

УДК 634.23:581.143.6:001.891

DOI 10.30679/2219-5335-2020-3-63-107-120

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ
СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ
СВОБОДНЫХ ОТ САПРОФИТНОЙ
МИКРОФЛОРЫ ЗАРОДЫШЕЙ
РОДА *PRUNUS* L.
ДЛЯ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO*¹**

Коваленко Наталья Николаевна
д-р биол. наук
ведущий научный сотрудник
зав. лабораторией биотехнологии
и биохимии
e-mail: kross67@mail.ru

Поливарова Надежда Васильевна
младший научный сотрудник
лаборатории биотехнологии
и биохимии

*Крымская опытно-селекционная
станция – филиал Федерального
государственного бюджетного
научного учреждения «Федеральный
исследовательский центр Всероссийский
институт генетических ресурсов
растений им Н.И. Вавилова»,
Крымск, Россия*

В работе представлен обзор литературных данных о стерилизующих агентах, используемых в биотехнологии. Рассмотрены особенности их воздействия на объект исследования, отмечено негативное влияние данных агентов на организм исследователя. Изучено влияние хлорсодержащих препаратов, таких как бытовой – Белизна, NAZ-TABS, Део Хлор с различной концентрацией водных растворов и различного времени воздействия на искоренение сапротифной микрофлоры семян при вводе их в культуру *in vitro*. По результатам опытов проведён учёт количества

UDC 634.23:581.143.6:001.891

DOI 10.30679/2219-5335-2020-3-63-107-120

**IMPROVEMENT
OF THE METHOD OF OBTAINING
THE GENUS *PRUNUS* L.
SAPROPHYTIC MICROFLORA
FREE EMBYOUS
FOR *IN VITRO* CULTURE¹**

Kovalenko Natalia Nikolaevna
Dr. Sci. Biol.
Leading Research Associate
Head of Biotechnology
and Biochemistry Laboratory
e-mail: kross67@mail.ru

Polivara Nadezhda Vasilievna
Junior Research Associate
of Biotechnology
and Biochemistry laboratories

*Krymsk Experiment Breeding
Station – Branch of Federal
State Budgetary
Scientific Institution «Federal
Research Center the N. I. Vavilov
All-Russian Institute
of Plant Genetic Resources»,
Krymsk, Russia*

The paper presents a review of the literature on sterilizing agents used in biotechnology. The features of their impact these agents on the object of study and the negative impact on the researcher's body are considered. The effect of chlorine-containing preparations such as Belizna, NAZ-TABS, Deo Chlor in various concentrations of aqueous solutions and various times of exposure of sweet cherries and cherries to the eradication of saprophytic microflora of the seed when introduced into an *in vitro* culture was studied. According to the results of the experiments,

¹ Работа выполнена на коллекции генетических ресурсов растений ВИР (VIR Collections of Plant Genetic Resources) в рамках государственного задания ВИР (бюджетный проект № 0662-2019-0004).

¹ The work was performed on the collection of genetic resources of plants VIR (VIR Collections of Plant Genetic Resources) within the framework of the state assignment of VIR (budget project No. 0662-2019-0004).

инфицированных, а также определён процент жизнеспособных зародышей черешни и вишни. При этом учитывались обожжённые воздействием химпрепаратов «стекловидные» и потемневшие ядра. Установлено, что обработка семян сортов *Prunus cerasus* L. только хлорсодержащими препаратами в небольших концентрациях малоэффективна. Увеличение концентрации хлорсодержащих препаратов приводит к частичному повреждению ядер, что сказывается отрицательно на выходе сеянцев. Показана значительная эффективность применения последовательной стерилизации семян черешни и вишни при вводе в культуру *in vitro* препаратами с различной химической основой. Выявлено оптимальное время стерилизации и действующие вещества для воздействия на семена изучаемых сортов черешни и вишни. Это водный раствор Део Хлор (10 и 8 минут, соответственно) с дополнительным использованием перекиси водорода (3 %) в течение 2-3 минут. Такой поэтапный способ стерилизации обусловил выход жизнеспособных зародышей для дальнейшего культивирования *in vitro* на уровне 75-77,5 % у вишни и 82,5 % у черешни.

Ключевые слова: МИКРОФЛОРА, ЗАРОДЫШИ, *IN VITRO*, ЧЕРЕШНЯ, ВИШНЯ ОБЫКНОВЕННАЯ, СТЕРИЛИЗАЦИЯ

the number of infected embryos was recorded, and the percentage of viable sweet cherry and cherry embryos was also determined. In this case, burned from the effects of chemicals, "glassy" and darkened nuclei were taken into account. It was found that treating the seeds of *Prunus cerasus* L. varieties only with chlorine-containing preparations in low concentrations is ineffective. An increase in the concentration of chlorine-containing drugs leads to partial damage of the kernels, which affects the seedlings output. Significant efficiency of sequential sterilization of sweet cherry and cherry seeds was shown when introduced into the culture *in vitro* with preparations with different chemical bases. The optimal sterilization time and active substances for exposure to seeds of studied sweet cherries and cherries were revealed. This is an aqueous solution of Deo Chlor (10 and 8 minutes, respectively) with the additional use of hydrogen peroxide (3%) for 2-3 minutes. Such a phased sterilization method determined the yield of viable embryos for further *in vitro* cultivation at the level of 75-77,5 % in cherries and 82,5 % in sweet cherries.

Key words: MICROFLORA, NUTRITION, *IN VITRO*, CHERRY, CHERRY ORDINARY, STERILIZATION

Введение. Метод культивирования зародышей *in vitro* уже несколько десятилетий занимает важное место при разработке селекционных программ по черешне и вишне как в России [1-7], так и за рубежом [8-12]. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что на получение жизнеспособных зародышей в культуре влияют генотип вводимого экспланта, состав искусственной питательной среды, сроки ввода в культуру, а также способ поверхностной стерилизации вводимого в культуру растительного материала. В практической биотехнологии ведётся борьба с бак-

териями, грибами и другими микроорганизмами, которые повсеместно распространены в окружающей нас среде и обладают весьма выраженной способностью адаптироваться к различным условиям.

При культивировании зародышей косточковых плодовых культур рода *Prunus* L., в частности сортов черешни и вишни, *in vitro* необходимо соблюдать определенные правила асептики. Это связано с тем, что на растительных тканях плода, косточки и ядра (их поверхности) всегда есть сапрофитная микрофлора, которая, зачастую, служит источником заражения зародыша вредоносными микроорганизмами. При вводе в культуру *in vitro*, вследствие плохой обработки зародыша, она может перенестись на питательную среду. В последующем, размножаясь на ней, микроорганизмы могут даже «подавить» зародыш.

Применение наработок микробиологической науки в области практической стерилизации в биотехнологии в значительной степени обусловило снижение гибели эксплантов от заражения микроорганизмами на этапе ввода в культуру и последующих этапов культивирования в условиях светозала и, в конечном итоге, привело к увеличению выхода посадочного материала для культивирования *in vitro*. Микроорганизмы, в своем большинстве, очень чувствительны к высоким температурам и воздействию химических веществ. В связи с этим, при работе с культурой растительной ткани в обязательном порядке используется стерилизация рабочих инструментов (скальпелей, препаровальных игл и т.п.), химической посуды в сухожарочном шкафу при температуре 140 °С в течение 90 минут, а также пастеризация питательной среды в автоклаве при оптимальном давлении в одну атмосферу (в течение 15-30 мин.) [7, 13].

Для санации растительных объектов используются различные химические вещества. В зависимости от физико-химического состава раствора, его концентрации, продолжительности контакта и температуры они оказывают на микроорганизмы различное влияние, как и на жизнеспособность

зародыша, вводимого в культуру *in vitro*. Чтобы найти наилучшее соотношение критерия успешности обеззараживания и жизнеспособности растительных объектов для дальнейшего культивирования необходимо учитывать знания о бактерицидных характеристиках химических веществ. По их воздействию принято подразделять эти вещества на поверхностно-активные, красители, фенолы (и их производные), соли тяжелых металлов, окислители и группу формальдегида [14]. Одни из них останавливают размножение бактерий, другие задерживают обмен веществ и третьи убивают их.

Химпрепараты третьего действия (или бактерицидного) необходимы в качестве дезинфицирующих средств – антисептиков. Подобные вещества в микробиологии делятся на несколько групп [15]. К первой относятся тяжелые металлы (ртуть, свинец, медь, серебро и т.д.) и их соли. Они вызывают очень быструю коагуляцию цитоплазмы [16]. В биотехнологии в XX веке пользовались водными и водноспиртовыми растворами йодида ртути (HgI_2), а также сулемы ($HgCl_2$) как поверхностно стерилизующими веществами, которые очень токсичны и уже в концентрации 0,1 %, убивали растительные ткани за 30 мин. воздействия [16].

Вторая группа антимикробных веществ – окислители, они вызывают резкое усиление окислительных процессов в цитоплазме, приводящее к отмиранию клетки. К ним относятся: марганцовокислый калий, йод, хлорная известь, перекись водорода. Следует отметить, что перекись водорода относится к реактивным формам кислорода и играет защитную роль в качестве бактерицидного агента, обеспечивающего антисептический эффект в отношении бактерий, таких как клостридии (*Clostridium*) вида золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*), которые легко обнаруживаются в полости рта и на коже рук у 40 % населения [17]. В настоящее время они наиболее часто используются биотехнологами, в отличие от веществ третьей группы, к которой относятся: хлороформ, формальдегид, толуол, фенол (карбоновая кислота), креазол и т.п.

Особую группу бактерицидных и бактериостатических органических веществ составляют антибиотики – продукты жизнедеятельности микробов, угнетающие или убивающие другие их виды. В биотехнологии при приготовлении питательных искусственных сред иногда антибиотики вводят в их состав [14, 15].

Таким образом, для поверхностной стерилизации растительных объектов, вводимых в культуру *in vitro*, существует целый ряд применяемых веществ, но наиболее часто биотехнологами использовались: гипохлорид кальция и натрия, диацид и йодид ртути, а также сулема [1, 2, 6, 16, 18, 19].

Наибольшее распространение при поверхностной стерилизации растительных объектов для дальнейшего использования их в качестве эксплантов в культуре до 2000-х годов получили водные растворы ртути содержащих препаратов. Однако с 16 августа 2017 начала действовать Минаматская конвенция по ртути, призванная защищать здоровье людей и окружающую среду от вредного воздействия ртути. Эта Конвенция не только регулирует использование ртути, но и предусматривает запрет производства, экспорта и импорта ртутьсодержащих продуктов к 2020 году.

Существующий список токсичных препаратов, запрещенных к использованию с 2018 года, в который вошло большинство стерилизующих веществ и не содержащих ртути, также диктует поиск новых, менее токсичных поверхностно стерилизующих препаратов, оптимальных для использования в биотехнологии при выращивании растений *in vitro*.

Объекты и методы исследований. Подбор эффективных и безопасных стерилизаторов для санации косточек и ядер сортов черешни и вишни проводился в лаборатории биотехнологии и биохимии Крымской ОСС филиала ВИР с 2013 по 2019 гг. В опытах были использованы различные экспозиции обработок семян водными растворами хлорсодержа-

щих препаратов («Белизна» – бытовой препарат, таблетки NAZ-TABS и Део Хлор) и перекиси водорода. Оценка качества препарата производилась по инфицированности на этапе ввода в культуру и проценту выхода жизнеспособных для культуры *in vitro* зародышей через 10 дней. Повторность опыта трехкратная, по 20 семян (пробирок) одна повторность.

В исследованиях руководствовались методическими рекомендациями А.И. Здруйковской-Рихтер [1,20], Н.В. Кухарчик [2], Н.Н. Коваленко [6], Н.Н. Коваленко, Н.В. Поливара [7].

В качестве исходного материала были использованы косточки от опыления сортов черешни раннего срока созревания (Ярославна, Ласточка, Утренняя звезда, Краснодарская ранняя, Валерий Чкалов, Эйфория (Восход), №14-11, Крупноплодная) и сортов вишни (Игрушка, Любская, Тургеневка, Шишевская).

Обсуждение результатов. Целью наших исследований была разработка оптимальных условий получения асептической культуры для технологии культивирования зародышей сортов черешни (*Pr. avium* L.) и вишни обыкновенной (*Cerasus vulgaris* Mill.) *in vitro*. Новизна исследования связана с тем, что на сегодняшний день недостаточно изучены безопасные для здоровья человека стерилизаторы, которые могли бы быть эффективными для санации косточек и ядер плодовых культур для культивирования их *in vitro*. Ранее применялись сильнодействующие препараты, относящиеся к первой группе, которые обладают свойствами стерилизовать «одним ударом» – «*therapia sterilisans magna*», в настоящее время запрещенных, что требует поиска альтернативы.

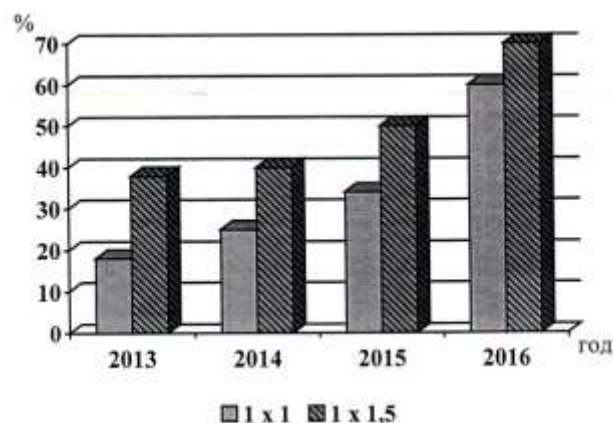
В ходе проведенных исследований прошлых лет была отработана лабораторная технология, позволяющая работать нам в условиях асептики. Она предусматривает: мытье и сушку химической посуды, скальпелей, пинцетов, и др., необходимых для работы инструментов, сухим жаром, а

также – стерилизацию искусственных питательных сред под давлением в автоклаве и ввод в культуру *in vitro* в условиях ламинар-бокса зародышей, свободных от сапрофитной микрофлоры.

Стерилизация зародышей производилась по следующей схеме: обработка мыльным водным раствором плодов при комнатной температуре и выделенных косточек → 1,5 часовая промывка их проточной водой → непосредственная стерилизация косточек и семян → пятикратная промывка стерильной дистиллированной водой с экспозицией по пять минут. На оптимизацию предпоследнего этапа – стерилизацию косточек и семян при вводе в культуру зародышей были направлены данные исследования.

В связи с тем, что наиболее доступным из хлорсодержащих препаратов в начале 2000-х годов был бытовой (коммерческий) препарат «Белизна», то именно он и использовался в наших опытах в период 2013-2016 гг. при стерилизации зародышей черешни и вишни. Отработывали два варианта объемного соотношения его со стерильной дистиллированной водой (1:1 и 1:1,5) при времени экспозиции 10 минут. На одну повторность брали 20 семян и высаживали их на агаризированную питательную среду, разработанную нами для этих культур [6, 7]. Через 10 дней производили подсчет инфицированных зародышей и таким образом судили об эффективности действия стерилизатора.

Анализ динамики инфицированности зародышей в зависимости от года и концентрации водного раствора препарата «Белизна» в наших опытах показал возрастание инфицированности коллекционных образцов, связанной с накоплением инфекционного фона, а также с переносом инфекции при искусственном опылении с пылью других сортов (рис. 1). Процент инфицированных зародышей возрос за этот период от 18 % в 2013 году до 57 % в 2016 году при концентрации действующего препарата в водном растворе 1:1 и временем экспозиции 10 минут.



Примечание: объёмное соотношение препарата «Белизна»: 1:1;1:1,5

Рис. 1. Количество инфицированных зародышей черешни и вишни (в среднем) в зависимости от года

С 2017 года в опыты был включен другой хлорсодержащий препарат NAZ-TABS – дигитратнатриевая соль дихлоризоциановой кислоты. В опытах было использовано три варианта обработки семян, отличающихся по времени воздействия: 10 мин, 15 мин и 17 мин. одинаковой подобранной концентрации раствора 4,75 г на 500 мл H₂O. Поскольку все сорта черешни и вишни реагировали одинаково на воздействие препарата и его экспозицию на этапе ввода в культуру *in vitro*, то учитывались средние значения количества инфицированных зародышей по сортам. При экспозиции 10 мин. число инфицированных зародышей черешни составило 59,0 % в течение 15 мин. и 55,0 % в течение 17 мин. (табл. 1).

Таблица 1 – Количество инфицированных зародышей сортов черешни и вишни на этапе ввода в культуру *in vitro* в зависимости от экспозиции обработки препаратом NAZ-TABS, 2017 г.

| Время экспозиции, минут | Количество инфицированных зародышей, % | |
|-------------------------|--|-------|
| | черешня | вишня |
| 10 | 70,1 | 75,0 |
| 15 | 59,0 | 60,1 |
| 17 | 55,0 | 54,5 |

Наиболее оптимальной, по данным опыта, была экспозиция воздействия раствора препарата NAZ-TABS в течение 17 минут как на зародыши черешни, так и на вишню, но выход жизнеспособных эксплантов для даль-

нейшего культивирования был низким (45 %), в связи с чем, начиная с 2018 года в опыты по стерилизации наряду с бытовым препаратом «Белизна» (контроль) был включен Део Хлор (таблетки). Водные растворы на основе бидистиллированной воды готовились заранее: «Белизна» в соотношении 1:4; Део Хлор – 3,4 г на 210 мл воды (стандарт обработки).

Зависимость выхода жизнеспособных зародышей сортов вишни и черешни (в среднем) от стерилизующего препарата и времени экспозиции после скарификации и высадки на агаризированные среды представлена в таблицах 2 и 3.

Таблица 2 – Зависимость выхода жизнеспособных зародышей сортов вишни от стерилизующего препарата и экспозиции, 2018 г.

| Водный раствор препарата | | | |
|--------------------------|--|------------------------|--|
| Белизна (К) | | Део Хлор | |
| время экспозиции, мин. | количество жизнеспособных зародышей, % | время экспозиции, мин. | количество жизнеспособных зародышей, % |
| 5 | 25,0 | 5 | 45,0 |
| 10 | 45,0 | 8 | 70,0 |
| 15 | 30,0 | 10 | 55,0 |

Таблица 3 – Зависимость выхода стерильных и жизнеспособных зародышей сортов черешни от стерилизующего препарата и экспозиции, 2018 г.

| Водный раствор препарата | | | |
|--------------------------|--|------------------------|--|
| Белизна (К) | | Део Хлор | |
| время экспозиции, мин. | количество жизнеспособных зародышей, % | время экспозиции, мин. | количество жизнеспособных зародышей, % |
| 5 | 42,5 | 5 | 52,5 |
| 10 | 50,0 | 8 | 60,0 |
| 15 | 55,0 | 10 | 70,0 |

Результаты опытов по подбору времени стерилизации и самого действующего препарата для сортов вишни и черешни оказались неоднозначными. Так, для зародышей сортов вишни наиболее оптимально время воздействия препарата «Белизна» в течение 10 мин., при выходе жизнеспособных зародышей 45 %, а также 8 мин. – Део Хлор (70 %). Более длитель-

ное воздействие и того и другого препарата вело к уменьшению числа жизнеспособных зародышей – 30 % и 55 %, соответственно.

Для сортов черешни при воздействии раствором «Белизна» в течение 15 мин. характерен максимальный выход жизнеспособных зародышей – 55 %, и в количестве 70 % при воздействии раствором Део Хлор в течение 10 мин. Но и в этом и в другом случае действие водного раствора Део Хлор существенно влияет на выход жизнеспособных зародышей (до 70 %).

Опыты по совершенствованию способа получения свободных от сапрофитной микрофлоры зародышей как черешни, так и вишни были продолжены в 2019 году. Был использован двухкомпонентный способ воздействия на них. Он заключается в следующем: поэтапная обработка действующими веществами при стерилизации семян (ядер): вначале воздействием водного раствора Део Хлор, а затем перекисью водорода (3 %). Опыты различались временем воздействия: водным раствором Део Хлор (3,4 г на 210 мл бидистиллированной воды) в течение пяти, восьми и десяти минут с последующей трехкратной промывкой в бидистиллированной воде; воздействием перекисью водорода (3 %) в течение одной, двух или трех минут. Результаты опытов отражены в таблице 4.

Таблица 4 – Зависимость выхода жизнеспособных зародышей сортов вишни и черешни от воздействия двухкомпонентной стерилизации на ядро (в среднем)

| Время обработки (мин.) препаратом | | Количество жизнеспособных, % |
|-----------------------------------|-------------------|------------------------------|
| Део Хлор | Перекись водорода | |
| 1 | 2 | 3 |
| <i>зародыши вишни</i> | | |
| 5 | 1 | 45,0 |
| 5 | 2 | 47,5 |
| 5 | 3 | 50,0 |
| 8 | 1 | 70,0 |
| 8 | 2 | 77,5 |
| 8 | 3 | 75,0 |
| 10 | 1 | 52,5 |
| 10 | 2 | 65,0 |
| 10 | 3 | 60,0 |

| 1 | 2 | 3 |
|-------------------------|---|------|
| зародыши черешни | | |
| 5 | 1 | 47,5 |
| 5 | 2 | 62,5 |
| 5 | 3 | 52,5 |
| 8 | 1 | 57,5 |
| 8 | 2 | 72,5 |
| 8 | 3 | 65,5 |
| 10 | 1 | 72,5 |
| 10 | 2 | 82,5 |
| 10 | 3 | 77,5 |

Для стерилизации семян вишни при высадке их *in vitro*, как показали результаты вышеприведенных опытов, наиболее подходящим было воздействие на них в течение 8 минут водным раствором Део Хлор с последующей трехкратной помывкой семян бидистиллированной водой, а затем замачивание их в перекиси водорода (3 %) в течение 2 и 3 мин. В этих случаях был наиболее высокий выход стерильных жизнеспособных зародышей – на уровне 75,0 % и выше (77,5%). Для зародышей черешни лучшим временем экспозиции было сочетание воздействия 10 минут – Део Хлор и 2 минуты – перекись водорода, при этом выход жизнеспособных зародышей был довольно высоким и составил 82,5 %.

Выводы. Основываясь на литературных данных по стерилизующим агентам и исходя из того, что такие сильнодействующие на патогенные микроорганизмы агенты как йодид ртути, сулема и им подобные попали в список токсичных препаратов, запрещенных к использованию с 2018 г., а инфицированный фон без химобработок в коллекционных и селекционных посадках косточковых культур, на примере сортов *P.cerasus* L., возрастает, очевидна необходимость совершенствования способа получения свободных от сапрофитной микрофлоры зародышей.

За период исследований (2013-2019 гг.) в качестве основного действующего вещества был использован препарат Белизна в различных concentra-

циях, а также другие хлорсодержащие NAZ-TABS и Део Хлор. Показано, что для работы с культурой зародышей косточковых, таких как черешня и вишня, можно рекомендовать в качестве поверхностной стерилизации Део Хлор в концентрации 3,4 г на 210 мм воды с экспозицией 8 мин для зародышей вишни и 10 мин. для черешни (70 % жизнеспособных зародышей).

Предложена двухступенчатая стерилизация зародышей сортов черешни и вишни, с последовательным использованием препаратов с различной химической основой, поскольку в этом случае происходит воздействие на разные группы (бактерий и грибов) микроорганизмов.

Подобраны стерилизующие агенты – хлорсодержащий препарат (Део Хлор) и перекись водорода в данной последовательности, их концентрации в водном растворе и время воздействия на ядро (семя) с высоким процентом жизнеспособных зародышей. Для зародышей вишни наиболее оптимально время воздействия препаратом Део Хлор 8 минут, для черешни – 10 минут. Выход жизнеспособных зародышей повышается при дополнительном воздействии перекисью водорода (3 %) в течение 2-3 минут – до 77,5-82,5 % от общего количества, введённых в культуру *in vitro*.

Литература

1. Здруйковская-Рихтер А.И. Культура зародышей в искусственных условиях как метод селекции ранозревающих сортов черешни, персика и груши // Науч. тр. ГНБС. М., 1964. Т. 37. С. 256–259.
2. Кухарчик Н.В., Кастрицкая М.С., Пугачева Р.М. Методика культивирования изолированных зародышей вишни и сливы // Плодоводство: науч. тр. Т.18(2). Самохваловичи: Ин-т плодоводства НАН Беларуси. 2006. С. 157-162.
3. Ковальчук И.Ю., Чуканова И.И. Получение раннеспелых сортов плодовых культур методом доразвивания недоразвитых зародышей *in vitro* // Материалы Респ. науч.-практ. конф. по картофелеводству и овощеводству в Казахстане. Кайнар, 1997. С. 18-19.
4. Захарченко В.В., Бунцевич Л.А. Использование культуры изолированных зародышей черешни в селекции на раннеспелость // Генетические ресурсы культурных растений : тез. докл. междунар. науч.-практ. конф. Санкт-Петербург, 13-16 ноября 2001 г. СПб., 2001. С. 287-288.
5. Коваленко Н.Н., Гладких С.В. Культивирование зародышей *in vitro* гибридов ранозревающих сортов черешни (*Prunus avium* L.). // Вавиловский журнал генетики и селекции. СПб., 2019. Т. 23(6). С. 765-771. DOI 10.18699/VJ19.550

6. Коваленко Н.Н. Биотехнологические методы в селекции плодовых культур // Современные методология, инструментарий оценки и отбора селекционного материала садовых культур и винограда. Краснодар: СКФНЦСВВ, 2017. С. 164-181.

7. Коваленко Н.Н., Поливара Н.В. Использование культуры зародышей *in vitro* для получения ранозревающих сортов черешни и ее отдаленных гибридов: методические указания. Крымск: Филиал Крымская ОСС ВИР, 2016. 39 с.

8. Balla I., Brozik S. Embryo culture of sweet cherry hybrids // Acta Hort. 1996; 410:385-386. DOI:10.17660.

9. Effect of embryo development on *in vitro* germination of early ripening varieties in sweet cherry (*Prunus avium* L.) / J. Dulic, M. Miodragovic, G. Barac, V. Ognjanov // Agr. J. 2016:1-6. DOI 10.1007/s10341-016-0265-y.

10. Standardi A. Encapsulation: promising technology for nurseries and plant tissue laboratories // AgroLife J. 2012;1(1):48-54.

11. Stanys V. In vitro techniques to increase the output of cherry seedlings from early-ripening parents // Acta Hort. 1998;468:203-208.

12. In vitro embryo culture of some sweet cherry genotypes / A. Asanica, V. Tudor, C. Plopa, V. Sumedrea, A. Peticila, R. Teodorescu, V. Tudor // Agriculture and Agricultural Science Procedia 10(2016) 172-177. 5th International Conference «Agriculture for Life. Life for Agriculture».

13. Тимофеева С.Н., Смолькина Ю.В., Апанасова Н.А., Юдакова О.И. Технологии микроразмножения *in vitro* : учеб.-метод. пособие. Саратов: Саратовский ГУ, 2016. 38 с.

14. Пяткин К.Д. Микробиология с вирусологией и иммунологией. Изд. 3-е перераб. М.: Медицина. 1971. 352 с.

15. Викторов Д.П., Чурикова В.В. Основы микробиологии. Воронеж: Изд-во Воронежского ин-та, 1975. 180 с.

16. Подорожный В.Н. Иодид ртути как поверхностно-стимулирующее вещество в работе с культурой ткани плодовых растений // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. СПб., 1998. Т.153. С. 69-72.

17. Kluytmans J., Belkum A., Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1997; 10(3):505-520.

18. Курсаков Г.А., Зоточкина Т.В. Методические рекомендации по применению искусственной культуры тканей и органов в генетико-селекционных работах с плодами: метод. указания. Мичуринск: ЦГЛ, 1987. 60 с.

19. Voxus Ph., Quolrin M., Zaine I.M. Large scale propagation of strawberry plants tissue culture // Applied and Fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Reinert. I and Bajaj. V.P.S. Springer -Verlag. Berlin, Heidelberg. New York, 1977. P. 130-143.

20. Здруйковская-Рихтер А.И. Культура изолированных зародышей и некоторые другие приемы выращивания растений *in vitro*: методические рекомендации. М., 1962. 62 с.

References

1. Zdrujkovskaya-Rihter A.I. Kul'tura zarodyshej v iskusstvennyh usloviyah kak metod selekcii ranosozrevayushchih sortov chereschni, persika i grushi // Nauch. tr. GNBS. M., 1964. T. 37. S. 256–259.

2. Kuharchik N.V., Kastrickaya M.S., Pugacheva R.M. Metodika kul'tivirovaniya izolirovannyh zarodyshej vishni i slivy // Plodovodstvo : nauch. tr. T.18(2). Samohvalovichi: In-t plodovodstva NAN Belarusi. 2006. S. 157-162.

3. Koval'chuk I.Yu., Chukanova I.I. Poluchenie rannespelyh sortov plodovyh kul'tur metodom dorashchivaniya nedorazvityh zarodyshej *in vitro* // Materialy Resp. nauch.-prakt. konf. po kartofelevodstvu i ovoshchevodstvu v Kazahstane. Kajnar, 1997. S. 18-19.

4. Zaharchenko V.V., Bunceovich L.A. Ispol'zovanie kul'tury izolirovannyh zarodyshej chereszni v selekcii na rannospelost' // Geneticheskie resursy kul'turnyh rastenij : tez. dokl. mezhdunar. nauch.-prakt. konf. Sankt-Peterburg, 13-16 noyabrya 2001 g. SPb., 2001. S. 287-288.

5. Kovalenko N.N., Gladkih S.V. Kul'tivirovanie zarodyshej *in vitro* gibridov ranosozrevayushchih sortov chereszni (*Prunus avium* L.). // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. SPb., 2019. T. 23(6). S. 765-771. DOI 10.18699/VJ19.550

6. Kovalenko N.N. Biotekhnologicheskie metody v selekcii plodovyh kul'tur // Sovremennye metodologiya, instrumentarij ocenki i otbora selekcionnogo materiala sadovyh kul'tur i vinograda. Krasnodar: SKFNCSVV, 2017. S. 164-181.

7. Kovalenko N.N., Polivara N.V. Ispol'zovanie kul'tury zarodyshej *in vitro* dlya polucheniya ranosozrevayushchih sortov chereszni i ee otdalennyh gibridov: metodicheskie ukazaniya. Krymsk: Filial Krymskaya OSS VIR, 2016. 39 s.

8. Balla I., Brozik S. Embryo culture of sweet cherry hybrids // Acta Hort. 1996; 410:385-386. DOI:10.17660.

9. Effect of embryo development on *in vitro* germination of early ripening varieties in sweet cherry (*Prunus avium* L.) / J. Dulic, M. Miodragovic, G. Barac, V. Ognjanov // Agr. J. 2016:1-6. DOI 10.1007/s10341-016-0265-y.

10. Standardi A. Encapsulation: promising technology for nurseries and plant tissue laboratories // AgroLife J. 2012;1(1):48-54.

11. Stanys V. *In vitro* techniques to increase the output of cherry seed-lings from early-ripening parents // Acta Hort. 1998;468:203-208.

12. *In vitro* embryo culture of some sweet cherry genotypes / A. Asanica, V. Tudor, C. Plopa, V. Sumedrea, A. Peticila, R. Teodorescu, V. Tudor // Agriculture and Agricultural Science Procedia 10(2016) 172-177. 5th International Conference «Agriculture for Life. Life for Agriculture».

13. Timofeeva S.N., Smol'kina Yu.V., Apanasova N.A., Yudakova O.I. Tekhnologii mikrorazmnozheniya *in vitro* : ucheb.-metod. posobie. Sa-ratov: Saratovskij GU, 2016. 38 s.

14. Pyatkin K.D. Mikrobiologiya s virusologiej i immunologiej. Izd. 3-e pererab. M.: Medicina. 1971. 352 s.

15. Viktorov D.P., Churikova V.V. Osnovy mikrobiologii. Voronezh: Izd-vo Voronezhskogo in-ta, 1975. 180 s.

16. Podorozhnyj V.N. Iodid rtuti kak poverhnostno-stimuliruyushchee veshchestvo v rabote s kul'turoj tkani plodovyh rastenij // Tr. po prikl. botanike, genetike i selekcii. SPb., 1998. T.153. S. 69-72.

17. Kluytmans J., Belkum A., Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1997; 10(3):505-520.

18. Kursakov G.A., Zotochkina T.V. Metodicheskie rekomendacii po primeneniyu iskusstvennoj kul'tury tkanej i organov v genetiko-selekcionnyh rabotah s plodovymi: metod. ukazaniya. Michurinsk: CGL, 1987. 60 s.

19. Boxus Ph., Quolrin M., Zaine I.M. Zarge scale propagation of strawberry plants tissue culture // Applied and Fundament aspects of plant cell, tissue and organ culture. Reinert. I and Bajaj. V.P.S. Springer -Verlag. Berlin, Heidelberg. New York, 1977. P. 130-143.

20. Zdrujkovskaya-Rihter A.I. Kul'tura izolirovannyh zarodyshej i nekotorye drugie priemy vyrashchivaniya rastenij *in vitro*: metodicheskie rekomendacii. M., 1962. 62 s.