

УДК 573.6:634.1

**СТЕРИЛИЗАЦИЯ ЭКСПЛАНТОВ
В ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА
ОЗДОРОВЛЕННОГО
ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА
СЛИВЫ ДОМАШНЕЙ**

Костюк Марина Александровна
мл. научный сотрудник
лабораторией вирусологии

Бунцевич Леонид Леонтьевич*
канд. биол. наук
зав. лабораторией вирусологии

*Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский зональный
научно-исследовательский институт
садоводства и виноградарства»,
Краснодар, Россия*

Способ клонального микроразмножения растений в культуре *in vitro* – один из основных элементов технологии производства оздоровленного посадочного материала сельскохозяйственных культур. Известно, что для каждого нового сорта требуется отработка всех элементов методики оздоровления: подбор оптимальных соотношений элементов питательных сред (микро-, макроэлементов, витаминов, ростовых веществ и др.), определение оптимальных сроков введения в культуру, поиск безопасных и эффективных стерилизаторов. В связи с тем, что в плододстве юга России происходит ежегодное пополнение сортимента новыми сортами плодовых культур, требуется модификация методики для культивирования этих сортов. Целью наших исследований является подбор эффективного стерилизующего агента для введения в культуру *in vitro* сортов сливы домашней. Объектами исследований являются препараты, используемые для поверхностной дезинфекции

UDC 573.6:634.1

**EXPLANTS STERILIZATION
IN THE PRODUCTION
TECHNOLOGY
OF THE REVITALIZED LANDING
MATERIAL OF PRUNUS**

Kostyuk Marina
Junior Research Associate
of Laboratory of Virology

Buntsevich Leonid
Cand. Biol. Sci.
Head of Laboratory of Virology

*Federal State Budgetary
Scientific Institution
"North Caucasian
Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture",
Krasnodar, Russia*

The method of clonal plants micro reproduction *in vitro* – is one of basic elements of technology of production of the crop's revitalized planding material. It is known that for each new variety it is required the carrying out all of elements of improvement technique: the selection of optimal ratios of elements of nutrient mediums (micro and macro elements, vitamins, growth substances, etc.), the determination of optimal terms of *in vitro* introduction, the search of safe and effective sterilizers. In the horticulture of the South of Russia there is an annual assortment replenishment of new fruit varieties, so it is required the modification of technique for cultivation of these varieties. The purpose of our research is selection of the effective sterilizing agent for introduction *in vitro* of plum varieties. The objects of research are the preparations used for the surface disinfection of the explants in the process

* Научный руководитель

эксплантов при введении в культуру *in vitro*. Проведенные исследования показали, что наибольший выход жизнеспособных эксплантов отмечен в варианте с обработкой йодидом ртути – в среднем 82%. Гибель эксплантов от инфекции составила в этом варианте 8 % (самая низкая среди изучаемых вариантов), некроз эксплантов – в среднем 10 % – также один из самых низких в эксперименте. Самый высокий уровень инфекции определен в контрольном варианте, с промывкой эксплантов сливы домашней дистиллированной водой – в среднем 72 %. В варианте обработки дистиллированной водой (контроль) некроз апексов составил 10 % в среднем, что свидетельствует о слабой фитотоксичности этого способа подготовки эксплантов при размножении сливы.

Ключевые слова: СЛИВА, СТЕРИЛИЗАТОРЫ, ОЗДОРОВЛЕНИЕ, ПРОИЗВОДСТВО САЖЕНЦЕВ, БЕЗВИРУСНЫЙ ПОСАДОЧНЫЙ МАТЕРИАЛ, КУЛЬТУРА *IN VITRO*

of introduction *in vitro*. The carried out research have shown that the greatest exit of viable explants is noted when processing by mercury iodide – an average 82 %. Death of explants from an infection in this option is 8 % (the lowest among the studied options), a necrosis of explants – an average 10 %, it is also the one of the lowest indexes in an experiment. The highest level of an infection is determined in a control option, when washing of plum explants by the distilled water – an average 72 %. In the option of processing by the distilled water (control) the necrosis of apexes is an average 10 % that testifies of weak phytotoxic infection of this way of explants preparing in the process of plum reproduction.

Key words: PLUM STERILIZERS, REVITALIZATION, SAPLING PRODUCTION, VIRUS FREE PLANTING MATERIAL, *IN VITRO* CULTURE

Введение. Способ клонального микроразмножения в культуре *in vitro*, один из основных элементов технологии производства оздоровленного посадочного материала сельскохозяйственных культур, появился еще в 1957 г., когда американские исследователи Мурасиге и Скуг разработали методы регенерации растений из каллусной ткани путём её обработки фитогормонами – ауксинами и цитокинином [1, 2].

Несмотря на многолетний период существования, проблемы при использовании данного способа размножения остаются. Так известно, что для каждого нового сорта требуется отработка всех элементов методики оздоровления: подбор оптимальных соотношений элементов питательных сред (микро-, макроэлементов, витаминов, ростовых веществ и др.), определение оптимальных сроков введения в культуру, поиск безопасных и эффективных стерилизаторов [3-7]. В связи с тем, что в плодоводстве юга

России происходит ежегодное пополнение сортимента новыми сортами плодовых культур [8-9], требуется модификация методики для культивирования этих сортов.

Используемые в качестве стерилизаторов химические соединения усиливают процесс окисления раневой поверхности тканей, характерный для плодовых культур. В результате при стерилизации значительная часть эксплантов оказывается нежизнеспособной [10]. Выбор стерилизатора играет важную роль, так как качество интродукции растительного материала в культуру *in vitro* во многом определяется качеством процесса стерилизации. Чем нежнее растительная ткань, тем должна быть ниже фитотоксичность, соответственно – ниже концентрация стерилизующего агента, чтобы сохранить жизнеспособность эксплантов, при этом не должно снижаться качество стерилизации.

В силу названных обстоятельств, поиск стерилизующих препаратов, обеспечивающих высокий уровень стерильности культуры при низком уровне угнетения эксплантов и имеющих низкую токсичность для человека, является актуальным.

Объекты и методы исследований. Объектами исследований являются препараты, используемые для поверхностной дезинфекции эксплантов при введении в культуру *in vitro*.

В качестве стерилизаторов выбраны следующие вещества.

– Бытовой препарат «Белизна». Активное вещество – гипохлорит натрия (NaClO). Отрицательный фактор – высокая токсичность для растительных клеток и длительная промывка в 8-10 порциях стерильной воды после стерилизации. Используется в концентрациях 0,5-5 % с экспозицией 1-20 мин.

– Йодид ртути (HgI_2) – универсальный стерилизующий агент. Недостаток – высокая токсичность для человека. Относится к первому классу опасности – вещества чрезвычайно опасные [11].

– Средство «Абактерил» – многокомпонентный препарат, состоящий из четырех действующих веществ различных химических групп. Содержит синергетическую смесь четвертичных аммониевых соединений алкилдиметилбензиламмоний хлорида и алкилдиметилэтилбензиламмоний хлорида (ЧАС) с полигексаметиленгуанидин гидрохлоридом (ПГМГ) и N,N-бис(3-аминопропил) додециламином: (суммарно) – 9%. Препарат «Абактерил» обладает антимикробной активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, грибов (в т.ч. плесневых), анаэробной инфекции [12].

Эксперимент выполнен в следующих вариантах:

- 1) обработка дистиллированной водой (контроль);
- 2) стерилизация йодидом ртути (HgJ_2) 0,1 % – при экспозиции 30 секунд;
- 3) стерилизация 10% раствором бытового препарата «Белизна», экспозиция 8 мин;
- 4) двухступенчатая стерилизация 10 % раствором Белизны (8 мин.) + 0,3 % раствором Абактериала (20 мин.) (согласно рекомендациям Сочинского института цветоводства и субтропических культур [13], с заменой стерилизующего агента Велтолен на аналогичный ему по действию, но более экономичный препарат Абактерил).

После стерилизации проводили двукратную промывку эксплантов стерильной дистиллированной водой по 5 минут. В каждом варианте высажено по 20 эксплантов в 3-х кратной повторности.

Для введения эксплантов в культуру *in vitro* использована питательная среда, приготовленная по прописи Мурасиге-Скуга (1962) в модификации Корнацкого С.А. (1991), с добавлением бензиламинопурина в количестве 0,2 мг/л среды.

Обсуждение результатов. Результаты изучения эффективности стерилизаторов представлены на рисунке и в таблице.



а

б

Рис. Введение эксплантов сливы в культуру *in vitro*:
а – сорт Стенли, б – Кабардинская ранняя

Эффективность стерилизации (доля стерильных, инфицированных и некротизировавших эксплантов) при введении в культуру *in vitro* апексов сливы сортов Стенли и Кабардинская ранняя, %

Вариант	Показатель	Сортообразцы				В средне м
		Стенли		Кабардинская ранняя		
		здоровы е	РР V	здоровые	РРV	
1. Промывка дист. водой, (контроль)	Стерильные	22	17	12	20	18
	Инфицированные	67	75	82	67	72
	Некротизированные	11	8	6	13	10
2. HgI ₂ , 0,1% раствор	Стерильные	87	82	85	75	82
	Инфицированные	10	11	3	8	8
	Некротизированные	3	7	12	17	10
3. 10% раствор Белизны 8 мин	Стерильные	63	75	72	58	67
	Инфицированные	25	15	13	13	17
	Некротизированные	12	10	15	29	16
4. 10% р-р Белиз- ны 10 мин + 0,3% р-р Абактерила 20 мин	Стерильные	35	30	33	40	34
	Инфицированные	28	25	15	22	23
	Некротизированные	37	45	52	38	43

В качестве параметров эффективности стерилизации определяли долю стерильных, инфицированных грибами или бактериями и некротизировавших, вследствие фитотоксичности стерилизатора эксплантов.

Из таблицы видно, что наибольший выход жизнеспособных эксплантов получен в варианте с обработкой йодидом ртути – в среднем 82%. Гибель эксплантов от инфекции самая низкая (среди изучаемых вариантов), она составила в этом варианте 8 %. Некроз эксплантов – в среднем 10 % – также один из самых низких в эксперименте.

Для разных составляющих изучаемого варианта – у сортов Стенли и Кабардинская ранняя, у заражённых PPV и здоровых эксплантов, выявленная тенденция сохраняется: высокая доля стерильных апексов (от 75 до 85 %), низкая – инфицированных (от 3 до 11 %) и некротизировавших апексов (от 3 до 17 %) (см. табл.).

На втором месте вариант с обработкой апексов 10 % раствором «Белизны» – выход жизнеспособных эксплантов в среднем составил 67 %, что на 15 % меньше, чем в варианте с йодидом ртути. Гибель эксплантов от инфекции в этом варианте – 17 %, что на 9 % больше, чем в варианте с йодидом ртути, некроз эксплантов на 6 % больше, соответственно.

Увеличение доли инфицированных эксплантов свидетельствует о худшей стерилизующей способности раствора Белизны, по сравнению с йодидом ртути (в применяемых концентрациях и экспозициях), на более высокую фитотоксичность раствора Белизны, в том же сравнении, указывает повышение доли некротизировавших эксплантов. Для разных составляющих изучаемого варианта выявленная тенденция сохраняется: высокая доля стерильных апексов (от 58 до 75 %), ниже доля инфицированных (от 13 до 25 %) и близкая к ней доля некротизировавших апексов (от 12 до 29 %) (см. табл.).

Самый низкий выход стерильных апексов в нашем опыте был получен в варианте с двухступенчатой обработкой 10% раствором Белизны и

препаратом Абактерил – 34% в среднем. Гибель эксплантов от инфекции составила в этом варианте 23 %, что больше, чем в вариантах с йодидом ртути (8%) и раствором Белизны (17 %).

Увеличение доли инфицированных эксплантов свидетельствует о худшей стерилизующей способности двухступенчатой обработки 10 % раствором Белизны и препаратом Абактерил по сравнению с йодидом ртути и раствором Белизны (в применяемых концентрациях и экспозициях). Некроз эксплантов в варианте с двухступенчатой обработкой 10 % раствором Белизны и препаратом Абактерил (43 % в среднем) значительно превышает данный показатель в вариантах с йодидом ртути (10 %) и раствором Белизны (16 %).

Существенное увеличение доли некротизировавших эксплантов свидетельствует о высокой фитотоксичности двухступенчатой обработки 10 % раствором Белизны и препаратом Абактерил по сравнению с раствором йодида ртути и раствором Белизны. Данный характер влияния обработки отмечен у всех исследуемых образцов изучаемого варианта – низкая доля стерильных апексов (от 30 до 40 %), высокая доля некротизировавших апексов (от 37 до 52 %) и значительная доля инфицированных апексов (от 15 до 28 %) (см. табл.).

Как и следовало предполагать, самый высокий уровень инфекции оказался в контрольном варианте с промывкой эксплантов дистиллированной водой – в среднем 72 %. Некроз апексов при обработке дистиллированной водой составил 10 % в среднем, что является одним из самых низких показателей в эксперименте и свидетельствует о слабой фитотоксичности способа подготовки эксплантов.

Выводы. Таким образом, как показали результаты наших исследований, наибольшая эффективность стерилизации и наименьшая фитотоксичность отмечены в варианте с обработкой эксплантов сливы йодидом ртути. Выход жизнеспособных эксплантов составляет в среднем 82%, гибель от

поверхностной инфекции 8 %, некроз – 10 %. При обработке 10 % раствором «Белизны» выход жизнеспособных эксплантов снижается на 15 % и составляет 67 %, увеличивается гибель от инфекции (17 %), повышается некроз эксплантов (16 %).

Литература

1. Murashige, T; Skoog, F (1962). "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum*. 15 (3): 473–497.
2. Trigiano, Robert N., Gray, Dennis J. (2010). *Plant Tissue Culture, Development and Biotechnology*. Boca Raton: CRC Press. p. 186.
3. Корнацкий, С.А. Микроразмножение сортов сливы / С.А. Корнацкий // Проблемы интенсификации современного садоводства. – Мичуринск, 1990.– С. 164-165.
4. Высоцкий, В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.07 / Высоцкий Валерий Александрович. – М., 1998. – 44 с.
5. Тутберидзе, Ц.В. Особенности микроразмножения сливы *in vitro* / Ц.В. Тутберидзе, В.Н. Михайлюк // Садоводство и виноградарство 21 века: материалы междунар. науч.– практ. конф. (7-10 сентября 1999 г.). – Краснодар, СКЗНИИСиВ, 1999. – Ч.3. – С. 103-104.
6. Матушкина, О.В., Клональное микроразмножение плодовых и ягодных культур и перспективы его использования / О.В. Матушкина, И.П. Пронина // Основные итоги и перспективы научных исследований ВНИИС им. И.В. Мичурина (1931-2001 гг.): сб. науч. тр.– Тамбов, 2001. – С. 103-105.
7. Бунцевич, Л.Л. Совершенствование системы производства высококачественного безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур / Л.Л. Бунцевич, М.А. Костюк, Е.Н. Палецкая // Разработки, формирующие современный облик садоводства. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2011. – С. 254-275
8. Заремук, Р.Ш. Формирование сортимента для создания высокопродуктивных насаждений сливы на юге России: дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.07 / Заремук Римма Шамсудиновна. – Краснодар, 2007. – 375 с.
9. Ульяновская, Е.В. Формирование адаптивного сортимента яблони на основе устойчивых и иммунных к парше сортов: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.07 / Ульяновская Елена Владимировна. – Краснодар, 2009. – 51 с.
10. Ланская, Л.Е. Роль экспланта сливы при введении в культуру *in vitro* / Л.Е. Ланская // Интродукция нетрадиционных и редких растений: материалы 8 международной науч.-метод. конф. (8-12 июня 2008 г.). – Мичуринск-научоград, 2008. – С. 211—213.
11. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / под ред. Е.Н. Джигадло. – Орёл: ГНУ ВНИИСПК, 2005. – 50 с.
12. ИНСТРУКЦИЯ № 01/11 по применению средства дезинфицирующего с моющим эффектом «Абактерил» производства фирмы ООО «Рудез», Россия для целей дезинфекции, предстерилизационной очистки, в ЛПО, дезинфекции на предприятиях коммунально-бытового обслуживания, в учреждениях образования, культуры, отдыха, спорта, детских пенитенциарных и социального обеспечения / А.Г. Афиногенова, Г.Е. Афиногенов, Т.Я. Богданова (РНИИТО); О.В. Фукалова (ООО «Рудез»). – ИЛЦ ФГУ «РНИИТО им. Р. Р. Вредена» Минздравсоцразвития России, 2011 – 78 с.

13. Самарина, Л.С. Разработка приёмов культивирования цитрусовых *in vitro* / Л.С. Самарина, Т.М. Коломиец, Н.С. Налбантова // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2012. – №1 (46). – С. 175-179.

References

1. Murashige, T; Skoog, F (1962). "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum*. 15 (3): 473–497.
2. Trigiano, Robert N., Gray, Dennis J. (2010). *Plant Tissue Culture, Development and Biotechnology*. Boca Raton: CRC Press. p. 186.
3. Kornackij, S.A. Mikrorazmnozhenie sortov slivy / S.A. Kornackij // *Problemy intensifikacii sovremennogo sadovodstva*. – Michurinsk, 1990.– S. 164-165.
4. Vysockij, V.A. Biotehnologicheskie metody v sisteme proizvodstva ozdorovlennogo posadochnogo materiala i selekcii plodovyh i jagodnyh rastenij: avtoref. dis. ... d-ra s.-h. nauk: 06.01.07 / Vysockij Valerij Aleksandrovich. – M., 1998. – 44 s.
5. Tutberidze, C.V. Osobennosti mikrorazmnozhenija slivy *in vitro* / C.V. Tutberidze, V.N. Mihajljuk // *Sadovodstvo i vinogradarstvo 21 veka: materialy mezhdunar. nauch.– prakt. konf. (7-10 sentjabrja 1999 g.)*. – Krasnodar, SKZNIISiV, 1999. – Ch.3. – S. 103-104.
6. Matushkina, O.V., Klonal'noe mikrorazmnozhenie plodovyh i jagodnyh kul'tur i perspektivy ego ispol'zovanija / O.V. Matushkina, I.P. Pronina // *Osnovnye itogi i perspektivy nauchnyh issledovanij VNIIS im. I.V. Michurina (1931-2001 gg.): sb. nauch. tr.– Tambov, 2001. – S. 103-105.*
7. Bunceвич, L.L. Sovershenstvovanie sistemy proizvodstva vysokokachestvennogo bezvirusnogo posadochnogo materiala plodovyh i jagodnyh kul'tur / L.L. Bunceвич, M.A. Kostjuk, E.N. Paleckaja // *Razrabotki, formirujushhie sovremennyj oblik sadovodstva*. – Krasnodar: GNU SKZNIISiV, 2011. – S. 254-275
8. Zaremuk, R.Sh. Formirovanie sortimenta dlja sozdaniya vysokoproduktivnyh nasazhdenij slivy na juge Rossii: dis. ... d-ra s.-h. nauk: 06.01.07 / Zaremuk Rimma Shamsudinovna. – Krasnodar, 2007. – 375 s.
9. Ul'janovskaja, E.V. Formirovanie adaptivnogo sortimenta jabloni na osnove ustojchivyh i immunnyh k parshe sortov: avtoref. dis. ... d-ra s.-h. nauk: 06.01.07 / Ul'janovskaja Elena Vladimirovna. – Krasnodar, 2009. – 51 s.
10. Lanskaja, L.E. Rol' jeksplanta slivy pri vvedenii v kul'turu *in vitro* / L.E. Lanskaja // *Introdukcija netradicionnyh i redkih rastenij: materialy 8 mezhdunarodnoj nauch.-metod. konf. (8-12 ijunja 2008 g.)*. – Michurinsk-naukograd, 2008. – S. 211—213.
11. Metodicheskie rekomendacii po ispol'zovaniju biotehnologicheskikh metodov v rabote s plodovymi, jagodnymi i dekorativnymi kul'turami / pod red. E.N. Dzhi-gadlo. – Orjol: GNU VNIISPK, 2005. – 50 s.
12. INSTRUKCIJA № 01/11 po primeneniju sredstva dezinficirujushhego s mozhshim jeffektom «Abakteril» proizvodstva firmy ООО «Rudez», Rossiya dlja celej dezinfekcii, predsterilizacionnoj ochildki, v LPO, dezinfekcii na predpriyatijah kommunal'no-bytovogo obsluzhivaniya, v uchrezhdenijah obrazovaniya, kul'tury, otdyha, sporta, detskih penitenciarnyh i social'nogo obespechenija / A.G. Afinogenova, G.E. Afinogenov, T.Ja. Bogdanova (RNIITO); O.V. Fukalova (ООО «Rudez»). – ILC FGU «RNIITO im. R. R. Vredena» Minzdravsocrazvitija Rossii, 2011 – 78 s.
13. Samarina, L.S. Razrabotka prijomov kul'tivirovanija citrusovyh *in vitro* / L.S. Samarina, Т.М. Kolomiec, N.S. Nalbantova // *Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo*. – 2012. – № 1 (46). – S. 175-179.