

УДК 58.085:634.10

DOI 10.30679/2219-5335-2019-6-60-84-90

**САНАЦИЯ
ЭКСПЛАНТОВ ПОДВОЕВ
ЯБЛОНИ ПРИ ВВЕДЕНИИ
В КУЛЬТУРУ
*IN VITRO***

Винтер Марина Александровна
канд. с.-х. наук
зав. лабораторией вирусологии

Лободина Елена Вадимовна
младший научный сотрудник
селекционно-биотехнологической
лаборатории

Токмаков Сергей Вячеславович
канд. биол. наук
селекционно-биотехнологической
лаборатории

Беседина Екатерина Николаевна
канд. с.-х. наук
научный сотрудник
лаборатории вирусологии

Карпушина Марина Владимировна
канд. с.-х. наук
старший научный сотрудник
лаборатории питомниководства

*Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский федеральный
научный центр садоводства,
виноградарства, виноделия»,
Краснодар, Россия*

Стерильность эксплантов является важным условием для успешного культивирования растений в культуре *in vitro*. Дезинфицирующее средство должно нейтрализовать патогенную микрофлору и при этом не повредить растительные ткани. В данной статье представлена оценка результативности использования в качестве стерилизующего вещества для санации эксплантов хлорсодержащих таблеток торговой марки «ОКА-ТАБ». Одна таблетка содержит 1,41-1,87 г активного хлора. Для обработки

UDC 58.085:634.10

DOI 10.30679/2219-5335-2019-6-60-84-90

**SANITATION OF EXPLANTS
OF APPLE ROOTSTOCKS
IN THE PROCESS
OF INTRODUCTION
IN VITRO CULTURE**

Vinter Marina Aleksandrovna
Cand. Agr. Sci.
Head of Laboratory of Virology

Lobodina Elena Vadimovna
Junior Research Associate
of Biotechnology
and Breeding Laboratory

Tokmakov Sergey Vyacheslavovich
Cand. Sci. Biol.
of Biotechnology
and Breeding Laboratory

Besedina Ekaterina Nikolaevna
Cand. Agr. Sci.
Research Associate
of Virology Laboratory

Karpushina Marina Vladimirovna
Cand. Agr. Sci.
Senior Research Associate
of Nursery Laboratory

*Federal State Budget
Scientific Institution
«North Caucasian Federal
Scientific Center of Horticulture,
Viticulture, Wine-making»,
Krasnodar, Russia*

The sterilization of explants is the most important step for the successful plants cultivation *in vitro* culture. The disinfectant have to neutralize the pathogenic microflora and do not damage of the plant tissues. This article present the assessment of the effectiveness of using the chlorine-containing tablets of the OKA-TAB trademark as an sterilizing substance for the rehabilitation of explants. One tablet of disinfectant contains 1.41-1.87g of active chlorine.

применялся 0,5 %-й раствор. Продолжительность экспозиции составляла 5 минут. Учитывали наличие контаминации, повреждение растительных тканей (некроз объектов) и выход жизнеспособных эксплантов. В культуру *in vitro* вводились апексы подвоев яблони СК 7, СК 2, СК 3, М 9, ММ 106. Инициацию проводили в период активного роста побегов подвоев яблони (май-июнь). Апексы высаживались на питательную среду, содержащую соли по прописи Мурасиге и Скуга (1962), аскорбиновую кислоту – 1 мг/л, витамины В1, В6 и РР по 0,5 мг/л, мезоинозит – 100 мг/л, сахарозу – 30 г и агар-агар 0,8 %, БАП – 0,4 мг/л. Культивировали растения при фотопериоде продолжительностью 16 часов, при температуре воздуха $+24 \pm 2$ °С и освещенности 2-3 тыс. люксов. В результате исследований установлено, что 0,5 %-раствор хлорсодержащих таблеток в экспозиции 5 минут имеет высокую эффективность. Выход эксплантов составляет 75-98 % в зависимости от генотипа. Поэтому таблетки «ОКА-ТАБ» можно использовать для поверхностной обработки эксплантов подвоев яблони в период активного роста побегов как альтернативу сулеме (0,1 %).

Ключевые слова: ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*, ЭКСПЛАНТЫ, СТЕРИЛИЗАЦИЯ, АПЕКСЫ, ПОДВОИ ЯБЛОНИ

For the illustrative treatment 0,5 % solution was used. The exposure time was 5 minutes. The presence of contamination, damage to the plant tissues (necrosis of objects) and the output of viable explants were taken into account. Apexes of SK 7, SK 2, SK 3, M 9, MM-106 apple rootstocks were introduced *in vitro* culture. Initiation was carried out during the active growth of shoots of apple rootstocks (May-June). Apexes were planted on a nutrient medium culture supplemented with the salts according to the prescription of Murashige and Skoog media (1962): ascorbic acid – 1 mg /l, vitamins of B1, B6 and PP – 0.5 mg /l, mesoinositol – 100 mg /l, sucrose – 30 g and agar-agar – 0,8 %, BAP – 0,4 mg /l. The plants were cultivated with the photoperiod of 16 hours, with air temperature of $+ 24 \pm 2$ °C and illumination of 2-3 thousand lux. According to the study, it was found out that 0,5 % solution of chlorine-containing tablets at an exposure of 5 minutes had a higher efficiency. The yield of explants was 75-98 % depending on the genotype. Therefore, OKA-TAB tablets could be used for surface treatment of apple rootstock explants during the active period of shoot growth, as an alternative remedy to sublimate (0,1 %).

Key words: INTRODUCTION INTO CULTURE *IN VITRO*, EXPLANTS, STERILIZATION, APEXES, APPLE ROOTSTOCKS

Введение. Получение стерильной культуры на этапе инициации эксплантов в культуру *in vitro* является одним из важных этапов клонального микроразмножения. Дезинфицирующее вещество должно нейтрализовать патогенную микрофлору и при этом не повредить растительные ткани. Поэтому выбор стерилизатора и режимы обработки необходимо подбирать индивидуально для каждого объекта. Для уничтожения патогенных микроорганизмов, находящихся на поверхности эксплантов, в настоящее время используются различные химические соединения, в том числе фунгициды [1, 2], перекись

водорода [3], стерилизующие вещества, содержащие ртуть (высокотоксичные вещества) [4-7], различные хлорсодержащие препараты [8-16], и комбинированную обработку с использованием нескольких веществ [17-20].

Как правило, стандартная процедура дезинфекции растительного материала при введении в культуру *in vitro* включает применение растворов, содержащих ртуть. Хотя эти препараты показывают достаточно высокую эффективность, высокая токсичность является их главным недостатком. В связи с этим продолжается поиск эффективных и малотоксичных стерилизующих веществ, определение оптимальной концентрации и продолжительности обработки, с учетом сортовых особенностей растений.

Целью исследования является определение эффективности применения хлорсодержащего дезинфицирующего средства при санации эксплантов подвоев яблони.

Объекты и методы исследований. Материалом для введения в культуру *in vitro* служили апексы подвоев яблони СК 7, СК 2, М 9, ММ 106. Введение в культуру *in vitro* проводили в период активного роста побегов подвоев яблони (май-июнь). Срезанные верхушки побегов промывали мыльным раствором и в течение часа – в проточной воде. Для дезинфекции эксплантов использовали 0,5 % раствор «ОКА-ТАБ» (таблетка массой 3,3 г при растворении в воде выделяют 1,41-1,87 г активного хлора). Обработку эксплантов проводили с экспозицией 5 минут. В качестве стандартного варианта использована сулема (0,1 %) с экспозицией 2 минуты. Промывка эксплантов проводилась в стерильной дистиллированной воде – по 5 минут 4-хкратно. Обработанные от сапрофитной микрофлоры апексы высаживали на питательную среду, содержащую соли по прописи Мурасиге и Скуга (1962), аскорбиновую кислоту – 1 мг/л, витамины В1, В6 и РР по 0,5 мг/л, мезоинозит – 100 мг/л, сахарозу – 30 г и агар-агар 0,8 %. Культивировали растения при фотопериоде продолжительностью 16 часов, при температуре воздуха $+24 \pm 2$ °С и освещенности 2-3 тыс. люксов.

Обсуждение результатов. В ходе работы испытали действие дезинфицирующего средства, выпускаемого в форме таблеток «ОКА-ТАБ». Учитывали наличие контаминации, некроза объектов и жизнеспособных эксплантов. По результатам обработок видно, что 0,5 % раствор таблеток показывает достаточно высокую эффективность при обработке эксплантов подвоев яблони. Выход жизнеспособных эксплантов в среднем составляет 89 % (в стандартном варианте 91 %) (табл.).

**Стерилизация верхушечных побегов подвоев
яблони от сапрофитной микрофлоры**

Стерилизующий агент, концентрация	Экспозиция, мин	Количество введенных апексов, шт	Эффективность стерилизации, %		
			некроз	инфекция	жизнеспособные
Подвой яблони СК 2					
HgCl ₂ , 0,1 %	2	123	4	11	85
Раствор «ОКА – ТАБ», 0,5 %	5	124	10	15	75
Подвой яблони СК 3					
HgCl ₂ , 0,1 %	2	55	9	2	89
Раствор «ОКА – ТАБ», 0,5 %	5	59	8	7	85
Подвой яблони СК 7					
HgCl ₂ , 0,1 %	2	152	3	4	93
Раствор «ОКА – ТАБ», 0,5 %	5	118	3	6	91
Подвой яблони М9					
HgCl ₂ , 0,1 %	2	109	0	4	96
Раствор «ОКА – ТАБ», 0,5 %	5	70	0	4	96
Подвой яблони ММ 106					
HgCl ₂ , 0,1 %	2	55	2	7	91
Раствор «ОКА – ТАБ», 0,5 %	5	63	0	2	98
В ср. HgCl ₂			3	6	91
В ср. раствор «ОКА-ТАБ»			4	7	89

Наиболее низкий уровень контаминации отмечен при обработке эксплантов подвоев яблони М 9 и ММ 106, 4 и 2 % соответственно. Эффек-

тивность санации – на уровне и выше стандартного варианта (М 9 – 96 %, ММ 106 – 98 %). Негативного влияния на ткани растений не отмечено.

При обработке эксплантов подвоя яблони СК 2 выход жизнеспособных эксплантов составил 85 % в стандартном варианте (сулема, 0,1 %) и 75 % при обработке раствором «ОКА-ТАБ». Количество инфицированных эксплантов – 11 и 15 % соответственно. При этом 10 % эксплантов, обработанных хлорсодержащими таблетками, погибли в результате повреждения растительных тканей. Эффективность стерилизации эксплантов подвоев СК 3 и СК 7 была в пределах стандартного варианта. Подвой СК 3 в большей степени подвержен негативному воздействию стерилизующих веществ на растительные ткани как в варианте с исследуемым раствором «ОКА-ТАБ», так и в стандартном варианте.

Выводы. Для поверхностной обработки эксплантов подвоев яблони от патогенной микрофлоры в период активного роста побегов (май-июнь) рекомендуется использовать 0,5 % раствор дезинфицирующих таблеток «ОКА-ТАБ» с экспозицией 5 минут как более безопасное средство. Эффективность санации составляет 75-98 % в зависимости от генотипа растений.

Литература

1. Ghasheem N., Stănică F., Peticilă A.G., Venat O. *In vitro* effect of various sterilization techniques on peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) explants // Scientific Papers. Series B, Horticulture. 2018. Vol. LXII. P. 227-234.
2. Беседина, Е.Н. Усовершенствование метода клонального микроразмножения подвоев яблони *in vitro*: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.08 / Беседина Екатерина Николаевна. Краснодар, 2015. 142 с.
3. Деменко, В.И. Микроклональное размножение садовых растений: Учебное пособие для студентов по специальности 310300 – «Плодоводство и виноградарство». Москва: ФГОУ ВПО РГАУ МСХА, 2007. 55 с.
4. Леонтьев-Орлов О.А., Трушечкин В.Г., Высоцкий В.А. Особенности культивирования изолированных апексов яблони *in vitro* // Плодоводство в Нечерноземной полосе: сб. науч. тр. М., 1988. С. 21-30.
5. Jan Aarifa, Bhat K. M., Bhat, S. J. A., Mir M. A., Bhat M. A., Imtiyaz A., Rather W., Rather J. A. Surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown strawberry explants intended for *in vitro* culture // African Journal of Biotechnology. 2013. Vol. 12(39). P. 5749-5753.
6. Ташматова Л.В., Мацнева О.В., Шахов В.В. Получение исходного материала для полиплоидизации яблони *in vitro* / Современное садоводство – Contemporary horticulture. 2017. №4. С. 97-101.

7. Ashrafuzzaman, M. Micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa*) through runner culture / M. Ashrafuzzaman, S. M. Faisal, D. Yadav, D. Khanam, F. Raihan // *Bangladesh J. Agril. Res.* 38(3). - 2013. – P. 467-472.
8. Jones, O.P. Propagation *in vitro* of five apple scion cultivars / O.P. Jones, C.A. Pontikis, M.E. Hopgood // *Hort. Sci.* – 1979. – V. 54, № 2. – P. 155-158.
9. Demsachew Guadie. Micropropagation of two apple (*Malus domestica* Borkh) varieties from shoot tip explants // A Thesis Submitted to the school of Graduate Studies of Addis Ababa University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Biotechnology / Demsachew Guadie. Addis Ababa, Ethiopia, 2011. 50 p.
10. Ciccotti A. M., Bisognin C., Battocletti I., Salvadori A., Herdemertens M., Jarausch W. Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic *Malus sieboldii* genotypes // *Agronomy Research.* 2008. V. 6(2). P. 445–458.
11. Amin Dala M., Das B., Sharma A.K., Amin Mir M., Singh Sounduri A. *In vitro* cloning of apple (*Malus domestica* Borkh) employing forced shoot tip cultures of M9 rootstock / *Indian Journal of Biotechnology.* 2006. Vol. 5. P.543-550.
12. Ghanbari A. Impacts of plant growth regulators and culture media on *in vitro* propagation of three apple (*Malus domestica* Borkh.) rootstocks / *Iranian journal of genetics and plant breeding.* 2014. Vol. 3. (1). P. 11-20.
13. Rustae M., Nazeri S., Ghadimzadeh M., Malboobi M.A. Optimizing *in vitro* Regeneration from Iranian Native Dwarf Rootstock of Apple (*Malus domestica* Borkh) / *International Journal of Agriculture & Biology.* 2007. Vol. 9 (5). P.775-778.
14. Munir M., Iqbal S., Baloch J.U.D., Khakwani A.A. *In vitro* explant sterilization and bud initiation studies of four strawberry cultivars // *Journal of Applied Horticulture.* 2015. V. 17(3). P. 192-198.
15. Fallahpour, M. *In vitro* propagation of “Gisela 5” rootstock as affected by mineral composition of media and plant growth regulators / M. Fallahpour, S. M. Miri, N. Bouzari // *Journal of Horticultural Research.* – 2015. – V. 23(1). – P. 57-64.
16. Mihaljević, I. *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of «Oblaćinska» sour cherry / I. Mihaljević, K. Dugalić, V. Tomaš [et al.] // *Journal of Agricultural Sciences.* – 2013. - Vol. 58. – №2. – P. 117-126.
17. Верзилин А.В. Особенности клонального микроразмножения новых сортов земляники садовой / Роль сорта в современном садоводстве: материалы междунар. науч. метод. дистанц. конф., посвященной 70-летию со дня рождения академика РАН, доктора с.-х. наук, профессора Н.И. Савельева (1-29 марта 2019 г.) / Под общ. ред. М.Ю. Акимова. Мичуринск-наукоград РФ; Воронеж: Кварта, 2019. С. 45-50.
18. Ломовская, Л.В. Методы оздоровления и размножения перспективных форм груши *in vitro* // *Селекция и сортовая агротехника плодовых культур: сб. науч. тр. Орёл,* 2004. С. 107-113.
19. Милехин, А.В., Рубцов С.Л. Технология микрклонального размножения хризантемы в условиях *in vitro* // *Молодой ученый.* 2015. № 24. С. 335-338.
20. Матушкина, О.В. Оптимизация процессов регенерации при размножении клоновых подвоев и сортов яблони и груши *in vitro*: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.07 / Матушкина Ольга Васильевна. Мичуринск, 2008. 155 с.
21. Pua, E.C. *In vitro* propagation of Ottawa -3 apple rootstock / E.C. Pua, Calvin Chohg, G.L. Rousselle // *Can. J. Plant. Sci.* – 1983. –V. 63, № 1. – P. 183-188.

References

1. Ghasheem N., Stănică F., Peticilă A.G., Venat O. *In vitro* effect of various sterilization techniques on peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) explants // *Scientific Papers. Series B, Horticulture.* 2018. Vol. LXII. P. 227-234.
2. Besedina, E.N. Uovershenstvovanie metoda klonal'nogo mikrorazmnozheniya podvoev yabloni *in vitro*: dis. ... kand. s.-h. nauk: 06.01.08 / Besedina Ekaterina Nikolaevna. Krasnodar, 2015. 142 s.
3. Demenko, V.I. Mikroklonal'noe razmnozhenie sadovyh rastenij: Uchebnoe posobie dlya studentov po special'nosti 310300 – «Plodoovoshchevodstvo i vinogradarstvo». Moskva: FGOU VPO RGAU MSHA, 2007. 55 s.

4. Leont'ev-Orlov O.A., Trushechkin V.G., Vysockij V.A. Osobennosti kultivirovaniya izolirovannyh apeksov yabloni *in vitro* // Plodovodstvo v Nechernozemnoj polose: sb. nauch. tr. M., 1988. S. 21-30.
5. Jan Aarifa, Bhat K. M., Bhat, S. J. A., Mir M. A., Bhat M. A., Imtiyaz A., Rather W., Rather J. A. Surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown strawberry explants intended for *in vitro* culture // African Journal of Biotechnology. 2013. Vol. 12(39). R. 5749-5753.
6. Tashmatova L.V., Macneva O.V., Shahov V.V. Poluchenie iskhod-nogo materiala dlya poliploidizatsii yabloni *in vitro* / Sovremennoe sadovodstvo – Contemporary horticulture. 2017. №4. S. 97-101.
7. Ashrafuzzaman, M. Micropropagation of strawberry (*Fragaria ana-nassa*) through runner culture/ M. Ashrafuzzaman, S. M. Faisal, D. Yadav, D. Khanam, F. Raihan // Bangladesh J. Agril. Res. 38(3). - 2013. – P. 467-472.
8. Jones, O.P. Propagation *in vitro* of five apple scion cultivars / O.P. Jones, C.A. Pontikis, M.E. Hopgood // Hort. Sci. – 1979. – V. 54, № 2. – P. 155-158.
9. Demsachew Guadie. Micropropagation of two apple (*Malus domestica* Borkh) varieties from shoot tip explants // A Thesis Submitted to the school of Graduate Studies of Addis Ababa University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Biotechnology / Demsachew Guadie. Addis Ababa, Ethiopia, 2011. 50 r.
10. Ciccotti A. M., Bisognin C., Battocletti I., Salvadori A., Herde-mertens M., Jarausch W. Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic *Malus sieboldii* genotypes // Agronomy Research. 2008. V. 6(2). P. 445–458.
11. Amin Dala M., Das B., Sharma A.K., Amin Mir M., Singh Sounduri A. *In vitro* cloning of apple (*Malus domestica* Borkh) employing forced shoot tip cultures of M9 rootstock / Indian Journal of Biotechnology. 2006. Vol. 5. P.543-550.
12. Ghanbari A. Impacts of plant growth regulators and culture media on *in vitro* propagation of three apple (*Malus domestica* Borkh.) rootstocks / Iranian journal of genetics and plant breeding. 2014. Vol. 3. (1). P. 11-20.
13. Rustaee M., Nazeri S., Ghadimzadeh M., Malboobi M.A. Optimizing *in vitro* Regeneration from Iranian Native Dwarf Rootstock of Apple (*Malus domestica* Borkh) / International Journal of Agriculture & Biology. 2007. Vol. 9 (5). P.775-778.
14. Munir M., Iqbal S., Baloch J.U.D., Khakwani A.A. *In vitro* explant sterilization and bud initiation studies of four strawberry cultivars // Journal of Applied Horticulture. 2015. V. 17(3). R. 192-198.
15. Fallahpour, M. *In vitro* propagation of “Gisela 5” rootstock as affected by mineral composition of media and plant growth regulators / M. Fallahpour, S. M. Miri, N. Bouzari // Journal of Horticultural Research. – 2015. – V. 23(1). – P. 57-64.
16. Mihaljević, I. *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of «Oblaćinska» sour cherry / I. Mihaljević, K. Dugalić, V. Tomaš [et al.] // Journal of Agricultural Sciences. – 2013. - Vol. 58. – №2. – P. 117-126.
17. Verzilin A.V. Osobennosti klonal'nogo mikrorazmnozheniya novyh sortov zemlyaniki sadovoj / Rol' sorta v sovremennom sadovodstve: materialy mezhdunar. nauch. metod. distanc. konf., posvyashchennoj 70-letiyu so dnya rozhdeniya akademika Ran, doktora s. -h. nauk, profesora N.I. Savel'eva (1-29 marta 2019 g.) / Pod obshch. red. M.Yu. Akimova. Michurinsk-naukograd RF; Voronezh: Kvarta, 2019. S. 45-50.
18. Lomovskaya, L.V. Metody ozdorovleniya i razmnozheniya perspektivnyh form grushi *in vitro* // Selekcija i sortovaya agrotehnika plodovyh kul'tur: sb. nauch. tr. Oryol, 2004. S. 107-113.
19. Milekhin, A.V., Rubcov S.L. Tekhnologiya mikroklonal'nogo razmnozheniya hri-zantemy v usloviyah *in vitro* // Molodoj uchenyj. 2015. № 24. S. 335-338.
20. Matushkina, O.V. Optimizatsiya processov regeneratsii pri razmnozhenii klonovyh podvoev i sortov yabloni i grushi *in vitro*: dis. ... kand. s.-h. nauk: 06.01.07 / Matushkina Ol'ga Vasil'evna. Michurinsk, 2008. 155 s.
21. Pua, E.C. *In vitro* propagation of Ottawa -3 apple rootstock / E.C. Pua, Calvin Chohg, G.L. Rousselle // Can. J. Plant. Sci. – 1983. –V. 63, № 1. – P. 183-188.