК} с 1,0 мг/л ИМК с 54,9% в контроле до 84,7% при облучении гелий-неоновым лазером (экспозиция 120 с) и 80,6% (экспозиция 960 с). Число корней на укорененный микрочеренок возросло соответственно с 2,0±0,2 шт. до 2,9±0,3 и 3,0±0,3 шт. соответственно. В лучших вариантах опытов получены хорошо развитые микрорастения ремонтантной малины, которые можно было высаживать в почву на адаптацию.

Частота укоренения ежемалинового гибрида Логанберри через месяц культивирования на среде MS_{УК} с 0,5 мг/л ИМК при 16-ти минутной экспозиции облучения гелий-неоновым лазером составила 46,7%, при 4-х минутной экспозиции облучения полупроводниковым лазером укоренилось 42,1% микрочеренков по сравнению с 27,8% в контроле. Итоговая частота укоренения в лучших вариантах опыта также превысила контроль на 15-20% и достигала 90,9-100%.

Положительный эффект лазерной стимуляции получен и на культурах, отличающихся хорошей способностью к укоренению микрочеренков *in vitro*. Так, частота укоренения ежевики Блэк Сэтин на среде QL_{УК} с 0,5 мг/л ИМК через месяц культивирования при 2-х минутной экспозиции облучения гелий-неоновым лазером составила 72,7% по сравнению с 53,1% в контроле. При облучении полупроводниковым лазером частота укоренения в опытных вариантах была от 69,2 до 80,6% (рис. 61).

Эффект стимуляции достигался как при использовании гелий-неонового лазера, так и полупроводникового, но в каждом случае самыми оптимальными были разные экспозиции облучения. Лазерное облучение существенно повлияло на количественные и качественные показатели ризогенеза. В оптимальных вариантах опыта корневая система облученных растений отличалась значительно лучшим развитием по сравнению с

контрольными растениями. Число корней на укорененное микрорастение возросло в опыте в 1,5-2 раза (рис. 62).

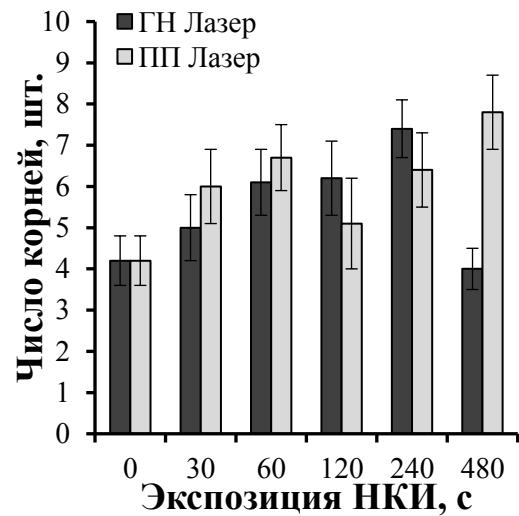
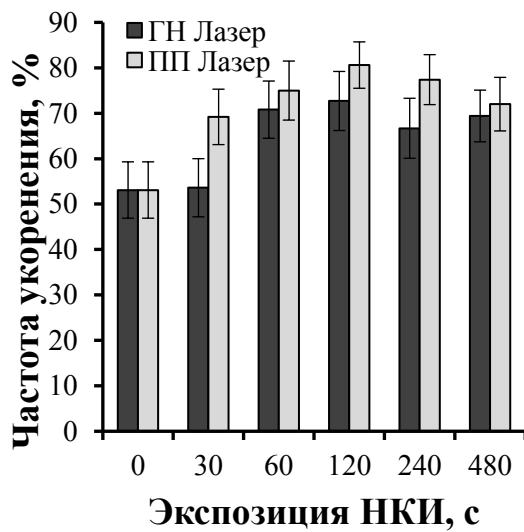


Рисунок 61 - Влияние лазерного облучения на эффективность укоренения ежевики Блэк Сатин

Рисунок 62 - Влияние лазерного облучения на образование корней у ежевики Блэк Сатин



а)



б)

Рисунок 63 – Вегетативное развитие микрорастений ежевики сорта Блэк Сэтин на этапе укоренения после облучения микрочеренков (справа – контроль, слева – гелий-неоновый лазер, экспозиция 240с.): а) развитие побегов; б) образование и рост корней

Полученные нами результаты подтверждают выводы других исследователей о возможности стимулирования морфогенетических процессов в условиях *in vitro* применением низкоинтенсивного когерентного излучения (Будаговский и др., 2012; Муратова и др., 2012, 2016; 2017; 2019; Соловых и др., 2012, 2014).

Таким образом, вызванная лазерной обработкой стимуляция развития корневой системы не только улучшала показатели ризогенеза, но обусловила более интенсивный рост побегов ягодных культур уже на этапе укоренения. При оптимальных параметрах облучения у микрорастений формируется мощная корневая система и хорошо развитые побеги без изменения состава питательной среды только за счет активизации физиологических процессов у самого растения (рис. 63). Это позволяет сократить сроки получения и обеспечить выравненность рассадного и посадочного материала, что является важным условием промышленного производства.

Следует учитывать, что в зависимости от типа используемого лазера при одной и той же экспозиции облучения эффект будет выражен в разной степени. Для определения оптимального режима обработки в каждом случае необходимо использовать различные длительности облучения, не менее 4-6 экспозиций. При этом величина полученного стимуляционного эффекта не имеет линейной зависимости от продолжительности воздействия.

Полученные нами данные подтверждают выводы других исследователей, работающих с лазерным облучением растений, которые ранее показали, что ответная реакция на облучение различной длительности культивируемых *in vitro* растений имеет нелинейный многомодальный характер с максимумами и минимумами стимуляционного эффекта (Муратова и др., 2012; Соловых и др., 2012; 2014; Муратова и др., 2016).

3.5 Адаптация и дорастивание растений рода *Rubus*

3.5.1 Особенности адаптации микрорастений ягодных культур рода

Rubus в условиях защищенного грунта

Заключительным и наиболее ответственным этапом клонального микроразмножения является адаптация микрорастений к нестерильным условиям. Термин адаптация включает в себя несколько параллельно проходящих процессов: адаптацию ассимилирующего аппарата растений к пониженной влажности воздуха, корней к субстрату и адаптацию растений к новой инфекционной нагрузке. Перевод микрорастений в нестерильные условия затруднен по двум основным причинам – слабого контроля самим растением транспирации и их пониженной способностью к фотосинтезу вследствие гетеротрофного способа питания.

Культивирование растений на питательных средах с большим количеством сахаров в условиях высокой влажности и отсутствия солнечной радиации приводит к различным анатомическим и физиологическим нарушениям. По мнению ряда ученых, у растений, культивируемых *in vitro*, нарушен механизм открытия и закрытия устьиц, у листьев отсутствует эпикутикулярный воск, возрастает пористость паренхимы листа и уменьшается число ее слоев (Sutter, Hutzell, 1984). В течение первых 10-14 дней после пересадки устьица пробирочных растений практически не функционируют, и растения активно теряют воду, вследствие чего в условиях *in vivo* происходит быстрое усыхание листьев микрорастений (Brainerd, Fuchigami, 1981). После пересадки в нестерильные условия микрорастения испытывают водный стресс, проявляющийся в обезвоживании тканей и в разрушении мембран, поэтому так важно в первые дни после высадки их в нестерильные условия поддерживать влажность воздуха близкую к 100 %.

Эффективность адаптации зависит от многих факторов: типа субстрата, освещенности, температуры и влажности воздуха, инфекционной нагрузки,

степени развития листового аппарата и корневой системы (Высоцкий, 1998; Корнацкий, 1999; 2001; Батукаев и др., 2011; Деменко, 2011; Sutter, Hutzell, 1984; Preece, 2002).

Как следует из наших наблюдений, наибольшее число прижившихся растений (85-95%) получено, когда на адаптацию высаживались крепкие, развитые побеги длиной 4-6 см с хорошо развитым листовым аппаратом (рис. 64) и мочковатой корневой системой.



Рисунок 64 - Укорененные микрорастения ежемалинового гибрида Тайберри перед высадкой на адаптацию.

Оптимальная температура в теплице для высадки микрорастений +23-25°C. Растения следует высаживать в хорошо пролитый субстрат. Влажность воздуха в теплице в первые две недели должна быть близка к 100%, затем ее постепенно, в течение 10-14 дней, снижают до 50-60%.

В то же время, по нашим наблюдениям, высокая влажность воздуха на начальном этапе адаптации, должна сочетаться с умеренной влажностью субстрата. Поскольку переувлажнение субстрата особенно в сочетании с пониженной температурой (15-20°C) и недостаточной освещенностью крайне опасны для микрорастений. Замокание корней может привести к их отмиранию и последующей гибели растений.

Такой эффект мы наблюдали при высадке растений на адаптацию в почву в феврале месяце в пасмурные дни при отсутствии дополнительного

освещения и температуре 18°C. В этом случае при регулярном орошении микрорастений происходило замокание субстрата, в результате растения, или погибали, или переходили в состояние физиологического покоя, из которого не выходили даже при оптимизации температурного и светового режима.

Следовательно, в первые две недели после высадки микрорастений в субстрат следует опрыскивать водой листья растений и поддерживать высокую влажность воздуха в теплице, но поливать субстрат следует не чаще одного-двух раз в неделю.

Следует исключить воздействие прямых солнечных лучей на микрорастения на начальном этапе адаптации, т.к. это может привести к ожогам листьев на которых будут капельки воды. Для затенения микрорастений используются сетчатые ширмы или укрывной материал типа «Спанбонд». В зависимости от длины светового дня в момент высадки микрорастений можно довольствоваться естественным освещением или использовать досветку лампами дневного света. При отрастании новых листьев в нестерильных условиях интенсивность освещения следует увеличивать, доводя постепенно до уровня естественного.

Показателем приживаемости микрорастений является начало роста верхушек побега, которое как правило отмечается через 2-3 недели после высадки микрорастений на адаптацию (Корнацкий, 1996). Активизация апикальных меристем и появление новых листьев свидетельствуют о том, что необходимо снижать уровень влажности в адаптационной системе. Появление новых листьев в условиях *in vivo* резко увеличивает продуктивность фотосинтеза и тем самым снижает стресс, испытываемый микрорастениями после высадки.

Многие авторы отмечают влияние сроков высадки в почву на приживаемость микрорастений. При этом, мнения о лучшем периоде для адаптации расходятся. Регенеранты плодовых культур, высаженные на адаптацию весной хорошо приживались и росли, по сравнению с растениями, высаженными на адаптацию осенью и зимой (Красильникова, 1999). Другие

авторы рекомендуют высаживать микрорастения на адаптацию в период с сентября по март, чтобы избежать выпадов микрорастений в весенне-летний период из-за высокой температуры воздуха в культивационных сооружениях (Вовк, 2000).

Такие расхождения в рекомендациях судя по всему обусловлены прежде всего материально-техническим обеспечением этапа адаптации. Успех перевода растений в новые условия определяется возможностью поддержания требуемой температуры и влажности воздуха в адаптационных помещениях. Не последнюю роль играет возможность их проветривания и наличие достаточного освещения на этапе адаптации.

В нашем случае, поскольку нам надо было вписаться в технологический регламент работы рассадного отделения теплицы, растительный материал активно размножали с октября по декабрь, с января месяца микрочеренки регулярно с периодичностью в месяц высаживали на среды укоренения и через 1,5-2 месяца после этого каждую партию микрорастений высаживали в субстрат.

Из нашего опыта работы следует, что при проведении адаптации в условиях зимних отапливаемых теплиц оптимальным сроком высадки микрорастений в субстрат является вторая половина февраля – апрель (таблица 13, таблица 14). В этот период в теплице устанавливаются оптимальные условия для адаптации и биологические ритмы развития растений совпадают с биологическими ритмами их развития в естественной среде. Для малины ремонтантной хорошие результаты получены также при высадке микрочеренков в сентябре (таблица 15).

Наличие зимних отапливаемых теплиц, где на столах рассадного отделения можно разместить недорогие малогабаритные пленочные парники («теплица в теплице») значительно расширяет временные рамки для прохождения этапа адаптации.

Таблица 13 - Приживаемость и рост микрорастений ежевики Блэк Сэтин в зависимости от сроков высадки на адаптацию через 2 месяца культивирования в кассетах

Срок высадки на адаптацию	Приживаемость микрорастений, %	Доля хорошо развитых растений, %	Высота растений, см	Число побегов, шт.	Число листьев, шт.
11 февраля	87,9	84,3	18,7±1,3	1,1±0,1	11,9±0,4
10 марта	92,0	87,2	20,1±1,8	1,3±0,2	12,8±0,5
12 апреля	96,3	84,6	22,4±2,2	1,2±0,1	13,2±0,6
12 мая	82,7	79,3	19,8±0,9	1,1±0,1	12,6±0,5
13 июня	70,4	64,1	14,3±0,6	1,1±0,1	11,5±0,3
7 июля	72,1	65,8	15,4±0,7	1,2±0,2	12,8±0,4
14 сентября	80,5	63,4	16,7±0,5	1,2±0,1	11,7±0,3
5 октября	76,5	61,9	9,0±0,8	1,1±0,1	10,7±0,3

Таблица 14 - Приживаемость и рост микрорастений ежевики Трипл Краун в зависимости от сроков высадки на адаптацию через 2 месяца культивирования в кассетах

Срок высадки на адаптацию	Приживаемость микрорастений, %	Доля хорошо развитых растений, %	Высота растений, см	Число побегов, шт.	Число листьев, шт.
11 февраля	93,9	94,3	16,5±1,1	1,1±0,1	10,9±0,4
10 марта	96,0	90,2	17,3±1,3	1,2±0,1	11,6±0,5
12 апреля	94,3	93,6	18,1±0,9	1,1±0,1	12,2±0,4
12 мая	84,7	77,2	15,8±1,4	1,0±0,1	10,6±0,3
13 июня	72,4	67,1	13,0±0,8	1,1±0,1	10,1±0,4
7 июля	74,1	66,7	13,4±1,2	1,2±0,2	9,8±0,3
14 сентября	85,7	70,4	10,7±0,6	1,1±0,1	11,3±0,4
5 октября	87,3	65,5	9,7±0,5	1,1±0,1	10,2±0,4

Таблица 15 - Приживаемость и рост микрорастений ремонтантной малины (сорт Геракл) в зависимости от сроков высадки на адаптацию через 2 месяца культивирования в кассетах

Срок высадки на адаптацию	Приживаемость микрорастений, %	Доля хорошо развитых растений, %	Высота растений, см	Число побегов, шт.	Число листьев, шт.
11 февраля	58,7	64,4	9,1±0,4	1,0	6,3±0,3
10 марта	70,0	78,1	11,7±0,4	1,0	7,4±0,5
12 апреля	82,4	85,6	12,3±0,6	1,0	8,2±0,6
12 мая	84,6	89,3	10,5±0,7	1,0	7,6±0,5
13 июня	80,2	90,9	8,3±0,5	1,0	8,1±0,5
7 июля	57,4	55,0	8,8±0,4	1,0	7,5±0,4
14 сентября	75,5	63,7	9,2±0,5	1,0	8,0±0,4
5 октября	63,5	53,4	8,6±0,4	1,0	7,8±0,3

Кроме того, это существенно повышает экономическую эффективность работы самих теплиц, поскольку их можно использовать не только для производства овощей, но и для выращивания посадочного материала ягодных и декоративных культур в тот период, когда в рассадных отделениях нет рассады. При создании требуемого микроклимата и высадке микрорастений в указанные сроки ягодные культуры рода *Rubus* переходят в условия *ex vitro* с высокой частотой (рис. 65, 67) и быстро развиваются (рис. 66, 68). Гибель микрорастений при соблюдении оптимальных условий адаптации составляет не более 5-15%.

Уже через два месяца после высадки в нестерильные условия они были готовы к пересадке в горшки или реализации. Растения, полученные в условиях *in vitro*, отличались хорошо развитой корневой системой (рис. 69), что позволяло им легко приживаться и быстро развиваться при пересадке в горшки (рис. 70).

Дальнейшее развитие растений во многом определялось биологическими особенностями генотипов.



Рисунок 65 - Растения ежевики (сорт Блэк Сэтин) на этапе адаптации (2 недели после высадки)



Рисунок 66 - Растения ежевики (сорт Блэк Сэтин) на этапе адаптации (4 недели после высадки)



Рисунок 67 - Растения ежемалинового гибрида Букингем Тайберри на этапе адаптации



Рисунок 68 - Растения ежемалинового гибрида Тайберри на этапе адаптации



Рисунок 69 - Развитие корневой системы у кассетных растений ежемалинового гибрида Тайберри, полученных на основе адаптированных микрорастений.



Рисунок 70 - Посадочный материал ежемалинового гибрида Тайберри, полученный методами биотехнологии

3.5.2 Влияние субстрата и минеральных добавок на развитие микрорастений на этапе адаптации

При переводе микрорастений в почвенные условия применяют различные технологические приемы, которые способствуют повышению эффективности адаптации. Большое внимание уделяется подбору оптимальных субстратов для адаптации микрорастений, которые должны быть достаточно легкими, рыхлыми, влаго- и воздухопроницаемыми, чтобы обеспечить высокую приживаемость микрорастений и их интенсивный рост и развитие после высадки. При адаптации пробирочных растений используют искусственные субстраты, состоящие из органической основы (кора хвойных пород, торф, компост, льняная костра, почва, древесные опилки) (Цветков, Кръстанова, 1991; Orlikowska, 1988; Росock, 1984) и инертных материалов (песок, вермикулит, минеральная вата, перлит, цеолит) (Дженеев, Литвак, 1990; Wainwright, Scrace, 1989; Youn et al., 1988; Батукаев, Садаева, 2002; Einset, Alexander, 1985; Pierik et al., 1992; Галдина, 2017; Иванова-Ханина, 2018) в разном соотношении компонентов.

Грунт для посадки должен быть легким и свободным от болезней. Для субстрата лучше использовать торф верховой с необходимой кислотностью, освободить его от микроорганизмов можно с помощью термической обработки или применять фунгициды.

Для улучшения физико-химических показателей субстратов используют крупнозернистый песчаник, вермикулит, перлит (Галдина, 2017; Иванова-Ханина, 2018; 2019), а также природный кремнийсодержащий материал – цеолит (Батукаев, 2002).

В наших исследованиях почвогрунты готовили на основе субстрата на основе верхового сфагнового торфа "Агробалт-С". Использовали следующие варианты: 1) субстрат на основе верхового сфагнового торфа (контроль); 2) торф : песок (4:1); 3) торф : перлит (4:1); 4) торф : цеолит (4:1); 5) торф : песок : почва (3 : 1: 1); 6) торф : перлит : почва (3 : 1: 1); 7) торф : цеолит : почва (3 : 1: 1).

Как показали результаты наших исследований, все использованные типы субстратов вполне подходят для адаптации микрорастений ягодных культур. Эффективность адаптации и биометрические показатели адаптированных растений рода *Rubus* имели сходные показатели в разных вариантах опыта (таблица 16, таблица 17).

Большинство включенных в исследования генотипов переходили в нестерильные условия с высокой частотой и хорошо развивались на этапе адаптации, что делает их весьма перспективными культурами для тиражирования методами биотехнологии.

Лучшие результаты получены при использовании комбинированных субстратов. Наиболее активно растения развивались в варианте опыта торф : цеолит : почва (3 : 1: 1). Добавление в верховой торф только речного песка не дало положительного результата.

После того как микрорастения успешно приживались в почве, более интенсивному развитию саженцев способствовали подкормки растений растворами минеральных солей (1 раз в 2 недели).

Таблица 16 - Влияние состава субстрата на эффективность адаптации и вегетативное развитие микрорастений ежевики (сорт Трипл Краун)

Субстрат	Приживаемость растений, %	Высота побегов, см	Масса побегов, г	Масса корней, г
Субстрат на основе торфа "Агробалт-С"	88,8	20,8±0,7	4,7±0,4	6,3±0,4
Торф : песок (4:1)	83,5	17,4±0,8	4,6±0,3	6,2±0,4
Торф : перлит (4:1)	86,4	18,7±0,4	5,3±0,5	6,1±0,4
Торф : цеолит (4:1)	90,4	23,6±1,5	6,2±0,4	7,6±0,6
Торф : песок : почва (3 : 1: 1)	84,6	15,2±0,9	5,6±0,5	6,0±0,4
Торф : перлит : почва (3 : 1: 1)	87,1	19,1±0,6	6,0±0,4	8,1±0,6
Торф : цеолит : почва (3 : 1: 1)	93,1	24,7±1,3	6,4±0,5	8,6±0,5

Для подкормки микрорастений мы использовали разбавленный в 4 раза раствор минеральных солей по прописи Мурасиге-Скуга, питательный раствор с концентрацией 1,5-2 мг, применяемый для выращивания огурца на минераловатном субстрате и комплексное минеральное удобрение (Азофоска, 20 г/10 л раствора). Как следует из полученных нами данных, любой вариант подкормки оказывал благоприятное воздействие на рост и развитие растений, но лучшие результаты получены при использовании минеральной основы среды Мурасиге-Скуга и питательного раствора для выращивания тепличного огурца (таблица 18, 19, рис. 71). В вариантах с подкормкой растения не только быстрее росли, но имели листья насыщенно зеленого цвета.

Таблица 17 - Влияние состава субстрата на эффективность адаптации и вегетативное развитие микрорастений ремонтантной малины (сорт Бриллиантовая)

Субстрат	Приживаемость растений, %	Высота побегов, см	Масса побегов, г	Масса корней, г
Субстрат на основе торфа "Агробалт-С"	78,8	10,8±0,4	4,4±0,4	5,8±0,4
Торф : песок (4:1)	70,5	9,4±0,3	3,6±0,3	5,6±0,3
Торф : перлит (4:1)	77,4	10,6±0,4	3,9±0,5	6,3±0,4
Торф : цеолит (4:1)	81,2	14,7±0,4	5,0±0,4	7,2±0,5
Торф : песок : почва (3 : 1: 1)	80,6	12,2±0,4	4,9±0,4	6,9±0,4
Торф : перлит : почва (3 : 1: 1)	79,2	13,5±0,5	4,3±0,3	7,0±0,4
Торф : цеолит : почва (3 : 1: 1)	84,2	15,3±0,5	5,5±0,4	7,3±0,5

Таблица 18 - Влияние минеральных подкормок на вегетативное развитие микрорастений ежемалинового гибрида Тайберри

Варианты	Среднее число корней, шт.	Средняя длина корней, см	Высота побегов, см	Среднее число листьев, шт.
Контроль (без подкормки)	3,8±0,2	12,6±0,6	11,1±0,4	7,3±0,4
¼ минеральных солей среды МС	5,2±0,3	17,4±0,9	15,3±0,7	8,8±0,5
Питательный раствор для выращивания огурца	5,5±0,4	18,2±1,0	14,8±0,6	8,5±0,5
Азофоска (20 г/10 л раствора)	4,7±0,3	15,2±0,5	13,1±0,6	8,0±0,4

Таблица 19 - Влияние минеральных подкормок на вегетативное развитие микрорастений ежевики Трипл Краун

Варианты	Среднее число корней, шт.	Средняя длина корней, см	Высота побегов, см	Среднее число листьев, шт.
Контроль (без подкормки)	4,2±0,3	11,3±0,4	14,1±0,4	9,3±0,3
¼ минеральных солей среды МС	4,8±0,3	16,4±0,6	17,3±0,9	12,5±0,3
Питательный раствор для выращивания огурца	5,0±0,4	15,2±0,5	16,8±0,7	11,8±0,3
Азофоска (20 г/10 л раствора)	4,4±0,4	14,7±0,5	15,5±0,6	10,0±0,3

Спустя 8 недель ягодные культуры в зависимости от вида вырастают на высоту от 10 до 30 см (рис. 9, рис. 10), после этого их можно высадить в питомник или оставить их в теплице, пересадив в горшки.



Рисунок 71 - Этап адаптации ежемалинового гибрида Тайберри: справа – контроль, слева- подкормка раствором минеральных солей среды МС

3.5.3 Влияние корневых обработок микрорастений бактериальными препаратами на рост и развитие растений на этапе адаптации

Микробиологические удобрения в настоящее время широко используются в органическом земледелии, так как их применение способствует получению экологически чистой продукции и имеет ряд преимуществ по сравнению с минеральными удобрениями (таблица 20).

В наших исследованиях изучали влияние микробиологических удобрений на рост и развитие растений ежевики на этапе адаптации. После того как высаженные на адаптацию микрорастения успешно приживались в торфяном субстрате, более интенсивному развитию ежевики способствовали корневые обработки растений микробиологическими препаратами (таблица 21, таблица 22, рис. 71, 73).

Полученные нами результаты показали, что применение всех выбранных нами препаратов бактериологических удобрений дает положительный эффект. Все варианты обработки оказывали благоприятное воздействие на рост и развитие кассетных растений.

Таблица 20 - Общая характеристика различных видов удобрений

	Минеральные	Органические	Микробиологические
Питание растений	+	+	+
Почвоулучшение	-	+	+
Отрицательные последствия передозировки	+	+	-
Экологичность	-	+/-	+
Подавление фитопатогенной микрофлоры, фунгицидные свойства	-	-	+
Стабильность состава	+	-	+

Таблица 21 - Влияние корневой подкормки микробиологическими удобрениями на рост побегов (см) микрорастений ежевики (сорт Трипл Краун)

Варианты	Адаптация в почвенных условиях, недели			
	2	4	6	8
Контроль (без удобрений)	3,7±0,3	7,4±0,3	9,8±0,4	12,8±0,4
Байкал ЭМ1, 3 мл/1 л воды	5,5±0,3	9,1±0,4	12,2±0,4	16,9±0,4
Азотовит, 3 мл/1 л воды	4,5±0,3	8,2±0,3	11,9±0,3	16,0±0,5
Фосфатовит, 3 мл/1 л воды	3,9±0,2	7,0±0,3	9,9±0,3	14,6±0,4
Пралин-Экстра, 3 мл/1 л воды	3,8±0,3	7,7±0,3	10,7±0,4	15,4±0,5

Таблица 22 - Влияние корневой подкормки микробиологическими удобрениями на массу корней (г) микрорастений ежевики (сорт Трипл Краун)

Варианты	Адаптация в почвенных условиях, недели			
	2	4	6	8
Контроль (без удобрений)	1,7±0,2	2,2±0,3	4,3±0,4	7,1±0,4
Байкал ЭМ1, 3 мл/1 л воды	1,5±0,2	2,4±0,3	4,4±0,3	7,4±0,4
Азотовит, 3 мл/1 л воды	1,9±0,2	3,1±0,4	6,9±0,3	9,8±0,5
Фосфатовит, 3 мл/1 л воды	1,8±0,2	3,3±0,3	6,4±0,3	8,6±0,4
Пралин-Экстра, 3 мл/1 л воды	1,7±0,3	2,9±0,3	6,3±0,3	8,3±0,4

Максимальный прирост побегов ежевики отмечен в варианте подкормки растений бактериальным удобрением Байкал ЭМ1, но развитие корневой системы у этих растений было практически на уровне контроля. В то же время применение биопрепаратов Азотовит, Фосфатовит, Пралин-Экстра способствовало как более активному росту побегов, так и лучшему развитию

корневой системы растений, прежде всего, за счет образования корней второго порядка (таблица 21, таблица 22).

Таким образом, дополнительная обработка микрорастений микробиологическими биопрепаратами на этапе адаптации обеспечивает быстрый и интенсивный начальный рост микрорастений (рис. 72) и хорошее развитие корневой системы (рис. 73). Через два месяца культивирования доля растений с хорошо развитой корневой системой в 1,3-1,6 раза возросла по сравнению с контролем, что дает возможность получить высококачественный посадочный материал в более сжатые сроки и повысить эффективность применяемой технологии.

По совокупности показателей наиболее эффективно применение Азотовита и Фосфатовита.



Рисунок 72 - Развитие микрорастений ежевики (сорт Трипл Краун) на этапе адаптации после корневой подкормки микробиологическим удобрением (азотовит, 30 мл/10 л)

Высокое качество кассетных растений обеспечивает их 100%-ную приживаемость на следующем этапе доращивания и позволяет очень быстро за 1,5-2 месяца после пересадки в горшки получить полноценный посадочный материал.



Рисунок 73 - Развитие корневой системы у микрорастений ежевики (сорт Трипл Краун) на этапе адаптации после корневой подкормки микробиологическим удобрением (фосфатовит, 30 мл/10 л)

Таким образом, применение бактериальных препаратов позволяет и добиться быстрого восстановления всех физиологических функций и ростовых процессов полученные *in vitro* растения в нестерильных условиях.

3.6 Экономическая эффективность клонального микроразмножения растений рода *Rubus*

Применение современной технологии вегетативного размножения позволяет: получить качественный посадочный материал к определенному сроку, достаточно быстро размножить ценный клон растения (сорт); получить в большом количестве вегетативное потомство трудноразмножаемых форм растений; длительно сохранять растительный материал в условиях *in vitro*, а также обменивать его в международном масштабе без риска заражения карантинными вредителями и болезнями; получать растения с измененной ploидностью и трансгенные растения.

Метод клонального микроразмножения считается дорогостоящим и трудоемким. Для проведения биотехнологических работ требуются

специализированные лаборатории с соответствующим оборудованием и высококвалифицированным штатом сотрудников.

Себестоимость и рентабельность производства растений *in vitro* у различных культур будет отличаться. По данным разных авторов, себестоимость укорененного *in vitro* и адаптированного микрорастения, которое будет использовано для доращивания, может варьировать от 10 до 55 рублей в расчете на одно растение. Это связано, с объемом производства, коэффициентом размножения и способностью к укоренению и адаптации конкретного генотипа, затратами на химреактивы и т.д.

Мы провели расчет себестоимости производства 1 растения в уже действующей лаборатории исходя из разработанных нами технологических карт, на примере ремонтантной малины и ежевики. Затраты на строительство производственных помещений, теплиц и на организацию биотехнологической лаборатории не учитывали.

В производственных условиях процесс размножения как правило начинается с массового тиражирования требуемого генотипа, находящегося в коллекции. У ремонтантной малины коэффициент размножения в среднем составляет 4 новых побега за 1 пассаж. Расчёты проводиликратно одной загрузки питательной среды в автоклав. Это в нашем случае 12 л среды, которые можно разлить на 216 колб. При посадке на среду размножения по 7 эксплантов в одну колбу на эту среду высаживаем 1512 растений. С учетом риска 20%, из этих растений, высаженных в колбы на этапе микроразмножения за пассаж мы получим 4838 шт. микрочеренков. Ремонтантная малина укореняется в среднем на 70%, следовательно, к этапу высадки в кассеты мы имеем 3386 шт. укорененных микрорастений. Произведена разбивка статей затрат по этапам проводимых работ (таблица 23).

Эффективность адаптации ремонтантной малины в среднем составляет 75%, следовательно, мы получим 2539 шт. адаптированных микрорастений. Затраты на этапе адаптации микрорастений малины представлены в таблице 24.

Таблица 23 - Затраты на производство ремонтантной малины на этапе микроразмножения и укоренения.

Статьи расходов	На весь объем работ, руб.	На 1 микрорастение, руб.
Тарифный фонд оплаты труда	11568,05	3,06
Начисления на зарплату (30,2%)	3493,55	0,92
Итого оплаты с начислениями	15061,60	3,98
Электроэнергия	3829,35	1,01
Питательная среда	2981,45	0,79
Расходные материалы	4580,00	1,21
Итого	26452,39	7,00

Таблица 24 Затраты на производство ремонтантной малины на этапе адаптации в кассетах на 54 ячейки.

Статьи расходов	На весь объем работ, руб.	На 1 минирастение, руб.
Тарифный фонд оплаты труда	19158,95	6,34
Начисления на зарплату (30,2%)	5786,00	1,91
Итого оплаты с начислениями	24944,95	8,25
Электроэнергия	3907,78	1,29
Питательная среда	2981,45	0,99
Расходные материалы	10254,15	3,39
Итого	16873,59	13,92

Планируемая прибыль на единицу продукции при продаже кассетных растений по цене 45 руб. за 1 шт. составляет в среднем 23 рубля. При дальнейшем доращивании растений в горшочках расходы в пересчете на одно растение составят 17 руб. Себестоимость 1 растения в горшке (1 л) после доращивания в течение 3-4 месяцев составляет в среднем 38 руб. На отечественном рынке стоимость саженца сортовой малины после

доращивания составляет от 100 руб. до 200 руб. за 1 растение. Планируемая прибыль на единицу продукции при продаже растений составляет от 62 до 162 руб.

Большинство сортов ежевики на этапе микроразмножения отличаются высоким коэффициентом размножения, в среднем 8 новых побегов за 1 пассаж. Из расчета емкости автоклава в 12 литров имеем 216 колб питательной среды за одно автоклавирование. В каждую колбу на размножение высаживаем 7 микрорастений, всего высаживаем 1512 растений. При коэффициенте размножения равном 8 в конце этапа микроразмножения получаем теоретически 12096 штук микропобегов, но мы закладываем риски 15%, поэтому к этапу укоренения практический выход составит 10281 шт. микропобегов, которые будут высажены в культуральные сосуды на среды ризогенеза.

На оптимальных средах большинство сортов ежевики укореняется с высокой частотой, не укоренится только около 10% микропобегов, поэтому к моменту высадки укоренных растений в кассеты, т.е. к этапу адаптации получим 9251 микрорастений. Так как работа с таким количеством растений очень трудоёмка, то основная доля в структуре затрат (66%) приходится на оплату труда (таблица 25). При этом на долю затрат по электроэнергии приходится значительная часть расходов – 12%. После высадки микрорастений в кассеты потери на этапе адаптации составят еще в среднем 15%, таким образом, к этапу доращивания останется 7863 шт. растений.

На этапе адаптации микрорастений ежевики происходит увеличение доли расходных материалов в структуре затрат с 13% до 28% за счет приобретения кассет и торфогрунта, при этом доля затрат труда остается высокой и составляет 62% (таблица 26).

При себестоимости кассетного растения ежевики 13 руб. планируемая прибыль на единицу продукции при продаже кассетных растений по цене 45 руб. за 1 шт. составляет в среднем 32 рубля. При дальнейшем доращивании растений в горшочках расходы в пересчете на одно растение ежевики также

составят 17 руб.

Таблица 25 - Затраты на производство ежевики на этапе микроразмножения и укоренения.

Статьи расходов	На весь объем работ, руб.	На 1 микрорастение, руб.
Тарифный фонд оплаты труда	17606,22	1,90
Начисления на зарплату (30.2%)	5317,08	0,57
Итого оплаты с начислениями	22923,30	2,48
Электроэнергия	4175,72	0,45
Питательная среда	2943,33	0,32
Расходные материалы	4580,00	0,50
Итого	34622,35	3,74

Таблица 26 - Затраты на производство ежевики на этапе адаптации в кассетах по 54 ячейки

Статьи расходов	На весь объем работ, руб.	На 1 минирастение, руб.
Тарифный фонд оплаты труда	33640,08	4,28
Начисления на зарплату (30.2%)	10159,31	1,29
Итого оплаты с начислениями	43799,39	5,57
Электроэнергия	4342,30	0,55
Питательная среда	2943,33	0,37
Расходные материалы	19575,85	2,49
Итого	70660,86	8,99

Себестоимость 1 растения в горшке (1 л) после доращивания в течение 3-4 месяцев составит в среднем 30 руб. На отечественном рынке стоимость саженца сортовой ежевики после доращивания составляет от 130 руб. до 280 руб. за 1 растение. Планируемая прибыль на единицу продукции при продаже растений с закрытой корневой системой будет от 100 до 250 руб.

Из полученных данных следует, что чем выше эффективность клонального размножения культуры, тем выше будет рентабельность ее производства (таблица 27).

Таблица 27 - Рентабельность производства посадочного материала ягодных растений на основе метода клонального микроразмножения

Культура	Малина	Ежевика
Рыночная оптовая цена, руб.	100	120
Производственная себестоимость, руб.	38	30
Затраты всего, руб.	96482	235890
Прибыль всего, руб.	157418	707670
Рентабельность производства, %	163	300

Повысить эффективность клонального микроразмножения можно разными путями, в том числе повысив коэффициент размножения, эффективность ризогенеза и адаптации применением биофизических факторов воздействия, таких как низкоинтенсивное когерентное излучение лазера, либо снизив затраты на электроэнергию. Применяя средства фотоники – лазеры и лампы разного спектрального состава можно достичь высоких показателей размножения и развития зеленой массы растений, стимулировать увеличение показателей корнеобразования, регулировать процессы жизнедеятельности растений. Кроме того, перспективность развития светодиодных технологий освещения объясняется интеграцией экологического и технико-экономического эффекта от их применения. Активное применение методов фотоники в области биотехнологии, в частности клонального микроразмножения растений, поможет решить экономические проблемы: достичь экономии затрат на электроэнергию и снизить временные затраты при получении высококачественных саженцев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Генотип растения-донора оказывает существенное влияние на морфогенетический потенциал культивируемых *in vitro* растений и их потребности в освещении. Наиболее активно в культуре размножаются сорта ежевики, наименьшим коэффициентом размножения отличаются сорта ремонтантной малины.

2. Модификация состава питательных сред по источнику кальция (замена хлорида кальция на нитрат) и источнику углерода (замена сахарозы на глюкозу) позволяет повысить коэффициент размножения и увеличить долю побегов более 1,5 см, пригодных для укоренения. На модифицированных питательных средах коэффициент размножения представителей рода *Rubus* повышается в 1,3-1,6 раза.

3. Повышение концентрации 6-БАП в питательной среде способствует увеличению коэффициента размножения растений рода *Rubus*. Увеличение количества микропобегов в конгломератах при повышении концентрации цитокинина в среде коррелирует с уменьшением их средней длины. Максимальное количество побегов хорошо развитых побегов, достигших длины 1,5 см и пригодных для укоренения отмечено в диапазоне концентраций 6-БАП 0,5-1,0 мг/л.

4. Частота укоренения ежемалиновых гибридов на безгормональных средах составляет 61,8-75,8%, на средах с ауксинами – 84,8-100%. Наибольшее число корней на укорененный микрочеренок образуется на средах с ИМК и количество их растет с повышением концентрации этого ауксина в питательной среде.

5. Частота укоренения ремонтантной малины на безгормональных средах укореняется в зависимости от генотипа на 40,2-60,5%. На средах с ауксинами частота ризогенеза возрастает до 75,0-90,9%, процесс формирования корней проходит быстрее и возрастает число корней на укорененный микрочеренок, при этом на средах с более низкой концентрацией ауксина корни растут быстрее.

6. Спектральным состав света существенно влияет на эффективность размножения и укоренения микрочеренков, показатели развития корневой системы, а также рост и морфобиологические параметры растений рода *Rubus*.

7. Использование источников освещения с равным соотношением синих и красных лучей в спектре светом на 10-14 дней ускоряет процесс образования корней, на 25-50% повышает частоту укоренения и в 1,5-3,2 раза увеличивает число корней на укорененное микрорастение.

8. Лазерное облучение гелий-неоновым и полупроводниковым лазерами при оптимальных параметрах в 1,5-2,3 раза повышает эффективность размножения, укоренения и прирост побегов культивируемых растений. При применении НКИ ускоряется процесс ризогенеза и значительно улучшается качество корневой системы у всех изучаемых форм, в том числе и с хорошей способностью к укоренению *in vitro* (ежевика).

9. При адаптации укорененных растений лучшие результаты получены с использованием комбинированных субстратов на основе нейтрального торфа с минеральными добавками. Наиболее высокую активность развития растений показал субстрат «торф: цеолит: почва» (3:1:1).

10. Применение минеральных подкормок и биопрепаратов Азотовит, Фосфатовит, Пралин-Экстра на этапе адаптации способствует более активному росту побегов и лучшему развитию корневой системы растений кассетных растений.

11. Гибель микрорастений рода *Rubus* на этапе адаптации при соблюдении оптимальных условий составляет не более 5-15%.

12. Производство саженцев на основе клонального микроразмножения является экономически эффективным. Прибыль на единицу продукции при реализации кассетных растений составляет от 23 до 32 руб. на 1 растение и от 62 до 250 руб. при реализации растений в горшках после доращивания. Рентабельность производства (без учета затрат на строительство и организацию предприятия) по разным культурам составляет от 150 до 300%.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ

1. Для клонального микроразмножения перспективных сортов ежевики и ежемалиновых гибридов рекомендуется использовать минеральный состав сред Кворина-Лепуавра (Quorin, Lepoivre, 1977), Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962) и DKW (Driver, Kuniyuki, 1984). Для эффективного размножения ремонтантной малины рекомендуется использовать модифицированную среду Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962).

2. Для достижения максимального коэффициента размножения рекомендуется оптимизировать состав питательных сред по источнику кальция (заменить хлорид на нитрат) и источнику углерода (замена сахарозы на глюкозу).

3. В качестве цитокинина при размножении ягодных культур рода *Rubus* рекомендуется применение 6-БАП в концентрации 0,5-1,0 мг/л.

3. Для достижения максимальной частоты ризогенеза и оптимального развития корневой системы ягодных культур рода *Rubus* необходимо добавление в питательные среды ауксина: ИМК в концентрации 0,25-0,5 мг/л или НУК в концентрации 0,25 -0,125 мг/л.

4. Для повышения эффективности укоренения микрочеренков, ускорения процесса ризогенеза и предотвращения чрезмерного вытягивания побегов рекомендуется использование светодиодных светильников с добавлением красного и синего спектра.

5. Для стимуляции процесса ризогенеза эффективно обрабатывать микрочеренки ягодных культур низкоинтенсивным когерентным излучением излучением гелий-неонового лазера ГН – 40 (длина волны 632,8 нм) и полупроводникового HLDPM12-655-10HJ (длина волны 655 нм) с плотностью мощности светового потока 2 Вт/м² и диаметром светового пятна 14 см при различных экспозициях (30, 60, 120, 240, 480, 960 с) на 3-4 сутки после высадки их на среду размножения или укоренения непосредственно в культуральных сосудах лазера.

6. Укоренённые микрорастения рекомендуется высаживать в субстрат на основе нейтрального минерализованного верхового сфагнового торфа марки "Агробалт-С".

7. Оптимальная температура в теплице для высадки микрорастений +23-25⁰С. Растения следует высаживать в хорошо пролитый субстрат. Влажность воздуха в теплице в первые две недели должна быть близка к 100%, затем ее постепенно, в течение 10-14 дней рекомендуется снизить до 50-60%.

8. После того как растению приживется в почве лучшему развитию растений способствуют корневые подкормки растений раствором минеральных солей или микробиологическими удобрениями Азотовитом или Фосфатовитом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдвахитова, А.К. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на процесс мобилизации растительных клеток мака /А.К. Абдвахитова //Тр. Таллинский техн. ун-т. - 1990. – Вып. 715. - С. 79-85.
2. Акимова, С.В. Совершенствование способов подготовки микрорас-тений малины к адаптации. / С.В. Акимова, А.Н. Викулина, И.Н. Буянов, А.П. Глинушкин// Плодоводство и ягодоводство России. – Т. 39. – 2014. – С. 16-19.
3. Аладина, О.Н. Адаптация микрорастений малины [*Rubus* L.] и сирени [*Syringa* L.] к нестерильным условиям/ О.Н. Аладина, С.В. Акимова, С.О. Дубровская, Е.Р. Батрак, С.А. Аладин // Известия ТСХА. 2009. – Вып. 3. - С. 98-110.
4. Амброс, Е.В. Влияние светодиодного и люминесцентного освещений на развитие растений-регенерантов *Fragaria* × *ananassa* Duch. на этапе укоренения *in vitro* / Е.В. Амброс, С.Ю. Толузакова, Т.И. Новикова //Плодоводство и ягодоводство России. 2017.- 48 (2). - С. 18-24.
5. Белоус, О.Г. Effect of spectral composition of light on growth of *Chryzantemum morifolium in vitro* / О.Г. Белоус, В.И. Маляровская, Т.М. Коломиец / Nauka! Studia: Przemysl. 2012. – № 10(55). – P. 30 – 35.
6. Божидай, Т. Н. Анализ генетической стабильности растений голубики сорта Duke, полученных в культуре *in vitro* / Т.Н. Божидай, Н. Н. Волосевич, Н.В. Кухарчик //Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук. – 2016. – Т. 1. – №. 2. – С. 60-63.
7. Будаговский, А.В. Реакция растительных организмов на лазерное облучение различного спектрального состава / А.В. Будаговский, Н.В. Соловых, О.Н. Будаговская, И.А. Будаговский, А. Мищенко, М. Визуерт // Доклады РАСХН. – 2012. – № 5. – С. 21-24.
8. Будаговский, А.В. Теория и практика лазерной обработки растений монография / А.В. Будаговский. - Российская акад. с.-х. наук, Гос.

науч. учреждение Всероссийский науч.-исслед. ин-т генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина. Мичуринск, 2008. - 548 с.

9. Будаговский, А.В. Влияние лазерного облучения на развитие организмов в замкнутых биоценозах / А.В. Будаговский, С.А. Муратова // Биоразнообразиие – от идеи до реализации: тез. межрегион. конф. – Тамбов, 2007. – С. 170–174.

10. Букатый, В.И. Воздействие лазерного излучения на семена сельскохозяйственных культур/ В.И. Букатый, В.П. Карманчиков // В кн. Лазер и урожай: Монография. Барнаул: Изд-во АТУ, 1999. - 58 с.

11. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе/ Р.Г. Бутенко. - М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

12. Вечернина, Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений: монография/ Н.А. Вечернина. - Барнаул, 2004. – 205 с.

13. Вовк В.В. Оптимизация селекционного процесса и ускоренное размножение межвидовых ремонтантных форм малины методом *in vitro*: автореф. дис. ...канд. с.-х. наук: 06.01.05. – Брянск, 2000. – 20 с.

14. Волотовский, И.Д. Фитохром – фоторегуляторный рецептор растений / И.Д. Волотовский. - Минск: Изд-во Наука и техника, 1992. – 166 с.

15. Воскресенская, Н.П. Принципы фоторегулирования метаболизма растений и регуляторное действие красного и синего света // Фоторегуляция метаболизма и морфогенеза растений / Под ред. Курсанова А.Л. и др. – М.: Наука, 1975. - С. 16-36.

16. Высоцкий, В.А. Клональное микроразмножение растений/ В.А. Высоцкий // Культура клеток растений и биотехнология. - М.: Наука, 1986. -С. 91-102.

17. Высоцкий, В.А. Клональное микроразмножение плодовых растений и декоративных кустарников/ В.А. Высоцкий // Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и цветоводстве: Сб. научн. тр. ВНИИС им. И.В. Мичурина. – Мичуринск, 1989. – С. 3-8.

18. Высоцкий, В.А. Особенности клонального микроразмножения некоторых форм ремонтантной малины/ В.А. Высоцкий //Плодоводство и ягодоводство России: Сб. научн. работ/ВСТИСП. - М., 1996.- Т.3.-С.90-95.

19. Высоцкий, В.А. Использование биотехнологических методов при оздоровлении посадочного материала/ В.А. Высоцкий // Актуальные вопросы теории и практики защиты плодовых и ягодных культур от вредных организмов в условиях многоукладности сельского хозяйства: тезисы докладов Всероссийского совещания. - Москва, 1998. – С. 74-76.

20. Высоцкий, В.А. Некоторые итоги и перспективы использования методов культуры изолированных тканей и органов в садоводстве/ В.А. Высоцкий // История, современность и перспективы развития садоводства России: Матер. междунар. конф., Москва, 15-17 ноября 2000 г. – М., 2000. – С. 163-191.

21. Высоцкий, В. А. Клональное микроразмножение жимолости в производственных условиях/ В.А. Высоцкий, В.А. Валиков //Садоводство и виноградарство. – 2014. – №. 6. – С. 18-23.

22. Высоцкий, В. А. Использование препаратов эмистим и экост $\frac{1}{3}$ в технологиях микроклонального размножения ежевики / В. А. Высоцкий, О. В. Карпова, М. М. Янина // Аграрная Россия. – 1999. – № 1(2). – С. 44–46.

23. Гамбург К.З. Ауксины в культурах тканей и клеток растений / К.З. Гамбург. – Новосибирск: Наука, СО, 1990.

24. Гашенко, О. А. Размножение ежевики сорта Стэфан в культуре *in vitro* / О.А. Гашенко, Л.В. Фролова // Плодоводство. - 2019. - Т.31. - С. 144-149.

25. Гашенко, О. А. Результативность микрочеренкования растений-регенерантов ежевики в условиях *ex vitro* / О.А. Гашенко, Н.В. Кухарчик//Плодоводство. – 2022. – Т. 33. – С. 120-124.

26. Гудь, Л. А. Влияние света разного спектрального диапазона на морфогенез ежевики и малины *in vitro* [Электронный ресурс] / Л. А. Гудь, Е. А. Калашникова, И. Г. Тараканов // Лесохоз. информ.: электрон. сетевой журн. – 2019. – № 2. – С. 97–102. URL: <http://lhi.vniilm.ru/>

27. Деменко, В.И. Проблемы и возможности микрклонального размножения садовых растений/ В.И.Деменко// Известия Тимирязевский сельскохозяйственной академии. - М.: Изд-во МСХА. - 2005. - С.48-58.
28. Деменко, В.И. Микрклональное размножение садовых растений: Учебное пособие для студентов по специальности 310300 - "Плодоовощеводство и виноградарство" / В.И. Деменко - Москва: ФГОУ ВПО РГАУ - МСХА, 2007. - 55 с.
29. Деменко, В.И. Укоренение – ключевой этап размножения растений *in vitro* / В.И. Деменко, К.А. Шестибратов, В.Г. Лебедев // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. - 2010. № 1. – С.73-85.
30. Деменко В.И. Адаптация растений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям / В.И. Деменко, В.Г. Лебедев // Известия ТСХА. - М., 2011. – Вып.1. - С. 60 -70.
31. Джигадло Е.Н., Джигадло М.И., Голышкина Л.В. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами. Под ред. Е.Н. Джигадло. /Е.Н. Джигадло, М.И. Джигадло, Л.В. Голышкина – Орёл: ГНУ ВНИИСПК, 2005. – 51с.
32. Джигадло, М.И. Микрклональное размножение и производство посадочного материала плодовых и ягодных культур высших категорий качества / М.И. Джигадло - Саратов, 2003. – С. 108-109.
33. Дорошенко, Н.П. Оптимизация клонального микроразмножения винограда / Н.П. Дорошенко // Биология клеток *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда. - М., 1997. - С. 417.
34. Дударева Л.В. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на процессы роста и развития в растительной ткани: Автореф. дисс... канд. биол. наук. - Иркутск, 2004. - 23 с.
35. Дунаева, С.Е. Образцы ягодных и плодовых культур и их дикорастущих родичей в коллекции *in vitro* ВИР/ С.Е. Дунаева, С.Ю. Орлова,

О.А. Тихонова, Т.А. Гавриленко// Биотехнология и селекция растений, 2018. - Т. 1, № 1. - С. 43–51. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-43-51

36. Запрометов, М.Н. Специализированные функции фенольных соединений в растениях / М.Н. Запрометов // Физиол. раст. – 1993. – Вып. 40, № 6. – С. 921-931.

37. Евлаков, П. М. Воздействие светодиодных и натриевых облучателей на рост и развитие растений, выращенных методом клонального микроразмножения (*in vitro*) / П.М. Евлаков, А.А. Бычков, В.Ю. Заплетин // Вестник ВГУ, Серия: химия. биология. Фармация.- 2020, № 4. - С. 43-49.

38. Евсеева, Р.П. Применение лазерного излучения для повышения функциональной активности плодовых растений в культуре *in vitro* / Р.П. Евсеева //Лазерные технологии в сельском хозяйстве. - М.: Техносфера, 2008. - С. 147-160.

39. Иванникова, Н. С. Генетическая стабильность клонированных *in vitro* орхидных/Н.С.Иванникова //Вестник Российского фонда фундаментальных исследований. – 2012. – №. 1. – С. 158-163.

40. Иванова, Н.Н. Методические основы клонального микроразмножения некоторых декоративных культур /Н.Н. Иванова, И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова // Сборник научных трудов ГНБС. - Том 138. - 2014. – С. 57-101.

41. Иванова-Ханина, Л. В. Оптимизация условий введения малины и ежевики в культуру *in vitro* / Л. В. Иванова-Ханина //Научный журнал КубГАУ, 2014. - №101(07),– С.1-12.

42. Казаков И.В. Ягодные культуры в Центральном регионе России / И.В. Казаков, С.Д. Айтжанова, С.Н. Евдокименко, В.Л. Кулагина Ф.Ф. Сазонов - Брянск: Издательство Брянской ГСХА, 2009 - 208 с.

43. Казаков, И.В. Малина ремонтантная / И.В. Казаков, С.Н. Евдокименко – М.: ВТИСП Россельхозакадемии. -2007- 288 с.

44. Казаков И.В., Заякин В.В., Нам И.Я. Оптимизация метода клонального микроразмножения для ускоренной селекции ремонтантных

форм малины // Использование биотехнологических методов для решения генетико-селекционных проблем: сборник докладов и сообщений XVIII Мичуринских чтений. - Мичуринск, 1998. – С. 16 – 19.

45. Казаков, И.В. Ремонтантная малина в России / Казаков, И.В., Сидельников, А.И., Степанов, В.В. // Челябинск: ООО «НПО «Сад и огород», 2007. – 144 с.

46. Калашникова, Е. А. Клеточная инженерия растений: Учебник и практикум для вузов / Е. А. Калашникова – 2-е издание. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью "Издательство ЮРАЙТ", 2022. – 333 с.

47. Калашникова Е.А., Родин А.Р. Получение посадочного материала древесных, цветочных и травянистых растений с использованием методов клеточной и генной инженерии: Учебное пособие. Издание 2, исп. и доп. – М.: МГУЛ, 2007 – 73 с.

48. Калинин, Ф.Л. Технология микрклонального размножения растений/ Ф.Л.Калинин, Г.П.Кушнир, В.В.Сарнацкая - Киев: Наукова Думка, 1992. -232с.

49. Калинин, Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л.Калинин, В.В.Сарнацкая, В. Е. Полищук - Киев: Наукова Думка, 1980. - 488 с.

50. Капелев, О.И. Влияние лазерного света ЛГИ-21 и ЛГ-56 на каллус и регенерацию у лавандина / О.И. Капелев, В.М. Новикова// Применение низкоэнергетических физических факторов в биологии и сельском хозяйстве. - Киров, 1989. - С. 76-77.

51. Карначук, Р.А. Регуляторное влияние зеленого света на рост и фотосинтез листьев /Р.А. Карначук // Физиология растений. – 1987. – Т. 34, № 4. – С. 765 – 773.

52. Карначук, Р.А. Влияние света на баланс фитогормонов и морфогенез в культуре ткани зародышей пшеницы/Р.А. Карначук, Е. С. Гвоздева// Физиология растений. -1998. - Т. 45, № 2. -С. 289 – 295.

53. Карначук, Р.А. Гормональный статус, рост и фотосинтез растений, выращенных на свету разного спектрального состава/Р.А. Карначук, И.Ф. Головацкая // Физиология растений. - 1998. - Т.45., Вып.6. - С.925-934.
54. Картель, Н.А. Биотехнология в растениеводстве/Н.А. Картель, А.В. Кильчевский – Минск: Тэхналогія, 2005. – 310 с.
55. Катаева Н.В., Аветисов В.А. Клональное размножение в культуре ткани/ Н.В. Катаева, В.А. Аветисов // Культура клеток растений. - М.: Наука, 1981. - С.137-149.
56. Катаева, Н.В. Клональное микроразмножение растений/ Н.В. Катаева, Р.Г.Бутенко. - М., 1983. -96 с.
57. Клоконос Н.П. Культура изолированных тканей ежевики / Н. П. Клоконос //Промышленное производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и цветочно-декоративных культур: материалы междунар. науч. - практ. конф., 20-22 ноября 2001 г. – М., 2001. – С. 105-107.
58. Клоконос, Н. П. Усовершенствование способов получения растений ежевики из изолированных меристематических верхушек / Н. П. Клоконос // Плодоводство и ягодоводство России. – 2004. – Т. XI. – С. 195–199.
59. Кузнецова, И. Б. Влияние росторегулирующих веществ на процесс побегообразования при клональном микроразмножении ежевики / И. Б. Кузнецова, С. С. Макаров, В. М. Дрозд // Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе: сб. ст. 69-й Междунар. науч.-практ. конф., Караваево, 17 янв. 2018 г. / Костромская гос. с.-х. акад.; редкол.: Ю. В. Панкратова, Н. Ю. Парамонова. – Караваево: ГСХА, 2018. – Т. 1: Агробизнес. – С. 69–72.
60. Ковалева, И.С. Применение гумата калия в процессе микроклонального размножения растений декоративных и ягодных культур. / Ковалева, И.С., Рыжова, Н.С. // Докл. ТСХА. – 2007. – Вып. 279. – ч. 1. – С. 557–560.

61. Ковалева, И.С. Усовершенствование методики микроклонального размножения малино–ежевичного гибрида Тайберри / Ковалева, И.С., Данилова, Т.В., Молканова, О.И. // Бюллетень Главного ботанического сада. – 2000. – Вып. 179. – С. 136–143.
62. Константинова Т.Н., Аксенова Н.П., Сергеева Л.И., Чайлахян М.Х. Взаимное влияние света и гормонов на регуляцию морфогенетических процессов в культуре *in vitro*. // Физиология растений. - 1998. - Т. 34, № 4.- С. 795 - 802.
63. Корнацкий, С.А. Комплекс факторов, влияющих на жизнеспособность, рост и развитие микрорастений после культуры *in vitro* / С.А. Корнацкий // Плодоводство и ягодоводство России. – М., 1999. – Т.6. – С. 64–68.
64. Корнацкий С.А. Особенности укоренения *in vitro* микрочеренков ремонтантной малины/ С.А. Корнацкий // Плодоводство и ягодоводство России. М., 2017. -Том XXXXVIII. №1. -С.136-139.
65. Корнацкий С. А., Попкова А. А., Семенов А. Ж. Новая стратегия в микроразмножении ремонтантной малины //Селекция и сорторазведение садовых культур. – 2018. – Т. 5. – №. 1. – С. 50-52.
66. Корначук, Р.А. Гормональный статус, рост и фотосинтез растений, выращенных на свету разного спектрального состава/ Р.А. Корначук, И.Ф. Головацкая // Физиология растений. -1998.- Т.45., Вып.6.-С.925-934.
67. Кульханова Д. С., Плаксина Т. В., Бородулина И. Д. Размножение *in vitro* ремонтантных сортов малины //Известия Алтайского государственного университета. – 2012. – Т. 2. – №. 3. – С. 42-45.
68. Макаров, С. С. Влияние минерально-витаминного комплекса на клональное микроразмножение ежевики / С. С. Макаров // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова. – 2019. – № 1(54). – С. 115-119.
69. Макаров С.С., Кузнецова И.Б. Влияние регуляторов роста при клональном микроразмножении ежевики// Лесохоз. информ. электрон.

сетевой журн. [Электронный ресурс] – 2017. – № 4. –С. 46–51. URL: <http://lhi.vniilm.ru/>.

70. Малаева, Е. В. Биотехнологические и экономические аспекты клонального микроразмножения ремонтантной малины/ Е.В. Малаева, О.И. Молканова//Плодоводство и ягодоводство России. – 2017. – Т. 48. – №. 2. – С. 183-189.

71. Маляровская В.И. Влияние спектрального состава света на рост и развитие *Lilium caucasicum* в условиях культуры *in vitro* Научный журнал КубГАУ, 2013. - №94(10). - С.1-11. <http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/12.pdf>

72. Маркова М.Г., Несмелова Н.П., Сомова Е.Н. Использование светодиодных облучательных установок в клональном микроразмножении ягодных кустарников // Инновационные технологии возделывания сельскохозяйственных культур – основа ведения растениеводства в современных условиях: материалы Всерос. науч.-практ. конф., 24-25 июня 2014 г. / Удмуртский НИИСХ. – Ижевск, 2014. – С. 141-145.

73. Маркова, М.Г. Повышение клонального микроразмножения ремонтантной малины/ М.Г. Маркова, Е.Н. Сомова //Вестник НГАУ, 2016 - 2(39). - С. 30-35.

74. Маркова, М.Г. Совершенствование этапа укоренения в клональном микроразмножении малины / М.Г. Маркова, Е.Н. Сомова // Вестник Марийского государственного университета. Серия «Сельскохозяйственные науки. Экономические науки». 2016. - Т.2. №2(6). - С.37-40.

75. Маркова, М.Г. Приемы повышения укореняемости микропобегов земляники садовой в культуре *in vitro*/ М.Г. Маркова, Е.Н. Сомова // Вестник Марийского государственного университета. Серия «Сельскохозяйственные науки. Экономические науки». 2017. - Т.3.- № 2(10). - С. 34–38.

76. Матушкина, О.В. Особенности клонального микроразмножения ягодных культур / Матушкина, О.В., Пронина, И.Н. // Пути интенсификации

садоводства и селекция плодовых и ягодных культур. – Тула: Приокское книжное издательство, 1989. – С. 167–170.

77. Митрофанова И.В. Микрклональное размножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) / И.В. Митрофанова // Тр. Никит. бот. сада. — 1997. — Т. 119. — С. 63—95.

78. Молканова О.И. Биотехнологические и молекулярно-генетические методы для сохранения и воспроизводства полезных и редких видов растений / О.И. Молканова, О.Г. Васильева, Н.А. Мамаева, Е.М. Ветчинкина, Т.Ю. Коновалова // История науки и техники. - 2010. - № 5.- С. 74-79.

79. Молканова, О.И. Особенности размножения и сохранения коллекции ценных и редких видов растений в условиях *in vitro* / О.И. Молканова, Л.Н. Коновалова, Т.С. Стахеева // Бюллетень ГНБС. г. Ялта. - Вып. 120. – 2016. – С. 17-23.

80. Молканова, О.И. Применение биотехнологических методов для сохранения генофонда редких видов растений/ О.И. Молканова, Ю.Н. Горбунов, И.В. Ширнина, Д.А. Егорова // Ботанический журнал. - 2020. - Т. 105, № 6.- С. 610-619.

81. Мороз Д.С. Шпак М.Ю., Петровская Е.А., Медведик С.Е. Особенности адаптации меристемных растений земляники садовой *Fragaria × ananassa* Duch. в условиях светодиодного освещения// Вестник БарГУ. Сер. Биологические науки (Общая биология). Сельскохозяйственные науки (агрономия: ежеквартальный научно-практический журнал. – 2019. – Вып. 7. – С.73-83.

82. Мохаммед, А.И. Сортвые особенности клонального микроразмножения малины красной/ А.И. Мохаммед, Р.Г. Бутенко//Физиология растений -1998. - №5 - С.738-740.

83. Муратова С.А., Янковская М.Б., Соловых Н.В., Тюленев В.М. Размножение ягодных культур *in vitro* // Плодоводство: науч. тр. / Институт плововодства НАН Беларуси. – Самохваловичи, 2004. – Т. 15. – С. 232–236.

84. Муратова С. А., Субботина Н. С., Мелихов И. Д., Будаговский А. В. Применение методов биофотоники при клональном микроразмножении ягодных культур // Ботанические сады в XXI веке: сохранение биоразнообразия, стратегия развития и инновационные решения: сборник научных материалов II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 20- летию образования Ботанического сада НИУ «БелГУ» - Белгород: ИД «Белгород» НИУ «БелГУ», 2019 – С.182 -185.

85. Муратова, С.А. Оптимизация методов клонального микроразмножения садовых культур / С.А. Муратова, М.Б. Янковская, Н.В. Соловых, Д.Г. Шорников, А.В. Будаговский, Р.В. Папихин // Плодоводство и ягодоводство России. – 2011. – Т. 26. – С. 375–382.

86. Муратова, С.А. Особенности введения в культуру *in vitro* плодовых и ягодных растений / С.А. Муратова М.Б. Янковская, Д.Г. Шорников // Плодоводство: Ин-т плодоводства Нац. акад. наук Беларуси. – Самохваловичи. – 2005. – Т. 17, Ч. 2. – С. 182–185.

87. Муратова С.А., Субботина Н.С., Сухоруких А.В., Будаговский А.В. Повышение эффективности ризогенеза нетрадиционных ягодных культур путем обработки микрочеренков низкоинтенсивным когерентным излучением // Биотехнология в плодоводстве: Материалы междуна. науч. конфер., г. Самохваловичи, 13-17 июня 2016 г, Минск: «Колорград».- 2016. - С. 89-91.

88. Муратова, С. А. Влияние лазерного излучения на укоренение растений *in vitro* / С.А. Муратова, Н.В. Соловых, М.Б. Янковская // Плодоводство и ягодоводство России. – М., 2012. – Том XXXIII. – С. 249-257.

89. Муратова, С.А. Размножение садовых культур *in vitro*: методические рекомендации/ С.А. Муратова, Д.Г. Шорников, М.Б. Янковская // Мичуринск – наукоград РФ; ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина, ОАО «Тамбовская типография «Пролетарский светоч», 2008. – 68 с.

90. Нам И.Я. Оптимизация метода клонального микроразмножения для ускоренной селекции межвидовых ремонтантных форм малины / И.Я. Нам, В.В. Заякин, В.В. Вовк, И.В. Казаков // С.-х. биология. -1998.-№ 3.- С.51-55.
91. Немцова Е. В., Сенчилина А. И., Разлуго И. А. Влияние регуляторов роста на размножение ремонтантной ежевики *in vitro* //Разнообразие растительного мира. – 2020. – №. 2 (5). – С. 37-43.
92. Несмелова Н.П., Сомова Е.Н., Потапова С.А. Влияние спектрального состава света на размножение и укоренение жимолости в культуре *in vitro*// Владимирский земледелец. - 2015. – № 1 (71).- С.35-36.
93. Озеровский А.В. Микрклональное размножение селекционных форм ремонтантной малины с использованием новых регуляторов роста: автореф. дис. ... канд. с.-х.наук. – Брянск, 2007.
94. Оразбаева Г.К. Клональное размножение растений красной малины (*Rubus idaeus* L.) *in vitro* / Г. К. Оразбаева, И.Л. Майсупова, В.Т. Хасанов, В.К. Швидченко// Вестник науки КазАТУ им. С. Сейфуллина. – 2012. - №1 (72). – С.140-149.
95. Панькова О.А., Несмелова Н.П. Совершенствование приемов клонального микроразмножения ягодных кустарников //Аграрная наука Евро-Северо- Востока, 2008, №11. - С.72-76.
96. Папихин, Р.В. Влияние ультразвукового излучения на процесс ризогенеза микрочеренков *in vitro* / Р. В. Папихин, С.А. Муратова // Садоводство и виноградарство. – 2009. – № 4. – С. 18–21.
97. Першина, Л.А. Культивирование изолированных клеток и тканей высших растений / Л.А. Першина – Новосибирск: НГУ, 2000. – 46 с.
98. Плаксина, Т. В. Приемы адаптации растений-регенерантов к условиям *ex vitro* / Т.В. Плаксина // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. Садоводство. – Краснообск: Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН. - 2011. - № 2 [218]. - С. 43–48.
99. Плаксина Т. В., Бородулина И. Д., Ворохобова Л. С. Особенности

клонального микроразмножения малины красной (*Rubus idaeus* L.) алтайской селекции // Садоводство и виноградарство. - 2017. № 5. - С. 39–44.

100. Плаксина Т. В., Гусев Д. А. Использование среды Драйвера и Куниюки (Driver & Kuniyuki Walnut medium) для микроразмножения сортов малины красной // Достижения науки и техники АПК. – 2021. – Т. 35. – №. 9. – С. 19-24.

101. Полевой, В.В. Фитогормоны/ В.В.Полевой. - Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. -248 с.

102. Постовалова, В.М. Роль света разного спектрального состава в онтогенезе листа / В. М. Постовалова, Р. А. Карначук, Е. В. Прохорова и др. // Физиология растений – 1987. – Т. 31, вып. 4. – С. 752.

103. Приходько, Ю.Н. Антифитовирусное действие препарата гипорамин / Ю.Н. Приходько, Л.В. Цубера, Д.В. Редин // Современная схема производства и сертификации безвирусного посадочного материала. Промышленное производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и цветочно-декоративных культур: Мат. науч.-практ. конференции 20-22 ноября 2001. – М., 2001. – С. 84-86.

104. Приходько, Ю.Н. Разработка метода хемотерапии вирусов в процессе микроразмножения плодовых и ягодных культур. / Ю.Н. Приходько, Л.В. Цубера // Плодоводство и ягодоводство России: сборник научных работ РАСХН; Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства. - М.: 1996. - Том III. – С. 96-101.

105. Пронина, И.Н. Особенности регенерации сортов малины и ежевики *in vitro* / И.Н. Пронина, О.В. Матушкина// Плодоводство и ягодоводство России: Всерос. селекц.-технол. ин-т садоводства и питомниководства. 2009. - Т.22, №2. - С. 206-210.

106. Протасова Н.Н., Кефели В.И. Фотосинтез и рост высших растений, их взаимосвязи и корреляции // Физиология фотосинтеза. – М.: Наука, 1982. – С. 215 – 270.

107. Расторгуев С.Л. Регенерация растений из изолированных соматических тканей земляники и малины// Индукция морфогенеза и тканевая селекция плодовых и ягодных культур: Методические рекомендации. – Мичуринск, 1996. – С. 40-61.

108. Салаяев Р.К., Дударева Л.В., Ланкевич СВ., Сумцова В.М. Влияние низкоинтенсивного когерентного излучения на каллусогенез у дикорастущих злаков // Доклады АН. - 2001. - Т. 379. (6). - С. 819-820.

109. Сковородников, Д.Н. Особенности клонального микроразмножения *in vitro* и ускорение селекции новых ремонтантных форм малины: Автореф. дис. канд. с.-х. наук: 06.01.05, 03.00.12 / Д.Н. Сковородников; Брянская ГСХА. -Брянск, 2003. - 20 с.

110. Сковородников Д. Н., Казаков И. В. Особенности клонального микроразмножения ремонтантных форм малины // Садоводство и виноградарство. - 2012. - № 2. - С. 39–42.

111. Сковородников Д. Н., Милехина Н. В., Орлова Ю. Н. Особенности клонального микроразмножения ежевики и малино-ежевичных гибридов //Вестник Брянского государственного университета. – 2015. – №. 3. – С. 417-419.

112. Сковородников Д.Н. Адаптация полученных *in vitro* растений малины к нестерильным условиям / Д.Н. Сковородников, И.А. Райков, Д.Н. Челяев // Вестник ОрелГАУ. - 2012. - №2[35]. - С. 70-72.

113. Соболев В.В. Об использовании цитокининов для оптимизации клонального микроразмножения ремонтантных форм малины / Соболев В.В., Соболева А.Г., Озеровский А.В., Казаков И.В., Евдокименко С.Н. // Сельскохозяйственная биология. 2007, №1. - С.91-95.

114. Соловых, Н. В. Использование биотехнологических методов в работе с ягодными культурами/ Н. В. Соловых - Методические рекомендации. – Научград РФ: ГНУ ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина, Изд. Мичуринского гос. агроун-та, 2009. – 47 с.

115. Соловых, Н.В. Клональное размножение ягодных культур *in vitro* / Соловых, Н.В., Муратова, С.А., Янковская, М.Б. // Актуальные проблемы размножения садовых культур и пути их решения: материалы Международной научно-методической дистанционной конференции. – Мичуринск, 2010. – С. 280–295.
116. Соловых, Н.В. Эффективность использования различных цитокининов для клонального размножения *in vitro* растений рода *Rubus* / Н. В. Соловых // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ / ВСТИСП; редкол.: И. М. Куликов (гл. ред.) [и др.]. – М., 2013. – Т. XXXVII. – С. 316–321.
117. Соловых, Н.В. Оптимизация питательных сред для клонального размножения красной и черной малин *in vitro* / Соловых, Н.В. // Плодоводство и ягодоводство России. – 2014. – Т. XXXX, Ч. 1. – С. 297–300.
118. Соловых, Н.В. Размножение *in vitro* растений рода *Rubus* / Н.В. Соловых, Муратова, С.А. // Сибирский вестник с.-х. науки. – 2011. – № 1. – С. 32–39.
119. Соловых, Н.В. Размножение *in vitro* чёрной малины / Соловых, Н.В. // Международный научно-исследовательский журнал. – 2013. – № 4–1 (11). – С. 82–83.
120. Соловых, Н. В. Эффективность использования различных цитокининов для клонального размножения *in vitro* растений рода *Rubus* / Соловых Н.В. // Плодоводство и ягодоводство России. – 2013. – Т. 37, № 1. – С. 316–321.
121. Соловых, Н.В. Влияние светодиодного и лазерного излучения на рост и размножение ягодных культур *in vitro* на примере малины черной и актинидии коломикта / Н.В. Соловых, А.В. Будаговский, М.Б. Янковская // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. - Киров: «Северо-Восточный региональный аграрный научный центр». - 2014. №5 [42].- С. 16-21.
122. Соловых, Н.В. Использование лазерного излучения для повышения эффективности клонального микроразмножения растений рода

Rubus / Н.В. Соловых, А.В. Будаговский, С.А. Муратова, М.Б. Янковская // Плодоводство и ягодоводство России. – М. 2012. - Том XXXIII. - С. 324-329.

123. Соловых Н. В., Муратова С. А., Янковская М. Б. Клональное размножение ягодных культур *in vitro* // «Актуальные проблемы размножения ягодных культур и пути их решения»: мат. междунар. научн.-метод. дистанционной конф. [Электронный ресурс], 2010. – Режим доступа: <http://konferenc2010.narod.ru>.

124. Ташматова Л. В., Грюнер Л. А., Мацнева О. В. Особенности клонального микроразмножения ежевики с различной формой роста // Современное садоводство—Contemporary horticulture. – 2014. – №. 4 (12). – С. 60-63.

125. Таварткиладзе, О. К. Размножение ежевики в культуре *in vitro*/ О. К. Таварткиладзе, Н.А. Вечернина // Эл. журнал «Известия Алтайского государственного университета». Биологические науки. 2007. – № 3 (55). – Режим доступа: <http://izvestia.asu.ru/2007/3/biol/TheNewsOfASU-2007-3-biol-06.pdf>.

126. Тихомиров А.А., Лисовский Г.М., Сидько Ф.Я. Спектральный состав света и продуктивность растений. Новосибирск: Наука, 1991. -168 с

127. Трунов И.А. Оптимизация условий роста микрорастений садовых культур на этапе адаптации / И.А. Трунов, Ю.В. Хорошкова // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. 2020. - №1 (60). - С. 90-97.

128. Турецкая Р.Х. Роль природных ауксинов и ингибиторов роста в органообразовании корней у стеблевых черенков//Новое в размножении садовых растений. -М.,1969.-С.38-44.

129. Упадышев М.Т. Клональное микроразмножение некоторых нетрадиционных культур рода *Rubus* / М.Т. Упадышев // Ягодоводство в Нечерноземье. - М. 1993. С. 10-18.

130. Упадышев, М.Т. Роль фенольных соединений в процессах жизнедеятельности садовых растений. / М.Т. Упадышев // М.: Изд. дом МСП. – 2008. – 319 с.).
131. Упадышев, М.Т. Размножение ежевики и малины черной методом культуры тканей / М.Т. Упадышев, В.А. Высоцкий // Садоводство и виноградарство. 1991. №6. С. 24-27.
132. Упадышев М.Т., Гуськов А.В. Ауксины и фенолкарбоновые кислоты как регуляторы ризогенеза растений рода *Rubus in vitro*// Сельскохозяйственная биология. –1996. – №1. – С. 92–98.
133. Шелифост, А.Е. Микрклональное размножение видов рода *Prunus* / А.Е. Шелифост, С.С. Костышин, Р.А. Волков // Биотехнология. - 1993.-№ 5.-С.19-21.
134. Фаустов В.В., Орлов П.Н., Асадулаев З.М. Гормональная регуляция ксилемной дифференциации в процессе укоренения зеленых черенков плодовых культур//Удобрения и регуляторы роста в садоводстве. - М.,1985.-С.50-58.
135. Хорошкова Ю.В., Трунов И.А., Мелехов И.Д. Применение ауксинов в составе питательной среды на этапе ризогенеза микрочеренков ягодных и декоративных культур // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. 2020. - № 4 (63). - С. 83-91.
136. Хорошкова Ю.В., Субботина Н.С., Муратова С.А. Влияние лазерного излучения на эффективность ризогенеза ремонтантной малины сорта Оранжевое чудо// Агрэкологические аспекты устойчивого развития АПК: материалы XV Международной научной конференции. - Брянск: Изд-во Брянский ГАУ, 2018.- С.835-839.
137. Шелифост А.Е., Костышин С.С., Волков Р.А. Микрклональное размножение видов рода *Prunus*//Биотехнология. -1993.-№ 5.-С.19-21.
138. Юнович А.Э. Светодиоды как основа освещения будущего/ А.Э. Юнович // Светотехника. - 2003.- №3.- С.2-6.
139. Al-Mayahi, A.M.W. Effect of red and blue light emitting diodes “CRB-

LED” on *in vitro* organogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Alshakr/ A.M.W. Al-Mayahi // World J Microbiol. Biotechnol. - 2016. - V. 32. - P.160-164.

140. Anderson W. S. Mass propagation by tissue culture: principles and techniques // On nursery production of fruit plants through tissue culture-applications and feasibility: Proc. of confer. Maryland, 1980. - P. 1–10.

141. Baleriola-Lucac., Mullins M.G. Micropropagation of two French prune cultivars: *Prunus domestica* L.//Agronomie.-1984.-V.4.-№5.-P.473-477.

142. Banno K., Yoshida K., Hoyashi S., Tanabe K. In vitro propagation of Japanese pear cultivars//J. Jap.Soc.Hort.Sci.-1989.-V.58, №1.-P.37-42.

143. Bobrowski V.L., Mello-Farias P., Petters J. Micropropagation of blackberries (*Rubus* sp.) cultivars // Current Agricultural Science and Technology. – 1996. - Vol. 2. - №1. - P. 17-20.

144. Bonga J. M., Klimaszewska K. K., von Aderkas P. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers// Plant. Cell Tiss. Organ. Cult - 2010. - V. 100 - P. 241–254.

145. Borodulina I.D., Plaksina T.V., Panasenko V.N., Sokolova G.G. Optimization of blackberry clonal micropropagation // Ukrainian Journal of Ecology. 2019. - Vol. 9, №3. - P. 339-345.

146. Budiarto K. Spectral quality affects morphogenesis on *Anthurium* plantlet during in vitro culture // Agrivita – 2010 - V.32 – P.234–240.

147. Chung J.P., Huang C.Y., Dai T.E. Spectral effects on embryogenesis and plantlet growth of *Oncidium* ‘Gower Ramsey’ //SciHortic. - 2010. - V. 124. - P. 511–516.

148. Das, T. Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. / T. Das, G.C. Mitra // Plant Cell Tissue and Organ Culture. - 1990. - V. 22. - P. 95-103.

149. Das T., Mitra, G. C. Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith.// Plant Cell Tissue and Organ Culture.- 1990.- V. 22.- P. 95-103.

150. Donnelly, D. J. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. / D.J. Donnelly, W.E. Vidaver // J. Am. Soc. Hort. Sci. - 1984. - V. 109, № 2. - P. 172-176.

151. Driver J. A., Kuniyuki A. H. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock // HortScience. 1984. - Vol. 19. - No. 4.- P. 507–509.
152. Economou A.S., Read P.E. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems // HortSci. 1987. - V. 22. -P.751–754.
153. Edesi J., Kotkas K., Pirttilä A.M., Häggman H. Does light spectral quality affect survival and regeneration of potato (*Solanumtuberosum* L.) shoot tips after cryopreservation? // Plant Cell Tiss Organ Cult. - 2014. - V. 119. - P. 599–607.
154. Gamborg O. L. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley / O. L. Gamborg, D.E. Eveleigh //Can. J. Biochem. – 1968. – V. 46, № 5. – P. 417 – 421
155. Garland P., Stoltz L.P. Micropropagation of Pissardi plum//Ann.Bot.- 1981.-V.48,№3. -P. 387-389.
156. Gupta, S. D. Influence of LED Lighting on In Vitro Plant Regeneration and Associated Cellular Redox Balance / S. D.Gupta, A. Agarwal // Light Emitting Diodes for Agriculture: Smart Lighting. 2017. - P.273-303.
157. Gupta S. D., Jatothu B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis // Plant Biotechnol. Rpt., 2013. — Vol. 7. — P. 211–220.
158. Harry I. S., Thorpe T. A. Clonal propagation of woody species //Plant Cell Culture Protocols. – 1999. - P.149-157.
159. Heo JW, Shin KS, Kim SK, Paek KY Light quality affects in vitro growth of grape ‘Teleki 5BB7’// J. Plant Biol –2006.- V.49- P.276–280.
160. Hung C. D., Hong C.-H., Jung H.-B., Kim S.-K., Ket N.V., Nam M.-W., Choi D.-H., Lee H.-I. Growth and morphogenesis of encapsulated strawberry shoot tips under mixed LEDs // Scientia Horticulturae, 2015. — Vol. 194. — P. 194–200.
161. Jao R.C., Lai C.C., Fang W., Chang S.F. Effects of red light on the growth of *Zantedeschia* plantlets *in vitro* and tuber formation using light-emitting diodes //Hort. Science.2005. - V. 40(2). - P. 436–438.
162. Jones, A.G. Advances in the study, detection and control of virus diseases

of *Rubus*, with special reference to the United Kingdom / Jones, A.G. // Crop. Res. – 1986. – V. 26. – N 2. – P. 127–176.

163. Kasahara M., Kagawa T., Sato Y., Kiyosue T., Wada M. Phototropins mediate blue and red light-induced chloroplast movements in *Physcomitrella patens* // Plant Physiol. 2004. - V. 135. - P. 1388–1397.

164. Kozai T., Smith M.A.L. Environmental control in plant tissue culture-general introduction and overview // In: Aitken-Christie J., Kozai T., Smith M.A.L. (eds) Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 1995. - P. 301–318.

165. Lee N.N., Choi Y.E., Moon H.K. Effect of LEDs on shoot multiplication and rooting of rare plant *Abeliophyllum distichum* Nakai // J. Plant Biotechnol. - 2014. - V. 41. - P. 94–99.

166. Lian M.L., Murthy H.N., Paek K.Y. Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium oriental* hybrid 'Pesaro' // Sci Hortic. 2002. - V. 94. - P. 365–370.

167. Lloud G., McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // Proc. Intern. Plant Prop. Soc. 1980. - Vol. 30. - P. 420–427.

168. Malá, J. Využití mikropropagace při zachraně cenných populací ušlechtilých listnatých dřevin. [Use of micropropagation at preservation of valuable populations of noble hardwoods] / J. Malá, H. Cvrčková, P. Máchová, P. Šima // Zpravy lesnického výzkumu. - 1999. - V. 44. - P. 6–10.

169. Malá, J. Využití mikropropagace pro reprodukci genových zdrojů vybraných ušlechtilých listnatých dřevin [*Malus sylvestris*, *Pyrus pyraeaster*, *Sorbus torminalis*, *S. aucuparia* a *Prunus avium*]. [Use of micropropagation for gene resources reproduction of noble deciduous species [*Malus sylvestris*, *Pyrus pyraeaster*, *Sorbus torminalis*, *S. aucuparia* and *Prunus avium*].] / J. Malá, P. Machová, H. Cvrčková, L. Čížková // Zpravy lesnického výzkumu. - 2005. - V. 50. - 219–274.

170. Massa G.D., Kim H.H., Wheeler R.M., Mitchell C.A. Plant productivity in response to LED lighting // Hort Science. 2008. - V. 43(7). - P. 1951–1956.

171. Mehbooba Z. Micropropagation of *Morus nigra* L. from nodal segments with axillary buds / Z. Mehbooba, Z.A. Kaloo, M.S. Sofi // World Journal of Agricultural Sciences. - 2011. - V. 7 [4]. - P. 496-503.

172. Moncousin C. Rooting of microcuttings: general aspects /C. Moncousin // Acta Hort.-1991. - V.289. - P.301-310.

173. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures// Physiol.Plant. – 1962. – V.15, №13. – P.473-497.

174. Muratova S.A. The research of clonal micropropagation efficiency of *Schisandra chinensis* under the influence of low-intensity coherent radiation. / S.A. Muratova, A.V. Budagovsky, L.A. Tokhtar, V.K. Tokhtar, L.A. Deineka // Int. Journal of Green Pharmacy. – 2017. - Vol. 11 (3). - P.634-636.

175. Muratova S.A., Melehov I. D., Budagovsky A. V., Tokhtar L.A., Tokhtar V.K. The effect of low-intensity coherent radiation on the efficiency of rhizogenesis of plants of the genus *Rubus* L. //Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology. - 2020.- V. 21(19&20) – P. 97-102.

176. Muratova S.A., Subbotina N.S., Tokhtar L.A., Tokhtar V.K., Yatsenko V. M., Petrunova T. V. The influence of the spectral composition on the root development of ornamental plants in vitro// Indo american journal of pharmaceutical sciences 2018. – V.5 (7). - P. 6979-6984.

177. Nemeth G. Induction of rooting//Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.1, Trees 1, chapter IV.-Springen-Verlag Berlin-Heidelberg, 1986.- P.49-64.

178. Nesković M. Vegetativno razmnožavanje belošljive (*Prunus domestica* L.) u kulturi *in vitro*//Arh.poljopr.nauke.-1985.-46.-№ 164.-S.375-380.

179. Nhut D. T., Takamura T., Watanabe H., Tanaka K. Light-emitting diodes (LEDs) as a radiation source for micropropagation of strawberry — In: Kubota C., Chun C. (Eds.) Transplant Production in the 21st Century. Kluwer Academic Publishers, 2000. — P. 114–118.

180. Nhut D.T., Hong L.T.A., Watanabe H., Goi M., Tanaka M. Growth of

banana plantlets cultured *in vitro* under red and blue light-emitting diode (LED) irradiation source // *ActaHortic.*2000. - V. 575. - P. 117–124.

181. Park S.Y., Kim M.J. Development of zygotic embryos and seedlings is affected by radiation spectral compositions from light emitting diode (LED) system in Chestnut (*Castaneacrenata* S. et Z.) // *J. Korean ForSoc.*2010. V. 99(5). P. 750–754.

182. Pierik, R.L.M. Micropropagation of Lilac (*Syringa vulgaris* L.) / R.L.M. Pierik, H.H.M. Steagmans, P.F. Sprenkels / *Biotechnology and Forestry*, 1992. -V. 20. - P. 407-426.

183. Pliego–Alfare, F.J. Development of *in vitro* rooting bioassay using juvenile stem cuttings of *Persea americane* Mill / Pliego–Alfare, F.J. // *Hort Sci.* 1988. – V. 63. – № 2. – P. 295–301.

184. Poudel P.R., Kataoka I., Mochioka R. Effect of red-and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*2008. - V. 92. - P. 147–153.

185. Quoirin M. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. / M. Quoirin, P. Lepoivre // *Acta Hortic.*-1977. – V.78. – P.437-442.

186. Ripetti V., Kevers C., Gaspar T. Two successive media for the rooting of walnut shoots *in vitro*. Changes in peroxidase activity and in ethylene production // *Adv. in hortic Sc.*-1994.-V.8, №1.-P.29-32.

187. Rosati, P. *In vitro* propagation of Japanese plum [*Prunus salicina* Lindl. cv. Calita] / P. Rosati, G. Marino, C. Swerczewski // *J.Amer. Soc. Hort. Sci.*-1980.-V.105, №1.-P.126-129.

188. Seabrook J.E.A. Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum*) *in vitro*: a review // *Am J Pot Res.*2005. - V. 82(5). - P. 353–367.

189. Seon, J.H. Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period / J.H. Seon, Y.Y. Cui, T. Kozai, K.Y. Paek // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* - 2000. - V. 61. - P. 135–142.

190. Sharma, V. *In vitro* rapid multiplication and propagation of *Crataeva nurvala* / V. Sharma, M.A. Padhya // Indian Journal of Experimental Biology. - 1996. - V. 34. - P. 243-246.
191. Smoljar N. Laserstenerung bei der *in vitro* organogenese schwer bewurzelbarer tropischer obstarten // Obstbau der tropen und subtropen- Bernin, 1996. - S. 159-162.
192. Starbuck C.J. Effect of root applied IBA on root and shoot growth of dwarf peach trees / C.J. Starbuck, J.L. Preczewski // J. environm Hortic. - 1986. - V.4, №3. - P.80-82.
193. Sutter, E. G. Use of humidity tents and antitranspirants in the acclimatization of tissue-cultured plants to the greenhouse/ E.G. Sutter, M. Hutzell // Scientia horticultrae. – 1984. – T. 23. – №. 4. – C. 303-312.
194. Sutter, E. G. Physiological and anatomical aspects of water stress of cultured plants / E.G. Sutter, V. Novello, K Shackel // Acta Horticultrae [230]. - 1988. - P.113-119.
195. Verstesy J. Experiments on the propagation of virus-free raspberry propagation material by merystem culture // Acta Hortic. – 1979. – V. 95. – P. 77–78.
196. Wu H.C., Lin C.C. Red light-emitting diode light irradiation improves root and leaf formation in difficult-to-propagate *Protea cynaroides* L. plantlets *in vitro* // HortScience.2012. - V. 47(10). - P.1490–1494.
197. Zaki Mehbooba, Zahoor A. Kaloo, Mohammad Shafi Sofi Micropropagation of *Morus nigra* L.from nodal segments with axillary buds // World Journal of Agricultural Sciences. - 2011. - V. 7 (4). - P. 496-503.
198. Zimmerman R. H., Fordham I. Simplifiaied metod for rooting apple cultivars *in vitro*// J. Amer. Soc. Hort. Sci. – 1985. – V. 110. – P. 34-38.
199. [Электронный ресурс]. Режим доступа - <https://саженцы13.рф/product/ezhevika-tornless-logan/>
200. [Электронный ресурс]. Режим доступа - <https://myblackberryplants.com/ru/varieties/dirksen-thornless>

201. [Электронный ресурс]. Режим доступа - <https://fermilon.ru/sad-i-ogorod/kustarniki/ezhevika-blek-satin.html>

202. [Электронный ресурс]. Режим доступа - <https://fermilon.ru/sad-i-ogorod/kustarniki/ezhemalina-boysenberri-bojsenberri-opisanie-sorta-posadka-i-uhod-video.html>

203. [Электронный ресурс]. Режим доступа - <https://fermilon.ru/sad-i-ogorod/kustarniki/ezhemalina-loganberri-loganberry-opisanie-sorta-osobennosti-vyraschivaniya-obrezka.html>

204. [Электронный ресурс]. Режим доступа - <https://fermilon.ru/sad-i-ogorod/kustarniki/ezhevika-navaho.html>

205. [Электронный ресурс]. Режим доступа - <https://fermilon.ru/sad-i-ogorod/kustarniki/ezhevika-tripl-kraun-triple-crown.html>).

206. [Электронный ресурс]. Режим доступа - <https://vashnil.ru/onas/blog/ezemalina/ezemalina-bukingem-tajberi-buckingham-tayberry>)

207. [Электронный ресурс]. Режим доступа - <https://vashnil.ru/onas/blog/ezemalina/ezemalina-tajberri>

208. [Электронный ресурс]. Режим доступа - <https://timacad.com/0513brilliant.html>

209. [Электронный ресурс]. Режим доступа - <https://vstisp.org/vstisp/images/stories/Yagody/gerakl.htm>

210. [Электронный ресурс]. Режим доступа - <https://vstisp.org/vstisp/index.php/2013-07-24-07-03-02/manufacture/11-icetheme/sample-news/1457-oranzhevoe-chudo>