

АЗЕРБАЙДЖАНСКАЯ РЕСПУБЛИКА

На правах рукописи

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ В
КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*, ЗАЩИЩЕННОМ И ОТКРЫТОМ
ГРУНТЕ КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ ПЛОДОВЫХ
КУЛЬТУР И ВИНОГРАДА**

Специальность: 3103.07- Растениеводство

Отрасль науки: аграрные науки

Соискатель: **Сулейманова Севиль Джаваншир кызы**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора философии

Баку - 2021

Диссертационная работа выполнена в биотехнологических лабораториях НИИ Плодоводства и Чаеводства МСХ Азербайджана и РУП «Институт плодоводства» НАН Беларуси.

Научный руководитель: доктор аграрных наук, профессор
Кухарчик Наталья Валерьевна

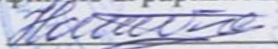
Официальные оппоненты: доктор аграрных наук, профессор
Магомедов Нурулислан Раджабович
доктор философии по аграрным наукам, доцент
Мамедов Вюсал Адаил оглы
доктор философии по аграрным наукам
Мамедова Парвана Махмуд кызы

Диссертационный совет FD 1.29 Высшей Аттестационной Комиссии при Президенте Азербайджанской Республики, действующей на базе Научно-Исследовательского Института Земледелия

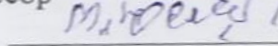
Председатель Диссертационного совета: доктор аграрных наук, профессор


Мамедов Джалал Шамиль оглы

Ученый секретарь Диссертационного совета: доктор философии по аграрным наукам, доцент


Гаджиева Севда Камал кызы

Председатель научного семинара: доктор аграрных наук, профессор


Юсифов Маариф Алимадат оглы

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. На сегодняшний день одной из актуальных задач садоводческой отрасли Азербайджана является недостаток здорового высококачественного посадочного материала отечественного производства. В 2019 году в республике произведено 2748 тысяч саженцев плодовых культур и 156120 саженцев винограда, что недостаточно для закладки новых и замены существующих садов и виноградников. Основным лимитирующим фактором увеличения производства двухкомпонентных саженцев плодовых культур является отсутствие технологии размножения здоровых клоновых подвоев, поскольку семенные подвои не удовлетворяют современные требования к посадочному материалу: являются переносчиками системных болезней, в том числе вирусных; не позволяют закладывать насаждения с высокой плотностью посадки и нормированной высотой.

Перспективным методом, реально позволяющим решить эту проблему, является метод культуры тканей (культура *in vitro*), который дает возможность получить в короткие сроки наиболее адаптированные к местным почвенно-климатическим условиям, характеризующиеся однородностью, здоровые подвои. Во многих развитых странах технология микроразмножения растений методом *in vitro* является неотъемлемой частью системы питомниководства.

В Азербайджане производственная практика микроклонального размножения плодовых растений и винограда практически отсутствует или находится на раннем этапе развития. Причины отсутствия применения в производстве довольно перспективного метода: высокие требования относительно начальных капиталовложений, отсутствие профессиональных кадров в этой отрасли, слабая отработка или отсутствие технологий получения посадочного материала многих культур и сортов, адаптированных для выращивания в Азербайджане.

Цель и задачи исследования. Целью работы явилась разработка технологии размножения в культуре *in vitro* клоновых подвоев косточковых плодовых культур, груши и местных сортов винограда, а также определение адаптивного потенциала оздоровленных растений подвоев и саженцев в открытом грунте в условиях Азербайджана.

Основные задачи исследования следующие:

- оценка особенностей пролиферации клоновых подвоев на этапах введения в культуру *in vitro*, микроразмножения, укоренения и адаптации;

- разработка усовершенствованной технологии размножения *in vitro* клоновых подвоев косточковых плодовых культур и груши;

- разработка усовершенствованной технологии размножения *in vitro* местных сортов винограда;

- оценка адаптивного потенциала полученных *in vitro* клоновых подвоев в открытом грунте и возможности их выращивания по интенсивной технологии;

- определение совместимости выращенных *in vitro* подвоев с хозяйственно значимыми сортами косточковых культур и определение сезонного роста и развития саженцев.

Методы исследования: Процесс введения в культуру, пролиферации, ризогенеза и первоначальной адаптации проводили по методикам^{1,2} микроразмножения растений РУП «Институт пловодства» НАН Беларуси и Института Физиологии растений и генетики НАН Украины с нововведениями, касающимися схемы стерилизации эксплантатов, состава питательных сред и условий культивирования. Первое поле плодового питомника было

¹ Размножение плодовых растений в культуре *in vitro* / Н.В.Кухарчик, М.С.Кастрицкая, С.Э.Семенас [и др.]. - Минск: Беларуская навука, - 2016. - 208 с.

²Калинин, Ф.Л. Технология микрклонального размножения растений / Ф.Л. Калинин, Г.П. Кушнир, В.В. Сарнацкая, - Киев: Наукова Думка, - 1992. - 232 с.

заложено по новой для Азербайджана технологии³ двустрочной системы выращивания подвоев на черной светонепроницаемой мульчирующей пленке. Агробиологическое изучение подвоев плодовых культур в открытом грунте проводилось по методике⁴ Кубанского Государственного Аграрного Университета.

Объектами исследования служили клоновые подвои косточковых и семечковых плодовых культур (GF 677, Myrobalan 29C, MaxMa 14, Garnem 15, ОНФ 87), сорта винограда народной селекции (Мадраса и Баян Ширей).

Основные положения работы, выносимые на защиту:

- основные показатели, определяющие высокую эффективность инициации культуры *in vitro*, микроразмножения и ризогенеза клоновых подвоев косточковых плодовых культур (GF 677, Myrobalan 29C, MaxMa 14, Garnem 15), груши (ОНФ 87), сортов винограда местной селекции (Мадраса и Баян Ширей): причины контаминации эксплантатов и использование антибиотиков для ее элиминации, питательные среды для всех этапов культивирования *in vitro*, генотипов подвоев и сортов винограда;

- впервые разработанная для условий Азербайджана технология размножения в культуре *in vitro* клоновых подвоев косточковых плодовых культур и груши;

- впервые полученные в условиях *in vitro* стерильные культуры местных сортов винограда Мадраса и Баян ширей;

- двустрочная система выращивания на мульчирующей пленке клоновых подвоев косточковых культур, полученных методом культуры *in vitro*, обеспечивающая хорошую адаптацию (95%) в открытом грунте, равномерный рост подвоев и достижение размеров, необходимых для окулировки;

³ Курбанов, И.С., Сулейманова, С.Д., Гаджиев, А.А. Изучение роста и развития подвоев косточковых культур полученных методом *in vitro* // - Баку: Аграрная наука Азербайджана, - 2016. №5, - с. 32-34.

⁴ Дорошенко, Т.Н. Биоэкология и питомниководство плодовых культур: учеб.-метод.пособие / Т.Н.Дорошенко, Л.Г.Рязанова, А.В.Рындин; - Краснодар: Кубанский ГАУ, - 2015. – 62 с.

- сезонный рост и развитие саженцев, выращенных с применением техники *in vitro*, позволяющий получать в условиях Азербайджана, стандартные саженцы миндаля, черешни, сливы, нектарина и др.

Научная новизна исследования. Впервые в условиях Азербайджана апробирован и модифицирован весь цикл биотехнологических работ по выращиванию в культуре *in vitro* клоновых подвоев косточковых плодовых культур (GF 677, Myrabolan 29C, MaxMa 14, Garnem 15), груши (ОНФ 87), сортов винограда народной селекции (Мадраса и Баян Ширей). Определены факторы контаминации эксплантатов при введении в культуру *in vitro*, выделены оптимальные питательные среды, типы эксплантатов, получены стерильные культуры 7 генотипов. Для культивируемых форм подвоев и сортов винограда установлена эффективность микроразмножения в зависимости от используемых питательных сред, пассажей. Впервые для условий Азербайджана разработана технология размножения в культуре *in vitro* клоновых подвоев косточковых культур и груши и определены основные параметры адаптации полученных *in vitro* растений в условиях теплиц, защитных сеток и открытого грунта.

Получены новые данные о сезонном росте и развитии клоновых подвоев, размноженных в культуре *in vitro*, и саженцев косточковых плодовых культур, выращенных с использованием биотехнологий, при применении новой для Азербайджана двустрочной технологии выращивания на мульчирующей пленке в открытом грунте.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Полученные результаты являются ценным вкладом в развитие плодоводства и виноградарства Азербайджана. Разработанная технология размножения в культуре *in vitro* клоновых подвоев косточковых плодовых культур и груши, включает схему производства оздоровленного посадочного материала клоновых подвоев *in vitro*; ускоренное размножение (техника введения в культуру *in vitro*, питательные среды, микроразмножение, укоренение, адаптация). Разработанная технология не имеет

аналогов в Республике Азербайджан, ее использование экологически безопасно и позволяет получать оздоровленный посадочный материал клоновых подвоев высокого качества. Данные о росте и развитии клоновых подвоев и саженцев косточковых плодовых культур при использовании новой для республики двустрочной системы посадки на мульчирующей пленке в открытом грунте, позволяют регулярно получать в условиях Азербайджана стандартные саженцы миндаля, черешни, сливы, нектарина и др.

Апробация и внедрение результатов диссертационного исследования. Основные результаты диссертации опубликованы в 14 работах, в том числе 6 – в изданиях, включённых в перечень ВАК при Президенте Азербайджанской Республики, 2 - в издании, включённом в систему РИНЦ и в перечень ВАК РФ, 1 - в издании, включенном в систему Index Copernicus Int., 4 - в материалах конференций (Международная научно-практическая конференция "Проблемы обеспечения продовольственной безопасности независимого Азербайджанского государства и повышения конкурентоспособности аграрной сферы" (г.Баку, 2018), Республиканская научно-практическая конференция "Академик Джалал Алиев и генетические ресурсы биологического разнообразия" (г.Гянджа, 2018), Конференция молодых ученых и студентов "Innovations in Biology and Agriculture to Solve Global Challenges" (г.Баку, 2018), Международная научно-практическая конференция (г.Новосибирск, РФ, 2019) "Экспериментальные и теоретические исследования в современной науке"). Кроме того, Ученым Советом НИИ Плодоводства и Чаеводства МСХА утверждены и рекомендованы в печать (протокол №15, 13.12.2019) разработанные автором "Технология размножения оздоровленного посадочного материала клоновых подвоев с использованием биотехнологических методов (микрклональное размножение)" и "Методические указания по проведению лабораторных работ при микроразмножении плодовых и ягодных культур *in vitro*" (опубликовано).

Внедрение результатов диссертационного исследования осуществлялось в питомниках ООО "Azerting" и ООО "Zerdabi ETB".

Название организации, где была выполнена диссертационная работа. Научно-исследовательский Институт плодоводства и чаеводства Министерства Сельского Хозяйства Азербайджана, РУП «Институт Плодоводства» Национальной Академии Наук Беларуси.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 7 глав, выводов, рекомендаций по практическому использованию результатов, списка использованной литературы и приложений. Работа включает 30 таблиц и 31 рисунок. Общий объем диссертации состоит из 200 страниц машинописного текста. Общая текстовая часть диссертации (без таблиц, рисунков, списка использованной литературы и приложений) состоит из 117 страниц машинописного текста и 210 133 знака.

Личный вклад соискателя. В диссертационную работу вошли исследования автора, выполненные в период 2016-2019 гг. Соискателем определены и сформулированы цель и задачи исследований, лично и при его участии выполнены подбор объектов исследований, закладка опытного участка, обработка результатов исследований, обоснование и формулировка выносимых на защиту положений. Соискатель лично участвовал в проведении лабораторных и полевых работ, обработке полученного экспериментального материала, обобщении и анализе результатов исследования, внедрении их в производство. По основным положениям диссертационной работы соискателем лично подготовлены публикации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цели, задачи исследования и основные положения работы, выносимые на

защиту, показана научная новизна и практическая ценность работы.

В первой главе описано состояние изучаемого вопроса на современном этапе. Подробно изложены преимущества, способы и этапы размножения растений в условиях *in vitro*, основные условия получения на искусственных питательных средах высококачественных растений-регенерантов.

Анализ литературных данных показывает, что в настоящее время одним из перспективных направлений получения высококачественного посадочного материала плодовых растений являются сочетание культуры *in vitro* и современных технологий питомниководства. Однако, единого мнения авторов о схеме стерилизации эксплантатов, комбинации и концентрации макро-, микроэлементов и регуляторов роста в питательной среде, способах адаптации даже для одной и той же культуры, нет.

Во второй главе описываются условия, объекты и методы исследований. Лабораторные работы проводились в биотехнологических лабораториях НИИ Плодоводства и Чаеводства МСХ Азербайджана и РУП «Институт Плодоводства» НАН Беларуси. Исследования в условиях закрытого и открытого грунта велись в тепличном комплексе и на 1-м и 2-м поле плодового питомника НИИ плововодства и чаеводства МСХ Азербайджана.

Исследования проводились в четыре последовательных этапа:

- первый этап – стерилизация, введение в культуру, размножение и укоренение растений методом культуры *in vitro*;
- второй этап - адаптация растений-регенерантов к нестерильным условиям среды в условиях теплицы и теневой сетки;
- третий этап - высадка полученных подвоев на первое поле питомника;
- четвертый этап - прививка, получение здорового посадочного материала.

Объектами исследования служили клоновые подвои косточковых и семечковых плодовых культур GF 677, Myrobalan

29С, МахМа 14, Garnem 15, ОНФ 87 и сорта винограда народной селекции Мадраса и Баян Ширей.

На этапах введения эксплантатов в культуру *in vitro*, размножения и укоренения подбирали оптимальный состав питательных сред для каждого отдельного подвоя и сорта, модифицируя питательные среды Мурасиге-Скуга⁵ (MS), Драйвера-Куниюки⁶ (DKW) и Гамборга⁷ (Gamborg).

Оценивая результативность технологии микроклонального размножения учитывали: жизнеспособность и уровень регенерации эксплантатов (отношение числа жизнеспособных и регенерировавших эксплантатов к числу высаженных); коэффициент размножения (отношение полученных микропобегов к числу исходных); число укоренившихся микрорастений; число корней; процент укореняемости и т.д.

Условия культивирования микрорастений *in vitro*: освещение 2,5–3,0 тыс. люкс, температура +21...+25°C, фотопериод 16/8 часов. Длительность субкультивирования: 20-21 день.

Адаптация растений-регенерантов подвоев полученных в культуре *in vitro* проводилась в 4 этапа: в условиях культуральной комнаты, теплицы, под теневой сеткой и в открытом поле.

Первое поле плодового питомника было заложено по новой для Азербайджана технологии - двустрочной системе выращивания подвоев на черной светонепроницаемой мульчирующей пленке.

В третьей главе были изучены особенности введения, размножения и укоренения подвоев плодовых культур в

⁵ Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // - Rockville: Physiologia Plantarum, - 1962. 15(3), - p. 473- 497.

⁶ Driver J.A., Kuniyuki A.H. In vitro propagation of Paradox Walnut root stock // - Alexandria: HortScience, - 1984. 18(4), - p. 506-509.

⁷ Gamborg, O.L. The effect of amino acids ammonium of the growth of plant cells in suspens culture // Journal of Plant Physiology, - 1975. №45, - p. 372-375.

условиях *in vitro*. Факторы, влияющие на эффективность инициации культуры *in vitro* - схема стерилизации и состав питательной среды, которые необходимо подбирать для каждого отдельного генотипа.

Эффективность стерилизации определяется наличием как внешних патогенов, которые достаточно легко убрать стерилизующими агентами, так и инфекцией внутри тканей растений, для борьбы с которой используются, чаще всего, различные антибиотики.

Было исследовано влияние традиционных антибиотиков и антибиотиков нового поколения на уровень контаминации эксплантатов на питательной среде, а также на рост и развитие растений, рассмотрена возможность освобождения эксплантатов, заражённых в процессе пассажирования от бактериальных или грибных патогенов.

По результатам исследования, рекомендуется использовать антибиотик нистатин в концентрациях 100 и 200 мг/л, тетрациклин в концентрации 100 мг/л, цефтриаксон в концентрациях 10 и 200 мг/л. Из антибиотиков нового поколения высокая доля регенерировавших эксплантатов во всех вариантах показана при использовании антибиотика биотаксим в концентрации 500 мг/л.

Установлены оптимальные питательные среды для введения в культуру *in vitro* клоновых подвоев и их размножения. Для введения в культуру *in vitro* было использовано 7 модифицированных питательных сред. В ходе исследования более высокая приживаемость и интенсивное развитие эксплантатов, наблюдалось для подвоя MaxMa 14 на среде DKW + 0,6 мг/л БАП + 0,01 мг/л ИМК + 2,0 мг/л тиамин + 1,0 мг/л никот. кисл. + 2,0 мг/л глицина + 100,0 мг/л инозитола (VI вариант) – 85,2 % (контроль - 74,3%); для подвоя Myrobalan 29C на среде MS+0,6 мг/л БАП+0,01 мг/л НУК + 0,1 мг/л тиамин + 0,5 мг/л никот. кисл. + 2,0 мг/л глицина + 0,5 мг/л пиридоксина + 100,0 мг/л инозитола (V вариант) - 92,5% (контроль 75%); для подвоев GF 677, Garnem 15, OHF 87 на среде MS+0,6 мг/л БАП+0,01 мг/л НУК + 2,0 мг/л тиамин + 1,0 мг/л никот. кисл. +

2,0 мг/л глицина + 100,0 мг/л инозитола (IV вариант) - 95,0 - 93,3 - 91,6%, соответственно (контроль - 75,0 - 83,3 - 74,0%, соответственно). Таким образом, на модифицированных нами питательных средах эксплантаты характеризовались наивысшей приживаемостью и развитием, что позволило повысить эффективность этапа инициации на 10 - 12 %.

На втором этапе (микроразмножение) были определены особенности пролиферации эксплантатов на первых пассажах микроразмножения в зависимости от гормонального состава питательной Мурасиге-Скуга (MS). Было изучено 8 различных вариантов комбинаций и концентраций гормонов роста.

Установлено, что коэффициент размножения подвоев, в зависимости от гормонального состава среды варьировал незначительно, однако существенно различался в зависимости от генотипов подвоев. Максимальный показатель коэффициента размножения отмечен у подвоя Myrobalan 29C – 5,39 на питательной среде, содержащей 1 мг/л БАП+0,2 мг/л НУК. Минимальная интенсивность размножения отмечена у подвоя Garnem 15 (1,49) на среде, содержащей 1,0 мг/л БАП+0,02 мг/л НУК. В среднем для подвоев показаны следующие коэффициенты размножения: Myrobalan 29C (от 4,13 до 5,39), MaxMa 14 (от 4,21 до 4,83), GF 677 (от 4,0 до 4,76), Garnem 15 (от 1,49 до 1,87).

Учитывая то, что исследуемые комбинации и концентрации гормонов не дали желаемого результата, а именно высокого коэффициента размножения и интенсивного морфологического развития микрочеренков, было решено продолжить исследование и провести сравнительную оценку этих сред по всем подвоям с модифицированными нами средами, показавшими наивысшие результаты на этапе введения в культуру.

Как видно из таблицы 1, среды, которые показали высокий результат на этапе введения в культуру, позволили получить сравнительно высокий результат и на этапе микроразмножения.

Таблица 1
Коэффициент размножения подвоев на
модифицированных питательных средах

Питательная среда		Коэффициент размножения				
		MaxMa 14	Myroba- lan 29C	GF677	Garnem 15	OHF87
I	MS+1,0 мг/л БАП+0,02 мг/л НУК (контроль)	4,21±0.33	4,57±0.60	4,76±0.63	1,49±0.15	4,35±0.62
II	MS+0,6 мг/л БАП+0,01 мг/л НУК+ 2,0 мг/л тиамин +1,0 мг/л никот.кисл. + 2,0 мг/л глицин + 100,0 мг/л инозитол	4,75±0,45	6,02±0,25	5,82±0,23	6,03±0,27	6,27±0,32
III	MS+0,6 мг/л БАП+0,01 мг/л НУК+ 0,1 мг/л тиамин +0,5 мг/л никот. кисл. + 2,0 мг/л глицин + 0,5 мг/л пиридоксин+100,0 мг/л инозитол	4,32±0,33	6,17±0,52	4,20±0,42	5,32±0,24	5,32±0,23
IV	DKW + 0,6 мг/л БАП + 0,01 мг/л ИМК+ 2,0 мг/л тиамин +1,0 мг/л никот. кисл. + 2,0 мг/л глицин + 100,0 мг/л инозитол	6,02±0,42	5,99±0,48	4,60±0,50	5,0±0,30	5,0±0,45

Так, максимальные показатели коэффициента размножения микрочеренков подвоев по вариантам питательных сред I - IV составили 5,82 - 6,27. Таким образом, разработанный состав питательных сред в ощутимой степени повысил коэффициент размножения микрочеренков подвоев плодовых культур на этапе микроразмножения.

Было установлено, что коэффициент размножения *in vitro* подвоев изменяется не только в зависимости от типа питательной среды, генотипа, но и от длительности пассажирования *in vitro*. На примере подвоя OHF 87 показано,

что при использовании модифицированной среды MS в течение 6 пассажей коэффициент размножения колебался от 2,5 до 6,22.

Количество микрочеренков, пригодных для ризогенеза также различалось по пассажам от 52,8 % на пятом пассаже до 69,9 % на четвертом пассаже. В среднем, количество микрочеренков, пригодных для ризогенеза составило 60,5 %.

Отмечено, что добавление активированного угля в концентрации 2-3 г/л в питательную среду на пассаже предшествующем этапу укоренения, повышает количество микрочеренков пригодных для ризогенеза до 90-93 %.

Оптимизированные питательные среды MS для микроразмножения с содержанием 2 г/л активированного угля и жидкая модифицированная MS с содержанием 3 г/л активированного угля позволили стимулировать развитие и активировать рост микрочеренков, получить регенеранты с хорошо развитым листовым аппаратом, пригодные для дальнейшего пассажирования и пересадки на питательные среды для ризогенеза.

Активация роста микрочеренков при добавлении жидкой питательной среды MS с 3 г/л активированного угля происходила намного быстрее. Уже через 7-10 дней у регенерантов в зависимости от подвоя отмечена длина стебля 2,2-2,6 см (среднее), что еще раз доказывает положительное воздействие данной среды на удлинение стеблей растений-регенерантов.

На этапе укоренения, для начала, было изучено влияние среды Гамборга на укореняемость микрочеренков подвоев косточковых культур. Было определено, что состав среды Гамборга для микрочеренков Myrobalan 29C и GF 677 совершенно не подошел, полностью подавил ризогенез, растения остановились в развитии и через некоторое время погибли. Лучший результат укоренения (100%) на этой среде показали микрорастения МахМа 14. Но корнеобразование на данной среде было очень длительным и достигало 35-40 дней, тогда как обычно на этап укоренения отводится примерно 20-25 дней.

Далее было проведено исследование по подбору состава питательной среды для укоренения. Было изучено влияние на развитие микрочеренков следующих питательных сред и условий 10 дневной этиоляции в II-V вариантах:

I вариант (контроль). Питательная среда с макро- и микросолями по прописи Мурасиге и Скуга (MS) с добавлением регуляторов роста 0,1 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИМК.

II вариант. Питательная среда с макро- и микросолями по прописи Мурасиге и Скуга (MS) с добавлением регуляторов роста 0,1 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИМК.

III вариант. Питательная среда с макро- и микросолями по прописи Мурасиге и Скуга (MS) с добавлением регуляторов роста 0,5 мг/л ИМК и 0,1 мг/л НУК.

IV вариант. Питательная среда с макро- и микросолями по прописи Мурасиге и Скуга (MS) с добавлением регуляторов роста 1,0 мг/л ИМК и 0,1 мг/л НУК

V вариант. Питательная среда с макро- и микросолями по прописи Драйвера и Куниюки (DKW) с добавлением регуляторов роста 1,0 мг/л ИМК и 0,01 мг/л НУК.

Установлено, что для корнеобразования у микрорастений подвоя МахМа14 самой подходящей средой оказалась среда DKW с 1,0 мг/л ИМК и 0,01 мг/л НУК (V вариант). На этой среде доля укоренившихся растений-регенерантов составила 82,0%. Оптимальное укоренение микрорастений подвоев Myrobalan 29C (80,0 %), Garnem 15 (88,0%), GF 677 (80%) и ОНФ 87 (80%) было отмечено на среде MS при использовании 1,0 мг/л ИМК и 0,1 мг/л НУК (IV вариант). Такое развитие корневой системы максимально для изученных клоновых подвоев и должно обеспечивать высокий уровень адаптации растений-регенерантов в нестерильных условиях, на субстратах, резко отличающихся по физическим и химическим параметрам от питательных сред.

Было также установлено, что корнеобразование у микрочеренков подвоев плодовых культур Myrobalan 29C, МахМа 14, Garnem 15, GF 677 и ОНФ 87 лучше происходит при условиях 10 дневной этиоляции с последующим

культивированием при нормальном освещении 2,5-3 кЛк и фотопериоде 16/8 часов.

Кроме того, существенного изменения эффективности укоренения подвоев плодовых культур в условиях *in vitro* в зависимости от пассажа не наблюдалось.

Четвертая глава посвящена особенностям введения, размножения и укоренения местных азербайджанских сортов винограда в культуре *in vitro*, что обусловлено необходимостью начала работ по оздоровлению винограда от системных болезней.

Впервые были начаты исследования по введению в культуру *in vitro* местных азербайджанских сортов винограда Мадраса и Баян Ширей. Для этих сортов показана высокая результативность инициации культуры *in vitro* на среде MS с добавлением 1,1 мг/л БАП. Для сорта Мадраса максимальной жизнеспособностью характеризовалась боковая почка (70,0%), результативность использования меристемы и верхушечной почки незначительно ниже (66,7%). Для сорта Баян Ширей максимальное количество регенерировавших эксплантатов отмечено у боковой почки (100,0%), при использовании меристем и верхушечной почки – 66,7%.

На этапе микроразмножения было установлено, что избыточное использование регуляторов роста, в данном случае БАП, приводит к каллусообразованию, что оказывает негативное влияние на последующее корнеобразование.

Целью исследования на этапе укоренения было подобрать наиболее подходящую комбинацию и концентрацию регуляторов роста для получения полноценных растений сортов винограда народной селекции Мадраса и Баян Ширей (табл.2).

При оценке результатов этапа укоренения микрорастений винограда сортов Мадраса и Баян Ширей на питательных средах с использованием 9 различных гормональных комбинаций и концентраций учитывали: число побегов (шт), длину побегов (см), число листьев на побегах (шт), процент укоренения (процент получения полноценного растения, %), число корней (шт) и их длину (см).

Таблица 2

**Развитие микрорастений сортов Мадраса и Баян Ширей
на этапе укоренения**

Варианты		Число побегов, шт		Длина побегов, см		Число листьев, шт	
		Мадраса	Баян Ширей	Мадраса	Баян Ширей	Мадраса	Баян Ширей
1	0,5 мг/л ИМК (контроль)	1,1	1,30	1,38	3,02	2,12	4,4
2	1,0 мг/л ИМК	1,0	1,0	2,46	3,25	4,1	5,13
3	2,0 мг/л ИМК	1,23	1,33	1,68	2,67	1,75	4,16
4	0,5 мг/л ИМК + 0,5 мг/л БАП	2,11	1,90	1,86	1,71	2,31	3,3
5	1,0 мг/л ИМК + 0,5 мг/л БАП	1,12	2,11	1,74	1,9	1,70	3,45
6	2,0 мг/л ИМК + 0,5 мг/л БАП	1,24	1,89	1,25	2,07	3,22	3,8
7	0,5 мг/л ИМК + 0,5 мг/л 2iP	1,6	1,43	1,93	2,04	3,82	3,45
8	1,0 мг/л ИМК + 0,5 мг/л 2iP	1,12	1,15	2,09	1,71	2,67	2,8
9	2,0 мг/л ИМК + 0,5 мг/л 2iP	1,33	1,1	2,06	1,2	2,58	2,70

Как видно из таблицы 2, самое большое количество аксиллярных побегов было получено для сорта Мадраса (2,11 шт) в 4-м варианте MS + 0,5 мг/л ИМК + 0,5 мг/л БАП, а для сорта Баян Ширей (2,11 шт) в 5-м варианте MS + 1,0 мг/л ИМК + 0,5 мг/л БАП. Необходимо отметить, что в целом на этапе укоренения побегообразование микрорастений сорта Мадраса по сравнению с микрорастениями сорта Баян Ширей было ниже.

По длине побегов и активности листообразования микрорастения сорта Мадраса также уступали микрорастениям Баян Ширей.

Также в ходе исследования было выявлено, то обстоятельство, что среды ингибирующие побегообразование обоих сортов, положительно влияли на вытягивание побегов в длину. Так, для сортов Мадраса и Баян Ширей во 2-м варианте на среде MS с добавлением 1,0 мг/л ИМК отмечено минимальное количество побегов (1,0 шт) и максимальная длина побега 2,46 и 3,25 см, соответственно (табл.2).

Оценивая корнеобразование обоих сортов (табл. 3) установлено, что самый высокий процент укоренения для сорта Мадраса был получен на среде с содержанием 2,0 мг/л ИМК (84%), а для сорта Баян Ширей на среде с содержанием 1,0 мг/л ИМК (82%).

Таблица 3

Корнеобразование у микрорастений винограда сортов Мадраса и Баян Ширей на этапе укоренения

Варианты		Укоренение, %		Максим. длинный корень, см		Средняя длина корней, см		Среднее число корней, шт	
		Мадраса	Баян Ширей	Мадраса	Баян Ширей	Мадраса	Баян Ширей	Мадраса	Баян Ширей
1	0,5 мг/л ИМК (контроль)	10,0	80,0	0,5	3,9	0,34	1,93	0,2	3,7
2	1,0 мг/л ИМК	83,0	82,0	3,47	2,96	3,34	2,29	2,6	5,2
3	2,0 мг/л ИМК	84,0	80,0	0,47	2,67	0,27	1,63	7,6	6,83
4	0,5 мг/л ИМК + 0,5 мг/л БАП	10,0	0	0,21	0	0,17	0	0,44	0
5	1,0 мг/л ИМК + 0,5 мг/л БАП	18,0	65,0	0,08	2,84	0,08	2,33	0,10	0,89
6	2,0 мг/л ИМК + 0,5 мг/л БАП	49,0	62,0	1,64	2,4	1,24	1,71	2,78	1,33
7	0,5 мг/л ИМК + 0,5 мг/л 2iP	25,0	0	0,84	0	0,61	0	0,60	0
8	1,0 мг/л ИМК + 0,5 мг/л 2iP	32,0	30,0	2,09	0,31	1,40	0,23	1,0	0,4
9	2,0 мг/л ИМК + 0,5 мг/л 2iP	60,0	70,0	2,36	2,23	0,24	1,31	0,33	3,8

Максимально длинный корень зафиксирован в 1-м варианте для сорта Баян Ширей (3,9 см) и во 2-м варианте для сорта Мадраса (3,47 см) с содержанием 0,5 мг/л и 1,0 мг/л ИМК, соответственно.

По количественному показателю большее количество корней и для сорта Мадраса (7,6 шт) и для сорта Баян Ширей (6,83 шт) образовалось на питательной среде MS + 2,0 мг/л ИМК. Максимальная средняя длина образовавшихся *in vitro* корней для микрорастений сорта Мадраса (3,34 см) зафиксирована на среде MS с содержанием 1,0 мг/л ИМК, а для микрорастений

сорта Баян Ширей (2,33 см) на среде MS + 1,0 мг/л ИМК + 0,5 мг/л БАП.

Судя по результатам исследования, среда с содержанием 0,5 мг/л ИМК + 0,5 мг/л БАП и среда с содержанием 0,5 мг/л ИМК + 0,5 мг/л 2ip полностью ингибировали процесс корнеобразования у микрорастений сорта Баян Ширей (табл. 3).

В целом, оптимальные результаты по укоренению *in vitro* обоих сортов винограда получены на среде MS с содержанием 1,0 мг/л ИМК, за исключением количества корней, максимальное количество которых (табл. 3), было получено на среде с содержанием 2,0 мг/л ИМК. Данная среда (MS + 1,0 мг/л ИМК) позволила получить растения с хорошими морфометрическими показателями, побеги достигали 3 см и более, каждое микрорастение имело 3 - 5 междоузлий и хорошо развитую листовую систему. Корни растений в культуре *in vitro* были светлыми, каллус у основания отсутствовал, количество придаточных корешков на 1 растение составляло 3 – 5 штук. Данные характеристики микрорастений позволили провести их пересадку для адаптации.

Пятая глава посвящена изучению морфологического развития растений-регенерантов на этапе адаптации. Перенос растений из условий *in vitro* в условия *ex vitro* - заключительная и наиболее стрессовая стадия для пробирочных растений, определяющая успех всей работы. В наших исследованиях адаптация растений-регенерантов к условиям *ex-vitro* проходила в четыре этапа: 1) адаптация в лабораторных условиях; 2) адаптация в условиях теплицы; 3) адаптация под теневой сеткой; 4) адаптация в условиях открытого грунта.

Были проведены биометрические измерения морфологических показателей растений-регенерантов (количество адаптированных микрорастений, %; длина стебля, см; длина корней, см) в результате использования кокосового субстрата.

В целом кокосовый субстрат оказал положительное влияние на морфологическое развитие растений-регенерантов. Субстрат способствовал интенсификации ростовых процессов надземной

и корневой части растений. Также отмечена хорошая активность корневой системы на данном субстрате: образование большого количества боковых и придаточных корешков и удлинение корневой системы, что в свою очередь способствовало хорошему развитию надземной части растения.

Самый высокий процент адаптированных растений показал подвой Garnem 15 - 86,4% . Подвой GF 677 отличился хорошим формированием стебля 3,8 см и самыми длинными корнями 3,54 см.

Данная тенденция отмечалась и через 45 дней адаптации, когда прижившиеся растения переносили в теплицу (2-ой этап адаптации) и пересаживали в горшочки или кассеты в нестерильный торфяной субстрат (смесь торфа и агроперлита в соотношении 5:1).

В условиях теплицы растения-регенеранты содержали при температуре +20...+23°C, периодически поливали и подкармливали удобрениями. При достижении растениями роста 30-35 см, хорошего развития стеблей и листового аппарата их выносили под теньевую сетку.

Вынос растений-регенерантов из теплицы под теньевую сетку (3-й этап адаптации) производили не ранее конца апреля - начала мая. Адаптация под теньевой сеткой - это промежуточная адаптация между адаптацией в условиях закрытого (теплица) и открытого грунта (поле). Она необходима для того, чтобы некоторое время защитить растения от прямых лучей солнца и адаптация к условиям окружающей среды прошла без потерь. Процесс адаптации растений под теньевой сеткой занимает минимум 10 дней.

Далее растения высаживали на первое поле питомника, заложенного по разработанной в НИИ Плодоводства и Чаеводства МСХА технологии двустрочного выращивания подвоев.

В шестой главе приведены агробиологические показатели подвоев, выращенных в культуре *in vitro*, при культивировании в открытом грунте. Подробно изложены новые данные о сезонном росте и развитии клоновых подвоев, размноженных в

культуре *in vitro*, и саженцев косточковых плодовых культур, выращенных с использованием биотехнологий, при применении двустрочной системы выращивания на мульчирующей пленке в открытом грунте.

Двустрочная система выращивания на мульчирующей пленке обеспечивает хорошую адаптацию в открытом грунте клоновых подвоев косточковых культур, выращенных *in vitro*. Количество адаптированных в открытом грунте подвоев через 3 месяца после посадки составило 95%.

В результате изучения динамики роста и развития подвоев в первом поле питомника было установлено, что растения начинают ветвиться уже в мае, образование новых побегов и их активный рост завершается к началу сентября. Растения подвоя GF 677 к середине периода вегетации по высоте превышали требования стандарта (30-45см), и в зависимости от вида и качества посадочного материала данный показатель составил от 80 до 120 см. Для растений подвоев MaxMa 14 и Myrobalan 29C этот показатель составил 62-127 см и 60-110 см, соответственно.

К моменту окулировки диаметр штамба подвоев в месте прививки составил в среднем для подвоя GF 677 - 8,03мм, Garnem 15 - 8,8 мм, MaxMa 14 - 8,6 мм, Myrobalan 29C - 9,1 мм. Приживаемость окулировок составила 92%.

В результате полевых исследований установлено отсутствие визуальных симптомов несовместимости привоев и подвоев и высокий процент приживаемости окулировок.

Наиболее высокорослыми оказались саженцы (табл. 4), выращенные на подвое GF 677 - до 214,6 см. Далее в порядке убывания следуют саженцы на Garnem 15 (до 176,2 см), Myrobalan 29C (до 149,03 см), MaxMa14 (до 148,5 см).

Важным показателем, характеризующим качество саженцев, является толщина стволика подвоя в месте прививки и ее соотношение с толщиной привитого компонента.

Минимальной разницей в диаметре привоя и подвоя в месте прививки характеризовались следующие сорто-подвойные комбинации: CF 677 + Ferraduel; CF 677 + Ferragnes; Garnem 15

+ Guara. Максимальная разница в диаметре привоя и подвоя в месте прививки отмечена у всех сортов на подвое MaxMa 14 и у сорта Black Diamond на подвое Myrobalan 29C (табл. 4).

Таблица 4

Показатели роста саженцев на подвоях GF 677, Garnem 15, MaxMa 14 и Myrobalan 29C (сентябрь, 2019 г)

Подвой	Привой (сорт)	1-летний саженец (окулировка 2018 г.)		
		диаметр штамба, мм (среднее)		высота стволика, см (среднее)
		под окулировкой	над окулировкой	
CF 677	Guara (миндаль)	20,6	16,8	199,3
	Ferraduel (миндаль)	13,1	11,9	214,6
	Ferragnes (миндаль)	13,1	11,8	194,2
Garnem 15	Guayox 35 (персик)	15,8	13,1	154,1
	Guayox 30 (персик)	16,1	13,2	162,2
	Guara (миндаль)	13,6	12,2	176,2
MaxMa 14	Regina (черешня)	18,5	13,9	139,5
	Ziraat 0900(черешня)	19,6	15,32	148,5
	Yellow Drogan (черешня)	18,8	14,1	139,1
Myrobalan 29C	Black Diamond (слива)	18,0	13,6	149,03
	Black Amber (слива)	17,4	14,0	124,2

В седьмой главе показана экономическая эффективность разработанной технологии микроразмножения подвоев плодовых культур Maxma 14, GF 677, Myrobalan 29C, Garnem 15 и ONF 87, а именно модифицированных нами питательных сред, взяв за основание результаты исследования по укоренению подвоев плодовых культур в условиях *in vitro*.

Результаты исследования дают основание сделать вывод, что чем эффективнее состав питательной среды, тем ниже себестоимость растения, выше рентабельность производства и, соответственно, прибыль. Разработанные модифицированные питательные среды оказались не только вегетативно продуктивными, но и экономически эффективными.

ВЫВОДЫ

1. Установлены основные показатели, определяющие высокую эффективность инициации культуры *in vitro*, микроразмножения и ризогенеза клоновых подвоев плодовых культур. Выделены оптимальные питательные среды для микроразмножения в условиях *in vitro* клоновых подвоев, обеспечивающие высокую результативность инициации (85,2-95%); высокие показатели коэффициента размножения (5,82-6,27) и процента укоренения (80-88%) [6-8; 10-12].

2. Впервые введены в культуру *in vitro* сорта винограда народной селекции Мадраса и Баян шире, показана высокая результативность инициации (66,7-100,0 %) и ризогенеза (82-84%) [3-4; 9].

3. Впервые для условий Азербайджана разработана технология размножения в культуре *in vitro* клоновых подвоев косточковых плодовых культур и груши позволяющая круглогодично получать оздоровленный посадочный материал, отличающийся высоким качеством [6; 8; Приложение 5].

4. Двустрочная система выращивания на мульчирующей пленке обеспечивает хорошую адаптацию в открытом грунте клоновых подвоев косточковых культур, выращенных *in vitro* (95 %) [1].

5. В результате полевых исследований установлено отсутствие аномалий у подвоев, полученных в культуре *in vitro*, визуальных симптомов несовместимости привоев и *in vitro* подвоев и высокий процент приживаемости окулировок (92%); получены стандартные саженцы 11 сорто-подвойных комбинаций.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРАКТИЧЕСКОМУ ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Рекомендуется использовать разработанную технологию размножения в культуре *in vitro* клоновых подвоев косточковых плодовых культур и груши в современных питомниководческих хозяйствах, оснащенных биотехнологическими лабораториями.

2. Рекомендуется использовать в питомниководческих

хозяйствах страны двустрочную систему выращивания подвоев косточковых культур на мульчирующей пленке.

3. Рекомендуются использовать полученные данные в учебном процессе высших учебных заведений сельскохозяйственного и биологического профиля.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Курбанов, И.С., Сулейманова, С.Д., Гаджиев, А.А. Изучение роста и развития подвоев косточковых культур полученных методом *in vitro* // - Баку: Аграрная наука Азербайджана, - 2016. №5, - с. 32-34.

2. Сулейманова, С.Д. Микрклональное размножение плодовых культур (обзор) // - Варшава: Восточно-Европейский Научный Журнал, - 2016. №11, - с. 47-54.

3. Сулейманова, С.Д. Биотехнология - основа получения безвирусного посадочного материала винограда // Материалы международной научно-практической конференции "Проблемы обеспечения продовольственной безопасности независимого Азербайджанского Государства и повышения конкурентоспособности аграрной сферы", - Баку: - 1-2 июня, - 2018, - с. 761-764.

4. Сулейманова, С.Д. Введение в культуру *in vitro* сортов винограда народной селекции Мадраса и Баян Ширей // Материалы республиканской научно-практической конференции "Академик Джалал Алиев и генетические ресурсы биологического разнообразия", - Гянджа: - 30 июня 2018, - с. 154-158.

5. Сулейманова, С.Д. Клональное микроразмножение плодовых культур в развитии // - Баку: Аграрная наука Азербайджана, - 2018. №3, - с. 182-188.

6. Сулейманова, С.Д. Технология получения клоновых подвоев GF677 и Garnet применительно к Губа-Хачмазскому региону // - Москва: Аграрная наука, - 2018. №3, - с. 73-75.

7. Süleymanova, S.C., Əhmədli, N.M. Çəyirdəkli meyvə bitkiləri calaqahtılarının mikroklonal çoxaldılması zamanı proliferasiyanın intensivliyinə fitohormonların təsiri // - Bakı: Azərbaycan Aqrar Elmi, - 2018. №5, - s. 74-76.

8. Сулейманова, С.Д. Технология получения клонового подвоя Myrobalan 29С применительно к Губа-Хачмазскому региону // - Гянджа: Сборник известий Гянджинского отделения НАНА, - 2018. №2(72), - с. 127-133.

9. Suleimanova, S.J. Efficacy of introduction in culture in vitro of grapevine of Azerbaijani varieties Madrasa and Bayan Shira // Innovations in Biology and Agriculture to Solve Global Challenges/ - Baku: 31 october, 2018. - p. 102.

10. Сулейманова, С.Д. Сравнительная оценка эффективности питательных сред при введении в культуру in vitro подвоя МаксМа 14 // - Гянджа: Сборник известий Гянджинского отделения НАНА, - 2019. - №2(76), - с. 33-38.

11. Сулейманова, С.Д. Эффективность антибиотиков в оздоровлении микроклонов подвоев МахМа 14, GF 677, Myrobalan 29С от инфекций различной этиологии // Москва: Аграрная наука, - 2019. №5, - с.75-78.

12. Сулейманова, С.Д. Воздействие питательной среды Гамборга на морфологическое развитие некоторых подвоев косточковых культур на этапе укоренения in vitro // Материалы XXXVI-XXXVII международной научно-практической конференции "Экспериментальные и теоретические исследования в современной науке", - Новосибирск: апрель 2019. №6-7(33), - с. 42-46.

13. Süleymanova, S.C., Balazadə, Ç.F. Bitkilərin mikroklonal çoxaldılmasının əsas üsulları // - Gəncə: ADAU-nun elmi əsərləri, - 2019. №4, - s. 34-38.

14. Сулейманова, С.Д., Кухарчик, Н.В. Методические указания по проведению лабораторных работ при микроразмножении плодовых и ягодных культур in vitro // Баку: Муаллим, - 2020. - 42 с.

Защита состоится "26" мая 2021-го года в 14⁰⁰

на заседании Диссертационного совета FD 1.29 действующего на базе Научно-Исследовательского Института Земледелия.

Адрес: AZ1098, Азербайджанская Республика, г.Баку, пос. Пиршаги, Совхоз №2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Научно-Исследовательского Института Земледелия.

Электронная версия диссертации и автореферата размещена на официальном сайте Научно-Исследовательского Института Земледелия.

Автореферат разослан по соответствующим адресам "23"
апреля 2021-го года

Подписано в печать: 15.04.2021
Формат бумаги: 210x148 мм
Объем: 36 765 знаков
Тираж: 70