

УДК 634.7:581.143.6

**ВЛИЯНИЕ СПОСОБА СТЕРИЛИЗАЦИИ КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ  
*MALUS DOMESTICA* НА ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *INVITRO***

**Алексей Андреевич Привалов**

аспирант

asher\_satton@mail.ru

**Роман Валерьевич Папихин**

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

руководитель Научного центра биотехнологии и селекции

rom10@mail.ru

**Роман Александрович Чмир**

кандидат биологических наук, доцент

начальник Центра развития современных компетенций детей

romanchmir3@mail.ru

**Елена Викторовна Григорьева**

аспирант

Мичуринский государственный аграрный университет

г. Мичуринск, Россия

**Аннотация.** Перспективность, рациональность и эффективность клонального микроразмножения доказана и принята на вооружение многими учеными мира. Первоочередным этапом в технологии клонального микроразмножения является этап введения экплантов в культуру *invitro*. Наиболее распространенными проблемами на данном этапе являются гибель экплантов от инфекции, как занесённой в культуру *in vitro* с самими экплантами, так и попавшей из внешней среды во время пассажа, а также низкий уровень регенерации микропобегов. Для санации экплантов и питательных сред от инфекции применяют стерилизаторы и антибиотики.

Способность к регенерации эксплантов в значительной степени зависит от срока их изоляции с исходных маточных растений.

В этапе стерилизации с лучшей стороны показали себя средство Anti-Anti и дистиллированная вода. Лучшим для стерилизации, но худшим для размножения и развития растений, стал стерилизатор перекись водорода.

Наиболее приспособленным для введения и размножения является комбинированный подвой 2-15-2 x 25-37-45: 75% эксплантов прошли стадии от позеленения и раскрытия семядольных листочков до формирования хорошо развитого побега с корнем.

**Ключевые слова:** *Malus domestica*, биотехнология, клональное микро размножение, экплант, *in vitro*.

**Введение.** Перспективность, рациональность и эффективность клонального микроразмножения доказана и принята на вооружение многими учеными мира. Первоочередным этапом в технологии клонального микроразмножения является этап введения экплантов в культуру *invitro* [7-8]. Наиболее распространенными проблемами на данном этапе являются гибель экплантов от инфекции, как занесённой в культуру *in vitro* с самими экплантами, так и попавшей из внешней среды во время пассажа, а также низкий уровень регенерации микропобегов. Для санации экплантов и питательных сред от инфекции применяют стерилизаторы и антибиотики. Способность к регенерации экплантов в значительной степени зависит от срока их изоляции с исходных маточных растений [1,5].

Применение различных стерилизаторов с экплантам позволяет расширить базу исследований в рамках введения в культуру *invitro*. Спецификации стерилизаторов расширенного спектра действия влияют на стерилизацию таким же образом, как и классические стерилизаторы, применяемые в биотехнологических исследованиях. Данные, полученные в эксперименте, позволяют оценить эффективность применения стерилизаторов. Сроки введения в стерильную культуру играют немаловажную роль в микроразмножении [2, 6].

Этап введения в культуру - это важный этап технологии клонального размножения. В это время от инфекции, которая находится на экплантах, может погибнуть значительная часть исходного материала. Для поверхностной стерилизации растительных тканей применяют большой набор химических веществ. Поверхностная стерилизация освобождает экплант только от наружной инфекции. Если же ткани экпланта имеют внутреннюю инфекцию, применяют антибиотик [3].

Новизна работы заключается в том, что на этапе введения экплантов в культуру *invitro* нами протестирован ряд препаратов, не применявшихся ранее в клональном микроразмножении, для стерилизации экплантов и их сочетания.

Применяемые средства были использованы для разных групп клоновых подвоев *Malus domestica*. В нашем исследовании применялись комбинации подвоев, такие как Спарта 4Х, совмещенный с 62-396 (Малыш Будаговского), карликовый подвой серии 2-15-2, скрещенный с подвоем 25-37-45, а также подвой серии 14-1, совмещенный с подвоем Парадизка Будаговского (ПБ-9).

**Материалы и методы исследования.** Работа проводилась на базе университетского учебно-исследовательского тепличного комплекса «Роща», ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ.

Для введения в культуру *in vitro* использовали гибридные семена, полученные в следующих комбинациях: 1 Спартан (4х) х 62-396 (2х); 2 подвой 2-15-2 (2х) х 25-37-45 (4х); 3 гибрид *M. sieboldii* (14-1) х подвой Парадизка Будаговского (ПБ-9).

Стерилизацию исходного материала осуществляли поэтапно. Семена очищали от кожуры. Все экспланты замачивали в дистиллированной воде в течение 1 часа, затем с них снималась оболочка.

На следующем этапе семена помещали в заранее подготовленный раствор.

Средства стерилизации, примененные к эксплантам, были залиты в чашки Петри. Зародыши из 1 комбинации помещали в 3% раствор калия перманганата ( $\text{KMnO}_4$ ); из 2 комбинации: вариант 2а – дистиллированной воды ( $\text{H}_2\text{O}$ ); 2б – НанАрголом (дистиллированная вода, наночастицы серебра, цитрат натрия); 2в – 3% раствором перекиси водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); из 3 комбинации – Gibco Antibiotic-Antimycotic (Антибиотик-антимикотик (пенициллин (10 000 ед/мл), стрептомицин (10 000 мкг/мл), амфотерицин В (25 мкг/мл)), 20 мл).

В контрольном варианте экспланты обрабатывали в водном растворе белизны (гипохлорид натрия, 10-15%) в сочетании 1:2, в течение 5 минут [9].

После стерилизации экспланты промывались в дистиллированной воде по 10 минут для лучшего удаления остатков дезинфицирующих средств. После санации экспланты культивировали на модифицированной агаризированной питательной среде Мурасиге-Скуга с добавлением 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП), витамины по прописи Мурасиге-Скуга, рН 5,6-

5,8. Введение эксплантов *in vitro* проводили с применением дополнительной стерилизации сулемой (хлорид ртути) в течение 1 минуты, обработкой дистиллированной водой, в течение 1 минуты. Успешность применения стерилизационных средств и введение в культуру учитывали через систему оценки развития зародышей F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub> межродовых гибридов семечковых культур *in vitro* [4].

Культивирование растений осуществляли в специально оборудованной культуральной комнате при 16-часовом световом дне с освещенностью 2400 люкс (люминесцентные лампы Osram L36W CoolDaylight), температуре воздуха 24±20С и влажности воздуха 55-60%.

Статистическую обработку данных проводили в программной среде Microsoft Excel.

**Результаты и обсуждение.** При введении зародышевых эксплантов гибридных подвоев яблони на 42 сутки эксперимента и на 57 сутки были замечены следы инфекции.

При применении 3% раствора калия перманганата на экспланты гибридных форм Спарта (4х) х 62-396 обнаружилось, что 100% пробирок оказались стерильны. 50% эксплантов не развились, 50% остановились на этапе прорастания почки и образовании розетки листьев (рис. 1).



а.



б.



в.

*Рисунок 1 - Введение гибридных форм Спарта 4Xx 62-396 (1A)*

а, б. – 47 сутки после введения, в. - 57 сутки после введения. (авторские фотографии)

Результаты применения раствора 2а: 62,5% пробирок оказались стерильны, 37,5% нестерильны. 25% эксплантов не показали роста и развития, в 25% обнаружилось развитие до позеленения и раскрытия семядольных листочков, 25% дошли до стадии прорастания почки и образования розетки листьев, 25% показали формирование хорошо развитого побега с корнем (рис. 2.)



а.



б.



в.

*Рисунок 2 - Введение гибридных форм 2-15-2 x 25-37-45 (2A):*

а, б – 47 сутки после введения; в – 57 сутки после введения.

НанАргол оказал негативное влияние на развитие зародышей: 74% не показали рост и развитие, 6% эксплантов развились до позеленения и раскрытия семядольных листочков, 13% дошли до стадии прорастания почки и образования розетки листьев, 7% – до формирования хорошо развитого побега с корнем (рис. 3).

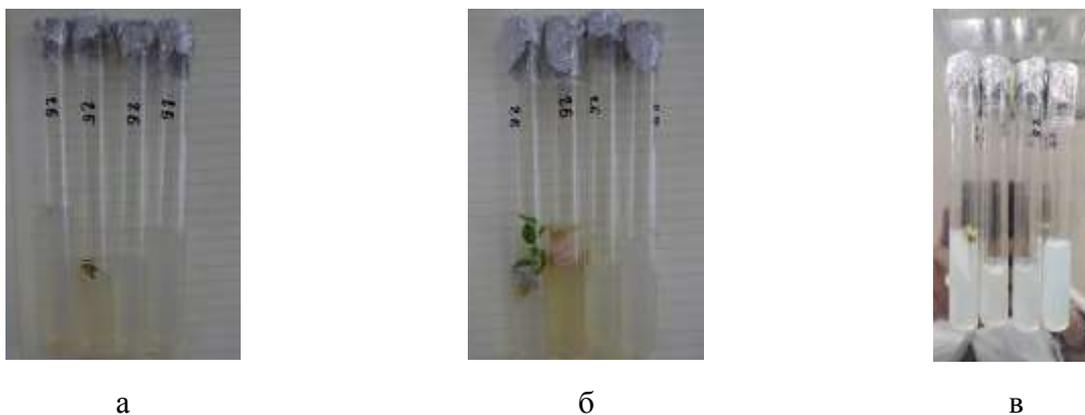


Рисунок 3 - Введение гибридных форм 2-15-2 x 25-37-45 (2B):  
а, б – 47 сутки после введения; в – 57 сутки после введения.

Результаты применения раствора 2в: выявлен 100% эффект стерилизации, а также минимальный уровень развития эксплантов: 81,25% зародышей не развились, 6,25% развился до позеленения и раскрытия семядольных листочков, 6,25% эксплантов дошел до стадии прорастания почки и образования розетки листьев и 6,25% - до формирования хорошо развитого побега с корнем (рис. 4).

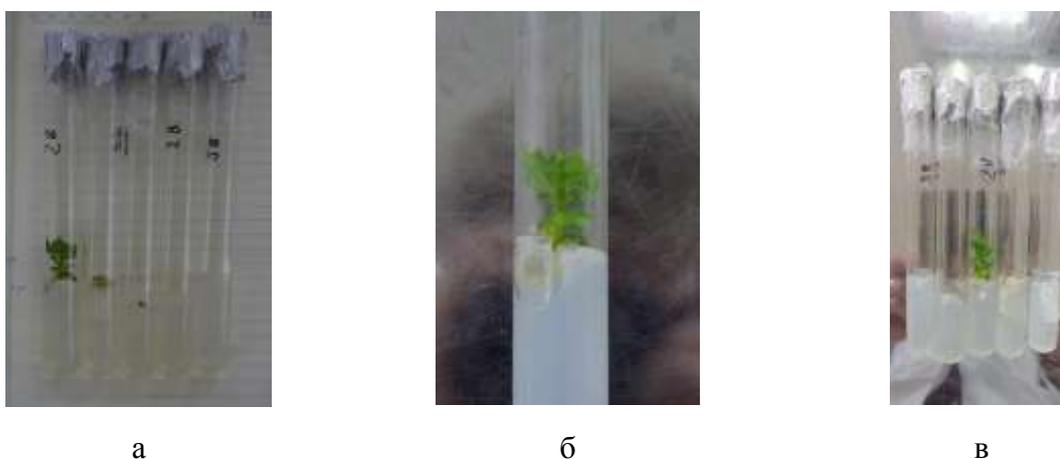


Рисунок 4 - Введение гибридных форм 2-15-2 x 25-37-45 (2B):  
а, б. – 47 сутки после введения, в - 57 сутки после введения.

При применении Anti-AntiGibco 87% пробирок остались стерильны, 13% заражены. Результаты развития зародышей: 53,4% не развились, 13,4% развились до позеленения и раскрытия семядольных листочков, 13,2% эксплантов дошли до стадии прорастания почки и образования розетки листьев и 20% – до формирования хорошо развитого побега с корнем.

Таблица 1

Развитие гибридных зародышей яблони *in vitro*.

Комбинация скрещивания	Состояние стерильности пробирок		Развитие зародышей, %			
	Стерильных, %	Нестерильных, %				
1А	100	0	0		0	
2А	62,5	37,5	5	5	5	5
2Б	94	6	4		3	
2В	100	0	1,25	,25	,25	,25
3А	87	13	3,4	3,4	3,2	0

Развитие зародышей по бальной шкале: 1-отсутствие роста; 2-позеленение и раскрытие семядольных листочков; 3-прорастание почки и образование розетки листьев; 4-формирование хорошо развитого побега с корнем.

### Выводы

1. В этапе стерилизации с лучшей стороны показали себя средство Anti-Anti и дистиллированная вода. Лучшим для стерилизации, но худшим для размножения и развития растений, стал стерилизатор перекись водорода.

2. Наиболее приспособленным для введения и размножения является комбинированный подвой 2-15-2 x 25-37-45: 75% эксплантов прошли стадии от позеленения и раскрытия семядольных листочков до формирования хорошо развитого побега с корнем.

#### Список литературы:

1. Григорьева Л. В., Кирина И. Б., Третьякова Я. А. Мичуринские сады: прошлое, настоящее и будущее // Наука и Образование. 2020. Т. 3. № 3. С. 7.
2. Кухарчик Н.В. Получение посадочного материала плодовых и ягодных растений *in vitro* // Наука и инновации. 2019. № 6 (196). С. 17-21.
3. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Технология клонально-микроразмножения яблони и груши (метод.рек.). Мичуринск: ВСТИСП, 2008. 32с.
4. Папихин Р.В. Повышение эффективности отдалённой гибридизации семечковых плодовых культур: Монография / Р.В. Папихин, С.А. Муратова. Мичуринск: Изд-во Мичуринского госагроуниверситета, 2011. – 116 с.
5. 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.
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. Dubrovsky M.L., Papikhin R.V. Analysis of the karyotype of the Russian apple tree clonal rootstocks bred at the Michurinsk State Agrarian University // *Revista Amazonia Investiga*. 2019. Vol. 8 Núm. 21. P. 688-698.
8. Development of methods for introducing hybrid progeny of *Malus sieboldii* Rehd. at *in vitro* conditions / R. Papikhin, S. Muratova, M. Dubrovsky, E.

Grigoryeva // E3S Web Conf. Innovative Technologies in Science and Education (ITSE-2020). 2020. V. 210. URL: [www.e3s-conferences.org/articles/e3sconf/pdf/2020/70/e3sconf\\_itse2020\\_06024.pdf](http://www.e3s-conferences.org/articles/e3sconf/pdf/2020/70/e3sconf_itse2020_06024.pdf) (Last accessed: 12.12.2020). DOI: 10.1051/e3sconf/202021006024

9. Zhuravleva A.V. [Reproduction of clonal rootstocks of an apple tree by green and lignified cuttings], in Dostizheniyanaukiitekhniki APK, 2017, vol. 31, no 12, pp. 44-46 (in Russ.)

**UDC 634.7:581.143.6**

**INFLUENCE OF THE METHOD OF STERILIZATION OF *MALUS DOMESTICA* CLONAL ROOTSTOCKS ON *IN-VITRO* CULTURE**

**Alexey A. Privalov**

Postgraduate student  
asher\_satton@mail.ru

**Roman V. Papikhin**

Head of the Scientific Center of Biotechnology and Breeding  
parom10@mail.ru

**Roman A. Chmir**

Head of the Center for Development of Children's Modern Competences  
romanchmir3@mail.ru

**Elena V. Grigoryeva**

postgraduate student  
Michurinsk State Agrarian University  
Michurinsk, Russia

**Abstract.** The prospects, rationality and efficiency of clonal micropropagation have been proved and adopted by many scientists of the world. The primary stage in clonal micropropagation technology is the in vitro introduction of eclants into culture.

The most common problems at this stage are death of explants from infection, both brought into the culture in vitro with the explants themselves, and ingested from the external environment during the passage, as well as the low level of regeneration of microsprouts. Sterilizers and antibiotics are used to sanitize explants and culture media from infection. The ability to regenerate explants depends to a large extent on the period of their isolation from the original mother plants.

In the sterilization stage, Anti-Anti and distilled water have proven to be the best. The best for sterilization, but the worst for plant propagation and development, was the hydrogen peroxide sterilizer.

The combined 2-15-2 x 25-37-45 rootstock is the most adapted for introduction and propagation: 75% of explants passed the stages from greening and opening of cotyledons to formation of a well-developed shoot with a root.

**Key words:** Malusdomestica, biotechnology, clonal micropropagation, eclanthus, in vitro.

Статья поступила в редакцию 10.11.2021; одобрена после рецензирования 01.12.2021; принята к публикации 15.12.2021.

The article was submitted 10.11.2021; approved after reviewing 01.12.2021; accepted for publication 15.12.2021.