


ЭФФЕКТИВНОСТЬ СТЕРИЛИЗУЮЩИХ АГЕНТОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ СОРТОВ ВИШНИ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

В.В. Шахов , м.н.с.
Л.В. Ташматова, к.с.-х.н.
О.В. Мацнева, н.с.
Т.М. Хромова, м.н.с.

ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, 302530, Россия, Орловская область, Орловский район, д. Жилина, ВНИИСПК, mentosvad@vniispk.ru

Аннотация

Для плодовых и ягодных культур часто используют приемы оздоровления с помощью культуры изолированных апексов *in vitro*. Одним из важных факторов успешного клонального микроразмножения является подготовка эксплантов к последующему введению в культуру. Обязательным условием введения исходного материала в культуру *in vitro* является его стерилизация, поэтому для обеззараживания первичных эксплантов проводят поверхностную обработку. Необходимо подбирать определенные типы стерилизующих агентов, которые не повреждали бы их и обеспечивали максимальную стерильность. В связи с этим целью наших исследований являлось изучение эффективности стерилизующих агентов на этапе введения сортов вишни в культуру *in vitro*. В данной работе приведены результаты по эффективности стерилизующих веществ. При подготовке исходного материала вишни для введения в культуру *in vitro* использовали агенты: 0,1% раствор мертиолата, 12% раствор перекиси водорода и разбавленный раствор белизны (гипохлорит натрия с содержанием активного хлора 95,2%) в соотношении 1:2. Объектами исследования являлись сорта вишни: Ровесница, Тургеневка, Новелла, Быстринка, Ливенская, Орлица, Подарок учителям, Бусинка. Исходным материалом служили экспланты изолированные из верхушечных и боковых почек с однолетних побегов в фазу начала выхода из покоя (март). Перед введением побеги ставили на отрастание. После 3-х недель культивирования с момента посадки на питательную среду, нами учитывалось количество жизнеспособных, зараженных и погибших эксплантов. Установлено, что у исследуемых сортов вишни при использовании раствора мертиолата практически не было погибших растений (0...1%). Наименьшее количество инфицированных эксплантов при обработке раствором белизны (действующее вещество гипохлорит натрия с содержанием активного хлора 95,2%) отмечалось у сорта Подарок учителям (3%), наибольшее – у сорта Новелла (47%). Выделены сорта, для которых применение всех трех стерилизующих агентов оказало максимальное положительное воздействие – это сорта Подарок учителям и Орлица. В результате исследования был выявлен наиболее подходящий стерилизатор для всех изученных сортов – 0,1% раствор мертиолата.

Ключевые слова: вишня, стерилизующий агент, *in vitro*, жизнеспособность, некроз, контаминация

THE EFFECTIVENESS OF STERILIZING AGENTS IN THE INTRODUCTION OF CHERRY VARIETIES TO *IN VITRO* CULTURE

V.V. Shakhov , junior researcher

L.V. Tashmatova, cand. agr. sci.

O.V. Matzneva, researcher

T.M. Khromova, junior researcher

Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, 302530, Russia, Orel region, Orel district, Zhilina, VNIISPК, mentosvad@vniispk.ru

Abstract

Healing techniques using culture isolated apexes *in vitro* are often use for fruit and berry crops. Preparation of explants for subsequent introduction into culture is one of the important factors of successful clonal micropropagation. A prerequisite for the introduction of the starting material into the culture *in vitro* is its sterilization, therefore, for the disinfection of primary explants, surface treatment is carried out. It is necessary to select certain types of sterilizing agents that would not damage them and provide maximum sterility. In this regard, the aim of our research was to study the effectiveness of sterilizing agents at the stage of introduction of cherry varieties into the culture *in vitro*. This paper presents the results on the effectiveness of sterilizing substances. The sterilizing agents: 0.1% mertiolate solution, 12% hydrogen peroxide solution and a solution of Belizna (sodium hypochlorite with an active chlorine content of 95.2%) in a ratio of 1:2 are used in the preparation of the starting material for the introduction of cherry culture *in vitro*. The objects of the study were varieties of cherries: Rovesnica, Turgenevka, Novella, Bystrinka, Livenskaya, Orlica, Podarok uchitelyam, Businka. The starting material was explants isolated from the apical and lateral buds with annual shoots in the phase of the beginning of the exit from rest (March). Before the introduction of the shoots were placed on regrowth. The number of viable, infected and dead explants had counted after 3 weeks of cultivation since planting. It was found that the studied varieties of cherries using a solution of mertiolate had virtually no dead plants (0—1%). The lowest number of infected explants when treated with a solution of Belizna (sodium hypochlorite with an active chlorine content of 95.2%) was noted in the variety Podarok uchitelyam (3%), the largest – in the variety Novella (47%). The varieties for which the application of all the three sterilizing agents provided the greatest positive effect is the varieties Podarok uchitelyam and Orlica. The study revealed the most suitable sterilizer for all studied varieties – 0.1 % solution of mertiolate.

Key words: cherry, sterilizing agent, *in vitro*, viability, necrosis, contamination

Введение

В настоящее время актуальной проблемой является производство оздоровленного посадочного материала для закладки маточных насаждений. Дальнейшая интенсификация плодородства на современном этапе невозможна без увеличения ассортимента материала, в том числе и косточковых культур (Высоцкий, 2006).

В большинстве случаев растения размножают семенами или вегетативным способом,

который является трудоемким процессом, требующим много времени. Привлечение методов биотехнологии является альтернативой традиционно используемым подходам в решении вопросов размножения и сохранения ценных форм. В современном садоводстве и селекции широко применяется технология клонального микроразмножения для получения в сжатые сроки большого количества оздоровленных саженцев культурных растений (Бутенко, 1964; Вечернина, 2004).

Различные аспекты использования биотехнологических методов в оздоровлении растений, клональном микроразмножении отражены в монографиях, обзорных статьях, методических рекомендациях (Катаева, 1983; Кашин, 2001).

Обычно при микроразмножении предпочитают использовать методы, базирующиеся на культивировании меристем, вычленившихся из боковых и верхушечных почек одревесневших побегов. Почка представляет собой сформированный зачаточный побег, хорошо защищен чешуей и легко может быть подвергнуты процедурам поверхностной стерилизации (Катаева, 1981; Кухарчик и др., 2016). Для плодовых и ягодных культур часто используют приемы оздоровления с помощью культуры изолированных апексов *in vitro*. Одним из важных факторов успешного клонального микроразмножения является подготовка эксплантов к последующему введению в культуру. Обязательным условием введения исходного материала в культуру *in vitro* является его стерилизация, поэтому для обеззараживания первичных эксплантов проводят поверхностную обработку. Стерилизацию необходимо производить с особой тщательностью, поскольку от этого зависит, будет ли эксплант развиваться или погибнет от инфекции. Растительные экспланты стерилизуют растворами веществ, содержащими активный хлор (хлорамином, гипохлоритом Na), бромом (бромной водой), перекисью водорода, спиртом, нитратом серебра, диацидом, антибиотиками. Необходимо подбирать определенные типы стерилизующих агентов, которые не повреждали бы их, и обеспечивали максимальную стерильность (Шевелуха, 1998).

Целью исследований являлось изучения эффективности стерилизующих агентов на этапе введения сортов вишни в культуру *in vitro*.

Материалы и методы

Опыт проводился на базе лаборатории биотехнологии ВНИИСПК в 2018 году.

Объектами исследования являлись сорта: Ровесница, Тургеневка, Новелла, Быстринка, Ливенская, Орлица, Подарок учителям, Бусинка.

Исходным материалом служили экспланты изолированные из верхушечных и боковых почек с однолетних побегов в фазу начала выхода из покоя (март). Перед введением побеги ставили на отрастание.

В качестве основных стерилизующих агентов применяли: 0,1% раствор мертиолата, 12% раствор перекиси водорода и раствор белизны (гипохлорит натрия с содержанием активного хлора 95,2%) в соотношении 1:2. Стерилизацию проводили с использованием магнитной мешалки для равномерного вращения объектов.

Стерилизацию проводили по схеме:

1. Промывка проточной водой – 40 минут;
2. Обработка 70% раствором этанола – 10 секунд;
3. Промывка автоклавированной дистиллированной водой – 10 минут;
4. Обработка основными стерилизующими растворами в 3-х вариантах:
 - 0,1 % р-р мертиолата – 10 минут;
 - 12 % р-р перекиси водорода – 5 минут;
 - раствор гипохлорита натрия с содержанием активного хлора 95,2% в соотношении 1:2 – 5 минут;

5. Трёхкратная промывка автоклавированной дистиллированной водой по 10 минут.

На этапе введения в культуру *in vitro* использовалась питательная среда MS с концентрацией 6 – БАП 0,5 мг/л Ph 6,0...6,5.

Учитывали наличие контаминации, некроза и жизнеспособность объектов. Лабораторные исследования проводили по общепринятой методике (Джигадло, 2005; Кухарчик и др., 2016).

Результаты и их обсуждение

Микроклонирование включает этап стерилизации, потому что растительные ткани служат серьезным источником заражения эпифитной микрофлорой. Поэтому необходима поверхностная стерилизация (Лутова, 2003).

После 3-х недель культивирования с момента посадки на питательную среду, нами учитывалось количество жизнеспособных, зараженных и погибших эксплантов (таблица 1).

Таблица 1 – Приживаемость эксплантов вишни на этапе введения в культуру *in vitro*, %

Сорта	Стерилизующий агент						Жизнеспособные экспланты		
	Мертиолат		Перекись водорода		Гипохлорит натрия		Мертиолат	Перекись водорода	Гипохлорит натрия
	Инфекция	Некроз	Инфекция	Некроз	Инфекция	Некроз			
Ровесница	13	0	26	2	21	0	87	72	79
Тургеневка	0	0	24	0	22	0	100	76	78
Быстринка	0	0	36	0	35	0	100	64	65
Ливенская	13	1	57	13	26	3	86	30	71
Орлица	2	0	5	0	18	0	98	95	82
Подарок учителям	0	0	8	0	3	3	100	92	94
Новелла	6	1	32	0	47	0	83	68	53
Бусинка	4	0	39	0	19	0	96	61	81

Среди исследуемых нами объектов при использовании 0,1% раствора мертиолата у сортов Тургеневка, Быстринка и Подарок учителям отмечалось полное отсутствие инфицированных эксплантов. Максимальное количество зараженных эксплантов отмечено у сортов Ливенская (13%) и Ровесница (13%).

Установлено, что у исследуемых сортов вишни при использовании 0,1% раствора мертиолата практически не было погибших растений (0...1%).

Наиболее чувствительным к применению раствора перекиси водорода сортом оказался сорт Ливенская (13% погибших от некроза растений), при этом для данного сорта отмечалось и наиболее низкая эффективность стерилизующего вещества (57% заражённых эксплантов). Наибольшее стерилизующее воздействие 12% р-р перекиси водорода оказал на сорта Орлица и Подарок учителям (5% и 8% зараженных эксплантов при полном отсутствии некроза).

Наименьшее количество инфицированных эксплантов при обработке раствором белизны (действующее вещество гипохлорит натрия с содержанием активного хлора 95,2%) отмечалось у сорта Подарок учителям (3%), наибольшее – у сорта Новелла (47%).

Выделены сорта, для которых применение всех трех стерилизующих агентов оказало максимальное положительное воздействие – это сорта Подарок учителям и Орлица.

Выводы

Установлено, что для получения стерильных и жизнеспособных эксплантов наиболее эффективным стерилизующим агентом для всех изученных сортов вишни оказался 0,1% раствор мертиолата. Применение других стерилизующих агентов не оказало должного

воздействия.

Для сортов Орлица и Подарок учителям выявлена высокая эффективность стерилизации при обработке всеми используемыми агентами.

Литература

1. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. Учебник. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2003. 228 с.
2. Высоцкий В.А. Биотехнологические приемы в современном садоводстве // Садоводство и виноградарство. 2006. №2. С. 2-3.
3. Джигадло Е.Н., Джигадло М.И., Голышкина Л.В. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами. Орел: ВНИИСПК, 2005. 49 с.
4. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 270 с.
5. Вечернина Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. Барнаул: Изд-во Алтайского ГУ, 2004. 205 с.
6. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. 96 с.
7. Катаева Н.В., Аветисов В.А. Клональное размножение растений в культуре тканей // Культура клеток растений. М., 1981. С. 137-149.
8. Кухарчик Н.В., Кастрицкая М.С., Семенас С.Э, Колбанова Е.В., Красинская Т.А., Волосевич Н.Н., Соловей О.В., Змушко А.А., Божидай Т.Н., Рундя А.П., Малиновская А.М. Размножение плодовых и ягодных растений в культуре *in vitro*. / под общ. ред. Н.В. Кухарчик. – Минск : Беларуская навука, 2016. 235 с.
9. Технологический процесс получения безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур: методические указания / Ред. В.И. Кашин. М.: ВСТИСП, 2001. 108 с.
10. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Дегтярев С.В., Кочиева Е.З., Прокофьев М.И., Новиков Н.Н., Ковалев В.М., Калашников Д.В. Сельскохозяйственная биотехнология. М.: Высшая школа, 1998. 416 с.

References

1. Lutova, L.A. (2003). *Biotechnology of higher plants*. Saint-Petersburg: Publishing house of St. Petersburg University. (In Russian).
2. Vysotskiy, V.A. (2006). Biotechnological methods in up-to-date gardening. *Horticulture and viticulture*, 2, 2-3. (In Russian, English abstract).
3. Dzhigadlo, E.N., Dzhigadlo, M.I., & Golyshkina, L.V. (2005). *Methodical recommendations for using biotechnological methods in work with fruit, berry and ornamental crops*. Ore: VNIISPK. (In Russian).
4. Butenko, R.G. (1964). *Culture of isolated tissues and physiology of plant morphogenesis*. Moscow: Science. (In Russian).
5. Vechernina, N.A. (2004). *Methods of biotechnology in selection, reproduction and preservation of plant gene pool*. Barnaul: Publishing house of Altai state University. (In Russian).
6. Kataeva, N.V., & Butenko R.G. (1983). *Clonal micropropagation of plants*. Moscow: Science. (In Russian).
7. Kataeva, N.V., & Avetisov, V.A. (1981). Clonal reproduction of plants in tissue culture. *Plant cell culture*, 137-149. (In Russian).
8. Kukharchik, N.V., Kastritskaya, M.S., Semenas, S.E, Kolbanova, E.V., Krasinskaya, T.A., Volosevich, N.N., Solovej, O.V., Zmushko, A.A., Bozhidai, T.N., Rundya, A.P., &

- Malinovskaya, A.M. (2016). *Reproduction of fruit and berry plants in culture in vitro*. Minsk: Belaruskaya navuka. (In Russian).
9. Kashin, V.I. (Ed.) (2001). *Technological process of obtaining virus-free planting material of fruit and berry crops*. Moscow: VSTISP. (In Russian).
10. Sheveluha, V.S., Kalashnikova, E.A., Degtyarev, S.V., Kochieva, E.Z., Prokofev, M.I., Novikov, N.N., Kovalev, V.M., & Kalashnikov, D.V. (1998). *Agricultural Biotechnology*. Moscow: Vysshaya Shkola. (In Russian).