

УДК 634.8

## ПУТИ СНИЖЕНИЯ СЕБЕСТОИМОСТИ ПРОИЗВОДСТВА ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

### WAYS TO REDUCE THE COST OF PRODUCTION OF PLANTING MATERIAL IN VITRO

*В.Г. Пузырнова, Н.П. Дорошенко*

*V.G. Puzirnova, N.P. Doroshenko*

Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия имени Я.И. Потапенко – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный Ростовский аграрный научный центр», Новочеркасск, Россия, e-mail: valentina.puzirnova@yandex.ru

All-Russian Research Ya.I. Potapenko Institute for Viticulture and Winemaking – branch of Federal State Budget Scientific Institution «Federal Rostov Agricultural Research Center», Novocheerkassk, Russia, e-mail: valentina.puzirnova@yandex.ru

**Аннотация.** Представлены новые данные об эффективности использования коллекции винограда *in vitro* для выращивания оздоровленного посадочного материала. Коллекция поддерживается в условиях *in vitro* в лаборатории биотехнологии Всероссийского НИИ виноградарства и виноделия имени Я.И. Потапенко – филиале ФГБНУ «Федеральный Ростовский аграрный научный центр» путем снижения числа субкультивирований. Одно из направлений исследований лаборатории – поиск способов поддержания коллекции в условиях замедленного роста, что позволяет снизить стоимость содержания и способствует сохранности растений. Результаты исследований показали, что выращивание посадочного материала (микрорастений *in vitro*) винограда на основе коллекции более рентабельно, чем по полному циклу (от взятия экспланта до получения посадочного материала *in vitro*).

**Summary.** New data on the effectiveness of using the *in vitro* vine collection for growing healthy planting material are presented. The collection is maintained *in vitro* in the biotechnology laboratory of the All-Russian Research Institute for Viticulture and Winemaking named after Ya.I. Potapenko – branch of FSBSI «Federal Rostov Agricultural Research Center» by reducing the number of subcultivations. One of the directions of the laboratory's research is the search for ways to maintain the collection in conditions of slow growth, which reduces the cost of maintenance and contributes to the preservation of plants. This article presents data that the cultivation of vine planting material (micro-plants *in vitro*) based on the collection is more cost-effective than the full cycle (from excision meristem to obtaining planting material *in vitro*).

**Ключевые слова:** виноград, генофонд, коллекция *in vitro*, себестоимость посадочного материала.

**Keywords:** vine, gene pool, *in vitro* collection, the cost of planting material.

**DOI:** 10.32904/2712-8245-2023-24-27-35

**Введение.** Биотехнология сохранения растений – одно из фундаментальных и научно-практических направлений, которое в последние годы все более востребовано в плодоводстве и виноградарстве.

Традиционное вегетативное размножение имеет ограничения, потому что требуется большое количество “чистого”, не подверженного болезням посадочного материала, в то время как вегетативные побеги могут содержать патогены болезней, а именно: грибы, бактерии и вирусы.

Основное преимущество технологии культивирования тканей заключается в получении высококачественного и однородного посадочного материала, который можно размножать круглый год в стерильных условиях, независимо от сезона и погоды. В последнее время увеличился спрос на посадочный материал с применением биотехнологий [1].

Стратегия получения мериклонов и их хранения *in vitro* является на сегодняшний день практически единственным надежным способом, для оздоровления вегетативно размножаемых растений.

Однако клональное микроразмножение – дорогостоящий и трудоемкий процесс, требующий специализированного оборудования. Это ограничивает использование биотехнологий при производстве посадочного материала.

Практическое использование этого метода требует создания специализированных лабораторий с соответствующим оборудованием и привлечением высококвалифицированного персонала. Создание таких лабораторий должно быть оправдано расчетом прогнозируемой рентабельности производства.

Как отмечает О.С. Машкина и др., «основной трудностью, с которой сталкиваются исследователи в оценках себестоимости выращивания посадочного материала в культуре *in vitro*, является отсутствие справочных норм затрат времени и затрат труда на выполнение отдельных этапов» [2].

Литературные источники по данному направлению встречаются редко. Представленные затраты не имеют единого алгоритма в расчетах и не являются полными. Себестоимость единицы посадочного материала древесных пород *in vitro* варьирует в большом диапазоне (от 10 руб. до 89,45 руб.) [3].

Активно развивающееся направление исследований – поиск способов снижения затрат на производство посадочного материала *in vitro*, и содержание растений в пробирочных коллекциях.

По вопросам снижения стоимости клонального микроразмножения и содержания коллекций *in vitro* проводят международные конференции, где отдельно рассматривают возможности снижения трудозатрат, затрат на электроэнергию, затрат на компоненты культуральных сред и на дезинфицирующие средства, возможности снижения стоимости адаптации к нестерильным условиям [4].

Один из основополагающих критериев определяющих стоимость затрат на выращивание – это выход растений. К настоящему времени уже разработаны лабораторные протоколы для микроразмножения многих коммерчески важных сортов винограда [2–7]. Такие протоколы адаптированы под определенный сорт, что повышает приживаемость, и, тем самым, снижает себестоимость производства посадочного материала.

Состав питательной среды является одним из наиболее важных параметров, подлежащих анализу в биотехнологических процессах промышленного назначения, поскольку, по различным оценкам, около 30–40 % производственных затрат приходится на стоимость питательной среды [11]. В наших расчетах компоненты сред и расходные материалы составляют порядка 27 %.

Затраты на рабочую силу составляют от 40 до 60 % от общей стоимости выращенных растений [2]. Поэтому поиск способов снижения трудозатрат – актуальная задача. Необходимо сократить количество рабочей силы и повысить эффективность производительности труда, чтобы производить виноград с меньшими затратами. В этой статье мы сфокусировали свое внимание на аспекте снижения трудозатрат.

Цель наших исследований заключалась в проведении сравнительной оценки себестоимости посадочного материала винограда при разных способах его получения в культуре *in vitro*.

**Материалы и методы.** Исследования проводили по общепринятым в биотехнологии методикам Ф.Р. Уайта (1949), Р.Г. Бутенко (1964), П.Я. Голодриги и др. (1986), Н.П. Дорошенко (2012, 1992); Б.А. Доспехова (1965) в лаборатории биотехнологии Всероссийского научно-исследовательского института виноградарства и виноделия имени Я.И. Потапенко – филиал ФГБНУ ФРАНЦ. Для расчета показателей экономической эффективности применили расчетно-конструктивный метод, в основе которого методические рекомендации П.Я. Голодриги, В.А. Зленко и др. (1986) и В.И. Кашина, А.А. Борисовой и др. (2001).

Все работы в лаборатории биотехнологии проведены с соблюдением строгой стерильности. Для опытов отбирали растения, регенерированные из апикальных меристем размером  $0,1 \div 0,2$  мм и размноженные в культуре *in vitro*. В операционной комнате в ламинарном боксе «Фортран» осуществляли микрочеренкование растений. Длина микрочеренка  $10 \div 12$  мм, 1–2 мм над глазком остальные под глазком.

Полученные микрочеренки высаживали по одному в пробирку на твердую питательную среду Мурасиге и Скуга следующего состава мг/л: макроэлементы:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  138,  $\text{KNO}_3$  950,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 185,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  68,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  166; микроэлементы:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6,2,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 22,3,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,025,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,025,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8,6,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0,25, KJ 0,83; хелат железа: железо сернокисл. 7-водное- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27,8, трилон-Б- $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ -37,3; витамины-мезоинозит-50, тиамин HCl-0,2; ИУК-0,1–3 мг/л; рН среды перед автоклавированием 5,7–5,9.

Культивирование осуществляли в культуральной комнате при освещенности 3,0 тыс. люксов, фотопериоде – 16/8 часов, температуре  $25 \div 27 \pm 2^\circ\text{C}$ , влажности воздуха  $70 \div 75\%$ .

Расчеты экономической эффективности были проведены на сортах винограда Фиолетовый ранний и Каберне Совиньон.

**Обсуждение результатов.** Оздоровленный посадочный материал может быть произведен двумя способами: по полному циклу (от ввода меристемы) или на основе существующей коллекции.

В лаборатории ВНИИВиВ коллекция винограда *in vitro* поддерживается в стерильных контролируемых условиях путем сниженного числа субкультивирований (1 раз в год). Длительность периода между субкультивированиями увеличена искусственно за счет модификации питательных сред с целью экономии затрат труда при поддержании коллекции. Стоимостная оценка посадочного материала винограда в культуре *in vitro* осуществлялась в двух вариантах: по полному циклу (от ввода меристемы) и на основе коллекции *in vitro*.

В таблицах 1–3 представлены затраты на производство оздоровленного посадочного материала винограда с использованием культуры апикальных меристем, дальнейшего клонального микроразмножения и хранения мериклонов в коллекции *in vitro*. Расчет произведен на 1000 шт. растений регенерантов.

К числу преимуществ использования уже имеющейся коллекции *in vitro* относится исключение трудоемкого и сезонно зависимого начального этапа ввода в культуру.

Благодаря использованию коллекции *in vitro* для производства посадочного материала, исключаются первые семь этапов в таблице 2.

Высажено в культуру 100 апикальных меристем (приживаемость 50 %). Пересажено на среду для пролиферации 50 эксплантов (приживаемость 70 %). Пересажено на пролиферацию и срезку 35 конгломератов (средняя срезка с колбы – 15 побегов). Пересажено для укоренения 525 побегов (приживаемость 50 %); укоренились 263 побега. После микрочеренкования побегов получено 1575 пробирочных растений; приживаемость 70 %; получено 1100 пробирочных растений.

При полном цикле выращивания от ввода до первого укорененного и восстановленного растения проходит 12 месяцев. Затем микрочеренкование необходимо проводить каждые 4 месяца. Итого: 3 микрочеренкования за год.

При содержании растений в коллекции с целью снижения затрат проводят мероприятия по увеличению периода между черенкованиями, т.е. замедляют скорость роста модифицируя состав культуральных сред, либо условия культивирования. В нашей лаборатории удлинённый период между микрочеренкованиями составляет в среднем 12 месяцев – 1 микрочеренкование за год.

Предполагаемый экономический эффект складывается из снижения расходов на оплату труда, за счет исключения из схемы производства посадочного материала этапов ввода и пролиферации.

**Таблица 1.** Сводная смета затрат на выращивание 1000 растений-регенерантов по полному циклу и на основе существующей коллекции *in vitro*

№ п/п	Затраты по статьям	Сумма, тыс.руб.	
		по полному циклу	на основе существующей коллекции
1	Оплата труда Начисления на фонд оплаты труда (35,8%)	47,5 16,6	35,0 12,3
2	Оплата коммунальных услуг: – отопление и технологические нужды – потребление электроэнергии – водоснабжение помещений – содержание помещений	45,7 123,4 69,9 0,2	45,7 123,4 69,9 0,2
3	Приобретение предметов снабжения и расходных материалов: – расходные материалы – реактивы и регуляторы роста – мягкий инвентарь	95,1 18,9 7,4	95,1 18,9 7,4
4	Прочие текущие расходы на закупку товаров и оплата услуг: – текущий ремонт оборудования – текущий ремонт зданий и сооружений	5,0 10,0	5,0 10,0
	<b>Итого прямые затраты</b>	<b>437,9</b>	<b>422,9</b>
	Накладные расходы (25% от оплаты труда и начислений на ФОТ)	16,0	11,8
	<b>Стоимость затрат на выращивание 1000 растений</b>	<b>453,9</b>	<b>434,7</b>
	Себестоимость одного растения	0,45	0,43

**Таблица 2.** Технологическая карта на производство оздоровленного посадочного материала винограда через культуру апикальных меристем.

Наименование этапов и перечень работ	Ед. изм.	Объем работ	Исполнитель	Стоимость работы за один чел./день	Норма выработки	Затраты труда на объем работ, чел/дней	Общая стоимость работ, руб.
<b>Ввод эксплантов в культуру:</b>							
Подготовка посуды	шт.	100	лаборант	551,4	600	0,2	110,3
Приготовление и розлив питательной среды	шт.	100	н.сотрудник	1052,9	200	0,5	526,5
Автоклавирование	шт.	100	лаборант	551,4	повременн о	0,25	137,9
Посадка	шт.	100	ст.н.сотрудн ик	1226,1	повременн о	1	1226,1
Всего по пп. 1.1–1.4							2000,8
другие операции (12 % от ∑ пп. 1.1–1.4)							240,1

Наименование этапов и перечень работ	Ед. изм.	Объем работ	Исполнитель	Стоимость работы за один чел./день	Норма выработки	Заграты труда на объем работ, чел/дней	Общая стоимость работ, руб.
<b>ИТОГО</b>							<b>2240,9</b>
<b>Пересадка эксплантов на среду для пролиферации:</b>							
Подготовка посуды	шт.	50	лаборант	551,4	600	0,1	55,1
Приготовление и розлив питательной среды	шт.	50	н.сотрудник	1052,9	200	0,25	263,2
Автоклавирование	шт.	50	лаборант	551,4	повременн о	0,25	137,9
Пересадка эксплантов	шт.	50	ст.н.сотрудн ик	1226,1	повременн о	0,5	613,1
Всего по пп. 2.1–2.4							1069,3
Другие операции (12 % от ∑ пп. 2.1–2.4)							128,3
<b>ИТОГО</b>							<b>1197,6</b>
<b>Срезка побегов на укоренение, пересадка эксплантов на свежую среду для пролиферации:</b>							
Подготовка посуды для пролиферации	шт.	35	лаборант	551,4	600	0,06	33,1
Подготовка посуды для ризогенеза	шт.	105	лаборант	551,4	600	0,18	99,3
Приготовление и розлив питательной среды для пролиферации	шт.	35	н.сотрудник	1052,9	200	0,18	189,5
Приготовление и розлив среды для ризогенеза	шт.	105	н.сотрудник	1052,9	200	0,53	558,0
Автоклавирование	шт.	140	лаборант	551,4	повременн о	0,25	137,9
Срезка побегов и пересадка эксплантов	шт.	140	ст.н.сотрудн ик	1226,1	повременн о	0,5	613,1
Всего по пп. 3.1–3.6							1630,9
другие операции (12 % от ∑ пп. 3.1–3.6)							195,7
<b>ИТОГО</b>							<b>1826,6</b>
Выполняются те же операции, что и в п.3 (второй пассаж)							<b>1826,6</b>
Выполняются те же операции, что и в п.3 (третий пассаж)							<b>1826,6</b>
Выполняются те же операции, что и в п.3 (четвертый пассаж)							<b>1826,6</b>
Выполняются те же операции, что и в п.3 (пятый пассаж)							<b>1826,6</b>
<b>Микрочеренкование побегов и высадка их на питательную среду:</b>							
Подготовка посуды	шт.	1575	лаборант	551,4	600	2,6	1433,6
Приготовление и розлив питательной среды	шт.	1575	н.сотрудник	1052,9	200	7,9	8317,9

Наименование этапов и перечень работ	Ед. изм.	Объем работ	Исполнитель	Стоимость работы за один чел./день	Норма выработки	Затраты труда на объем работ, чел/дней	Общая стоимость работ, руб.
Автоклавирование	шт.	1575	лаборант	551,4	повременн о	3,8	2095,3
Микрочеренкование и посадка	шт.	1575	ст.н.сотрудн ик	1226,1	повременн о	15,8	19372,4
Всего по пп. 8.1–8.4							31219,2
другие операции (12 % от $\sum$ пп. 8.1–8.4)							3746,3
<b>ИТОГО</b>							<b>34965,5</b>
ВСЕГО себестоимость производства посадочного материала in vitro по полному циклу (пункты 1–8)							47537,0

Себестоимость производства возможно снизить, выбирая более дешевые аналоги мягкого инвентаря (таблица 3) и расходных материалов (таблица 4), однако недорогие варианты должны подбираться без ущерба для возможности качественного проведения работ.

**Таблица 3.** Затраты на мягкий инвентарь

№	Наименование	Единица измерения	Требуемое количество	Цена	Стоимость
1	Вата хирургическая	кг	1	476	476
2	Маска медицинская	шт.	50	20	1000
3	Перчатки медицинские	пара	25	46	1150
4	Халаты белые	шт.	6	508	3048
5	Халаты черные	шт.	2	576	1152
6	Полотенца 0,4×0,8 м	шт.	10	60	600
ВСЕГО по смете					7426

**Таблица 4.** Затраты на предметы снабжения и расходные материалы

№	Наименование	Единица измерения	Требуемое количество	Цена	Стоимость
	Пленка полиэтиленовая	рулон	2	95	190
	Фольга алюминиевая	кг	2	119	238
	Лампа светодиодная LED мощностью 18–22 Вт	шт.	20	150	3000
	Ерши пробирочные	шт.	2	30	60
	Пакеты полиэтиленовые	шт.	100	50	500
	Спирт медицинский	л	1	320	320
	Канцелярские товары	–	–	500	500
	Пробирки для микрочеренкования	шт	1000	25	25000
	Пробирки для ввода	шт	100	2,7	270
	Колбы Эрленмейера	шт	500	130	65000
ВСЕГО по смете					95078

Крайне сложно, на наш взгляд, снизить себестоимость за счет компонентов культуральных сред (таблица 5) или дезинфицирующих веществ. Качество питательной среды – необходимое условие для производства качественного, жизнеспособного посадочного материала. Снижение затрат на дезинфекцию может привести к высокой контаминации культур и снижению приживаемости и, как следствие, росту себестоимости.

**Таблица 5.** Затраты на расходные материалы, химические реактивы, регуляторы роста

№	Товары (работы, услуги)	Кол-во	Ед.	Цена	Сумма
1	Аммоний азотнокислый хч	0,2	кг	789,0	157,8
2	Натрий фосфорнокислый 1-зам., 2-водн. чда	0,1	кг	1 490,0	149,0
3	Трилон Б чда	0,05	кг	750,0	37,5
4	Натрий молибденовокислый 2-водн. чда	0,05	кг	8 500,0	425,0
5	Калий азотнокислый чда	0,5	кг	630,0	315,0
6	Калий фосфорнокислый 1-зам. чда	0,2	кг	780,0	156,0
7	Борная кислота хч	0,1	кг	270,0	27,0
8	Калий сернокислый хч	0,1	кг	1 570,0	157,0
9	Калий йодистый хч	0,05	кг	5 000,0	250,0
10	Калий хлористый хч	0,1	кг	380,0	38,0
11	Кальций азотнокислый, 4-водн. ч	0,1	кг	3 400,0	340,0
12	Кальций фосфорнокислый 2-зам. 2-водн. ч	0,05	кг	2 580,0	129,0
13	Кобальт хлористый (II), 6-водн. чда	0,05	кг	3 300,0	165,0
14	Медь сернокислая (II), 5-водн. чда	0,05	кг	1 290,0	64,5
15	Магний сернокислый 7-водн. хч	0,1	кг	334,0	33,4
16	Марганец сернокислый (II) 5-водн. чда	0,05	кг	1 480,0	74,0
17	Железо сернокислое (II), 7-водн. чда	0,1	кг	580,0	58,0
18	Сахароза чда	3	кг	955,0	2865,0
19	Глюкоза - D(+), (фас 0,25 кг)	1,0	кг	1100,0	2200,0
20	Фруктоза- Dхч	1,0	кг	1200,0	1200,0
21	Сорбит- Dхч	0,5	кг	900,0	450,0
22	Маннит- Dхч	0,1	кг	220	220,0
23	Антибиотик Гентамицин	1,0	упак.	200,0	200,0
24	Антибиотик Амоксициллин	1,0	упак.	107,0	107,0
25	Антибиотик Цефотаксим	1,0	упак.	150,0	150,0
26	Рибавирин	1,0	упак.	400,0	400,0
27	Агар микробиологический	1,0	кг	4000,0	4000,0
28	6-бензиламинопурин (6-БАП)	1,0	г.	3570,0	3570,0
28	3-индолил-уксусная кислота (ИУК)	25,0	г.	1000,0	1000,0
ВСЕГО по смете					18938,2

**Выводы.** Из расчетов видно, что производство оздоровленного посадочного материала и содержание коллекции винограда *in vitro* – дорогое направление. Но ввиду того, что на сегодняшний день клональное микроразмножение является практически единственным надежным способом получения и хранения здорового посадочного материала, оправдывает себя. Производство оздоровленного посадочного материала на основе действующей коллекции позволяет снизить стоимость производства за счет экономии



трудозатрат и тем самым снизить стоимость конечного продукта для покупателя на 5 %. Это делает посадочный материал, произведенный *in vitro*, более конкурентоспособным по цене в сравнении с посадочным материалом, выращенным обычными методами. Экономия времени выглядит более впечатляющей – цикл производства сокращается с 12 до 4 месяцев. Таким образом, выращивание посадочного материала винограда на основе коллекции *in vitro* имеет экономические и временные преимущества по сравнению с существующей практикой.

### Литература

1. In Vitro Production of Clean Planting Material: Setting the Timelines for an Efficient Seed System for Vegetatively Propagated Crops in Ghana / M.D.Quain, D. Appiah-Kubi, M.O. Adu-Gyamfi, A.A. Aboagye, G. Osei-Diko, V.A. Amakwaah, R.N.A. Prempeh // *Agricultural and Food Science Journal of Ghana* Vol. 11 (2018). P 977–985.
2. Выращивание посадочного материала тополя белого (*POPULUS ALBA L.*) на основе коллекции *in vitro* и оценка его себестоимости / О.С. Машкина, Т.М. Табацкая, С.С. Морковина, Е.А. Панявина // *Лесотехнический журнал*. 2016. Т. 6. № 1 (21). С. 28–44.
3. Животягина Н.И., Орехова Н.В. Проблемы экономических расчетов по выращиванию посадочного материала древесных пород *in vitro* // *Вестник Мичуринского государственного аграрного университета*. 2020. № 2(61). С. 198–202.
4. Prakash S., Hoque M.I., Brinks T. Culture media and containers // *Low cost options for tissue culture technology in developing countries Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna, 26–30 August 2002*. P. 29–40.
5. Kryukov L.A., Vodolazhsky D.I., Kamenetsky-Goldstein R. Micropropagation of Grapevine and Strawberry from South Russia: Rapid Production and Genetic Uniformity // *Agronomy*. 2022; 12(2):308. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020308>.
6. Пузырнова В.Г., Дорошенко Н.П. Клональное микроразмножение сорта Каберне Совиньон // *Русский виноград*. 2022. Т. 19. С. 25–35. – DOI 10.32904/2712-8245-2022-19-25-35.
7. Puzyrnova V.G. Doroshenko N.P. Preserving grapevine variety Fioletoviy Ranniy in the collection *in vitro* // *E3S Web of Conferences : 14th International Scientific and Practical Conference on State and Prospects for the Development of Agribusiness, INTERAGROMASH 2021, Rostov-on-Don, 24–26 февраля 2021 года*. Vol. 273. Rostov-on-Don: EDP Sciences, 2021. P. 01007. DOI 10.1051/e3sconf/202127301007.
8. Puzyrnova V.G., Doroshenko N.P. Choice of explant, its size and method of its placement in a test tube to increase the productivity of clonal micropropagation of Fioletoviy ranniy variety // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Ussurijsk, 20–21 июня 2021 года*. – Ussurijsk, 2021. P. 022114. DOI 10.1088/1755-1315/937/2/022114.
9. Дорошенко Н.П. Сорт винограда Золотинка в коллекции *in vitro* // *Русский виноград*. 2021. Т. 15. С. 3–10. DOI 10.32904/2712-8245-2021-15-3-10.
10. BIO Web of Conferences 25, 05004 (2020) Production of diseases – free plant materials of grapevine from phytoplasma *in vitro* / V. Klimenko, I. Pavlova, V. Volodin, S. Gorislavets <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202505004>.
11. Karla A. Batista, Kátia F. Fernandes. Development and optimization of a new culture media using extruded bean as nitrogen source, Volume 2, 2015, P. 154–158, <https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.03.001>.