

УДК 634.11:631.541(045)

*А.В. Никитина, Т.Г. Леконцева, А.В. Федоров, А.М. Леночкин***ВЛИЯНИЕ СПОСОБА СТЕРИЛИЗАЦИИ И СРОКА ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ КЛОНОВОГО ПОДВОЯ ЯБЛОНИ 54-118**

Этап введения эксплантов в стерильную культуру является трудным в технологии клонального микроразмножения растений. Показаны возможные пути стерилизации и сроки введения эксплантов клонowego подвоя яблони 54-118 в культуру *in vitro* с целью снижения посадочной инфекции и повышения выхода стерильных жизнеспособных эксплантов. Лучшим сроком введения в стерильную культуру *in vitro* клонových подвоев яблони 54-118 является период активного роста побегов. Стерилизация эксплантов этиловым спиртом (70,0 %, 1 мин) в сочетании с перекисью водорода (33,0 %) в течение 7 мин и этиловым спиртом (70,0 %, 1 мин) в сочетании с диацидом (0,1 %) в течение 6 мин способствовала получению 63,0 % и 60,0 % жизнеспособных стерильных эксплантов.

Ключевые слова: клоновой подвой, клональное микроразмножение, стерилизация, питательная среда, инфицированность.

DOI: 10.35634/2412-9518-2020-30-4-411-416

Темпы мирового промышленного производства семечковых плодов значительны и занимают лидирующее место по сравнению с другими культурами, но спрос на свежие фрукты и продукты остается на высоком уровне, особенно отечественного производства. Это вызывает интерес к созданию и восстановлению садов с современными и районированными сортами, в связи с чем растет потребность в посадочном материале [1].

В настоящее время наблюдается нехватка качественного посадочного материала семечковых культур, особенно яблони. В Удмуртии практически нет современных питомников, отвечающих высоким требованиям к качеству посадочного материала. Это требует создания маточных растений слабоборослых подвоев яблони, способных обеспечить создание высокопродуктивных садов с использованием интенсивных технологий, урожайность которых в 2,0–3,5 раза выше, чем у обычных садов. Отбор наиболее адаптированных клонových подвоев и сортов яблонь, а также разработка технологии их выращивания позволит удовлетворить потребность в качественном посадочном материале семечковых культур [2; 3].

Один из методов биотехнологии – клональное микроразмножение – может преодолеть все эти трудности и обеспечить генетически однородный посадочный материал [4]. Введение в культуру *in vitro* – это важный этап клонального микроразмножения, где проявляются те свойства растений, которые будут характеризовать их с точки зрения эффективности культивирования *in vitro*. Высокая эффективность введения в стерильную культуру зависит от многих факторов, наиболее важными из которых, по мнению исследователей, являются: схема стерилизации и тип используемых стерилизаторов; видовые и сортовые особенности растений; сезонность; возраст и качество используемых эксплантов. При внесении в культуру большое значение имеет предварительная обработка эксплантов. Санация исходного материала является сложной задачей, так как на поверхностных тканях растений находятся споры грибов и бактерии, а питательные среды являются хорошим субстратом для развития пагубной микрофлоры. При выборе стерилизующего агента необходимо выполнить 2 условия: нейтрализовать микрофлору и не повредить ткань растения [5; 6].

Цель исследований – изучить эффективность разных стерилизующих реагентов и срока введения в культуру *in vitro* на жизнеспособность эксплантов клонowego подвоя яблони 54-118.

Материалы и методы исследований

Работа выполнялась в лаборатории отдела интродукции и акклиматизации растений УдмФИЦ УрО РАН.

Для введения в культуру *in vitro* использовали апикальные и латеральные почки, латеральные почки со щитком (январь, февраль), а также молодые побеги, собранные непосредственно с вегетирующего растения в весенне-летний период.

Стерилизацию исходного материала осуществляли поэтапно. Однопочковые сегменты побегов промывали при встряхивании в мыльном растворе, затем под проточной водой в течение 30 мин. На втором этапе в условиях ламинарного бокса экспланты обрабатывали различными стерилизующими соединениями следующими способами: 1) 70 % этанолом в течение 1 мин с промыванием стерильной водой 10 мин и обработкой 33 % перекисью водорода (6–7–10 мин); 2) 70 % этанолом в течение 1 мин, с промыванием стерильной водой 10 мин и обработкой 0,1 % диацидом (6–8–10 мин). В контрольном варианте экспланты обрабатывали в водном растворе белизны (гипохлорид натрия) 3:1, в течение 5 мин [3]. После стерилизации экспланты промывались в трех порциях стерильной дистиллированной воды по 10 минут для лучшего удаления остатков дезинфицирующих средств. После санации экспланты культивировали на модифицированной агаризованной питательной среде Кворина-Лепуавра [7] с добавлением 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) и витаминов В₁, В₆ и РР по 0,5 мг/л, аскорбиновой кислоты 1,0 мг/л, сахара 25 г, агар-агара 5,0 г/л; рН 5,6-5,8. Культивирование проводили в условиях светоконнаты при температуре 25±2 °С, фотопериод 16 часов. Экспланты вводили в количестве 30 шт. Успешность введения учитывали как процентное соотношение стерильных жизнеспособных эксплантов к общему количеству введенных в стерильную культуру. Статистическая обработка данных проведена дисперсионным методом по Б.А. Доспехову [8].

Результаты и их обсуждение

Этап введения в культуру – это важный этап технологии клонального размножения. В это время от инфекции, которая находится на эксплантах, может погибнуть значительная часть исходного материала. Для поверхностной стерилизации растительных тканей применяют большой набор химических веществ. Поверхностная стерилизация освобождает эксплант только от наружной инфекции. Если же ткани экспланта имеют внутреннюю инфекцию, применяют антибиотик [9].

Сроки введения в стерильную культуру играют немаловажную роль в микроклональном размножении [5; 6]. Вследствие этого были организованы исследования, в ходе которых экспланты подвоя яблони 54-118 вводили в культуру *in vitro* с января по июль. Наиболее благоприятным периодом культивирования меристем подвоя яблони 54-118 стали месяцы май-июнь. Количество жизнеспособных эксплантов, культивированных в период интенсивного роста побегов через 30 дней после введения в культуру в среднем составила 40,0–43,0 % (рис. 1).



Рис. 1. Результаты введения в стерильную культуру эксплантов клонового подвоя 54-118 в зависимости от срока, %

При введении клонового подвоя яблони 54-118 в культуру *in vitro* в зимние месяцы при всех вариантах стерилизации на пятый день культивирования на эксплантах были замечены признаки раз-

вития инфекции (100 % зараженность). Стерилизация выбранными средствами в зимний период оказалась неэффективной.

На наш взгляд, инфекция сохраняется в кроющих чешуйках почек и нет в вводимых в стерильную культуру эксплантах эндогенного накопления гормонов, что способствует последующему их развитию. По данным исследований О.В. Матушкиной [10], С.А. Муратовой [11], лучшие результаты дает введение в культуру *in vitro* меристем из апикальных почек, отобранных в период начала вегетации растений.

В наших исследованиях благоприятным сроком введения в стерильную культуру был период активного роста побегов – конец мая-начало июня (27.05-04.06). В контрольном варианте стерилизации все экспланты были инфицированы (табл.). Лучшими оказались варианты стерилизации этиловым спиртом с последующей обработкой перекисью водорода (7 мин) и этиловым спиртом в сочетании с диацидом в экспозиции 6 мин. Данные режимы стерилизации способствовали получению 60 и 63 % жизнеспособных стерильных эксплантов соответственно. Инфицированность эксплантов была 37 и 28 %, то есть стерилизующие растворы не всегда справлялись с патогенной микрофлорой. В то же время действие препаратов на растительную ткань здесь было наиболее мягким, так как количество погибших эксплантов составило 3 и 9 % соответственно.

Эффективность стерилизации эксплантов яблони 54-118 в зависимости от стерилизующего реагента, % (период естественного активного роста – весна), 2019-2020 гг.

Способ стерилизации	Показатели развития эксплантов, %		
	Жизнеспособные	Инфицированные	Некроз
Белизна (К; 3:1; 5 мин)	0	100	0
Спирт 70 % (1 мин) + перекись водорода 33 % (6 мин)	26	74*	0
Спирт 70 % (1 мин) + перекись водорода 33 % (7 мин)	60*	37*	3
Спирт 70 % (1 мин) + диацид 0,1 % (6 мин)	63*	28*	9*
Спирт 70 % (1 мин) + диацид 0,1 % (8 мин)	23	40*	37*
Спирт 70 % (1 мин) + диацид 0,1 % (10 мин)	0	10*	90*
НСР ₀₅	26,6	9,5	5,7

Примечание: * звездочкой обозначены варианты, в которых есть существенная разница $p < 0,05$.



Рис. 2. Внешний вид нормально развивающихся микропобегов клонового подвоя яблони 54-118

Использование белизны, этилового спирта и в сочетании с перекисью водорода в экспозиции 6 мин оказались неэффективными. Стерилизация диацидом в течение 8 и 10 минут оказала негативное влияние на растительные ткани, некроз эксплантов составил 90 %.

В ходе исследований мы столкнулись с таким нежелательным явлением, как выделение продуктов метаболизма (фенолов) в питательную среду. Для предотвращения выделения фенолов после проведения стерилизации экспланты выдерживали в 1 %-м стерильном растворе аскорбиновой кислоты. Но на второй день эксперимента наблюдали потемнение ткани и культуральной среды вокруг эксплантов продуктами окисления, подавляющими деление и рост клеток. По этой причине сразу проводили пересадку эксплантов на свежую среду, данный метод считается успешным в борьбе с негативным воздействием окисленных фенолов.

Выводы

1. Лучшим сроком введения в стерильную культуру *in vitro* клоновых подвоев яблони 54-118 является период активного роста побегов. В условиях Удмуртской Республики этот период приходится на конец мая-начало июня.

2. Наиболее эффективными оказались варианты стерилизации эксплантов этиловым спиртом с последующей обработкой перекисью водорода (33 %) в течение 7 мин и этиловым спиртом в сочетании с диацидом (0,1 %) в экспозиции 6 мин. Данные режимы стерилизации способствовали получению 60 и 63 % жизнеспособных стерильных эксплантов соответственно, что было существенно больше по сравнению с контролем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Упадышев М.Т., Донецких В.И., Упадышева Г.Ю., Бьядовский И.А. Особенности оздоровления от вирусов клоновых подвоев семечковых и косточковых культур // Плодоводство и ягодоводство России. 2013. № 2. С. 270-275.
2. Никитина А.В., Федоров А.В., Ленточкин А.М., Воробьева Г.С. Влияние стимуляторов роста на укореняемость зеленых черенков клоновых подвоев яблони // Вестн. Ижевской гос. с.-х. академии. 2019. № 4 (6). С. 66-70.
3. Журавлева А.В. Размножение клоновых подвоев яблони зелеными и одревесневшими черенками // Достижения науки и техники АПК. 2017. Т. 31, № 12. С. 44-46.
4. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Технология клонового микроразмножения яблони и груши (метод. рек.). Мичуринск: ВСТИСП, 2008. 32с.
5. Кухарчик Н.В. Получение посадочного материала плодовых и ягодных растений *in vitro* // Наука и инновации. 2019. № 6 (196). С. 17-21.
6. Федорович С.В., Винтер М.А. Способ поверхностной стерилизации эксплантов подвоя яблони СК 7 для культуры *in vitro* // Науч. тр. Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. 2019. Т. 26. С. 188-190.
7. Quoïrin M., Lepoivre P. Etude de milieux adaptes aux cultures in vitro de Prunus // Acta Hort. 1977. Vol. 78. P. 437-442.
8. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Колос, 1968. 336 с.
9. Беседина Е.Н., Бунцевич Л.Л. Усовершенствование технологии клонового микроразмножения подвоев яблони на этапе введения в культуру *in vitro* // Политематический сетевой электронный науч. журн. Кубанского гос. аграрного ун-та. 2015. №111. С. 1716-1734.
10. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Особенности размножения сортов яблони *in vitro* // Науч. тр. Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского института садоводства и виноградарства. 2015. Т. 8. С. 110-114.
11. Муратова С.А. Биотехнологические аспекты размножения плодовых и ягодных культур // Сб. науч. тр. гос. Никитского ботанического сада. 2017. Т. 144-2. С. 84-89.

Поступила в редакцию 07.12.2020

Никитина Анна Викторовна, аспирант кафедры плодоводства и овощеводства
E-mail: anya-mashkovceva@yandex.ru

Ленточкин Александр Михайлович, доктор сельскохозяйственных наук,
профессор кафедры плодоводства и овощеводства
E-mail: lenalmih@mail.ru

ФГБОУ ВО «Ижевская государственная сельскохозяйственная академия»
426069, Россия, г. Ижевск, ул. Кирова, 16

Леконцева Татьяна Германовна, научный сотрудник Отдела интродукции и акклиматизации растений
E-mail: t.lekontseva@yandex.ru

Федоров Александр Владимирович, доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник
Отдела интродукции и акклиматизации растений
E-mail: udmgarden@mail.ru

ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения РАН»
426067, Россия, г. Ижевск, ул. Т. Барамзиной, 34

A.V. Nikitina, T.G. Lekontseva, A.V. Fedorov, A.M. Lentochkin

**INFLUENCE OF THE STERILIZATION METHOD AND THE TIME OF INTRODUCTION
INTO IN VITRO CULTURE ON THE VIABILITY OF EXPLANTS OF THE CLONAL APPLE
STOCK 54-118**

DOI: 10.35634/2412-9518-2020-30-4-411-416

The stage of introducing explants into a sterile culture is difficult in the technology of clonal micropropagation of plants. The article shows the possible ways of sterilization and the introduction terms of explants of the clonal apple stocks 54-118 into in vitro culture in order to reduce planting infection and increase the yield of sterile viable explants. The best time for introducing clonal apple stocks 54-118 into sterile in vitro culture is the period of active shoot growth. Sterilization of explants with ethyl alcohol (70,0 %, 1 min) in combination with hydrogen peroxide (33,0 %) for 7 minutes and ethyl alcohol (70,0 %, 1 min) in combination with diacide (0,1 %) within 6 minutes contributed to the production of 63,0 % and 60,0 % of viable sterile explants.

Keywords: clonal rootstock, clonal micropropagation, sterilization, nutrient medium, infection.

REFERENCES

1. Upadyshev M.T., Donetskikh V.I., Upadysheva G.Yu., B'yadovskiy I.A. [Features of recovery from viruses of clonal rootstocks of pome and stone fruit crops], in *Plodvodstvo i yagodovodstvo Rossii*, 2013, pp. 93-95 (in Russ.).
2. Nikitina A.V., Fedorov A.V., Lentochkin A.M., Vorob'eva G.S. [The influence of growth stimulators on the rooting of green cuttings of clonal rootstocks of apple], in *Vestn. Izhevsk. Gos. Sel'skokhoz. Akad.*, 2019, no. 4(6), pp. 66-70 (in Russ.).
3. Zhuravleva A.V. [Reproduction of clonal rootstocks of an apple tree by green and lignified cuttings], in *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2017, vol. 31, no 12, pp. 44-46 (in Russ.).
4. Matushkina O.V., Pronina I.N. *Tekhnologiya klonal'nogo mikrorazmnozheniya yabloni i grushi (metodicheskie rekomendatsii)* [Clonal micropropagation technology for apple and pear (guidelines)], Michurinsk: VSTISP Publ., 2008, 32 p. (in Russ.).
5. Kukharchik N.V. [Obtaining planting material of fruit and berry plants *in vitro*], in *Nauka i innovatsii [Science and innovations]*, 2019, no. 6 (196), pp. 17-21 (in Russ.).
6. Fedorovich S.V., Vinter M.A. [Method for surface sterilization of CK 7 apple rootstock explants for in vitro culture], in *Nauchnye trudy Severo-Kavkazskogo federal'nogo nauchnogo tsentra sadovodstva, vinogradarstva, vinodeliya*, 2019, vol. 26, pp. 188-190 (in Russ.).
7. Quoirin M., Lepoivre P. Etude de milieux adaptes aux cultures in vitro de Prunus, in *Acta Hort.*, 1977, vol. 78, pp. 437-442.
8. Dospikhov B.A. *Metodika polevogo opyta* [Field experiment technique], Moscow: Kolos Publ., 1968, 336 p. (in Russ.).
9. Besedina E.N., Buntsevich L.L. [Improvement of the technology of clonal micropropagation of apple rootstocks at the stage of introduction into culture *in vitro*], in *Politematicheskii setevoy elektron. nauch. zhurnal Kubanskogo Gos. Agrar. Univ.*, 2015. No. 111, pp. 1716-1734 (in Russ.).
10. Matushkina O.V., Pronina I.N. [Features of the reproduction of apple varieties *in vitro*], in *Nauch. trudy Severo-Kavkazskogo zonal'nogo nauch.-issled. instituta sadovodstva i vinogradarstva*, 2015, vol. 8, pp. 110-114 (in Russ.).
11. Muratova S.A. [Biotechnological aspects of the reproduction of fruit and berry crops], in *Sborn. nauch. tr. Gos. Nikitskogo botanicheskogo sada*, 2017, vol. 144-2, pp. 84-89 (in Russ.).

Received 07.12.2020

Nikitina A.V., postgraduate student at Department of Fruit Growing and Horticulture

E-mail: anya-mashkovceva@yandex.ru

Lentochkin A.M., Doctor of Agricultural Sciences, Professor at Department of Fruit Growing and Horticulture

E-mail: lenalmih@mail.ru

Izhevsk State Agricultural Academy

Kirova st., 16, Izhevsk, Russia, 426069

Lekontseva T.G., Research Associate at Department of plant introduction and acclimatization

E-mail: t.lekontseva@yandex.ru

Fedorov A.V., Doctor of Agricultural Sciences, Chief researcher
at Department of plant introduction and acclimatization

E-mail: udmgarden@mail.ru

Udmurt Federal Research Center of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences

T. Baramzinoy st., 34, Izhevsk, Russia, 426067