

УДК 57.085.23:634.10

UDC 57.085.23:634.10

06.00.00 Сельскохозяйственные науки

Agricultural sciences

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИИ
КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ
ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ НА ЭТАПЕ ВВЕДЕНИЯ В
КУЛЬТУРУ IN VITRO****IMPROVEMENTS OF CLONAL
MICROPROPAGATION TECHNOLOGY
OF APPLE ROOTSTOCKS AT THE STAGE
OF INTRODUCTION TO IN VITRO
CULTURE**

Беседина Екатерина Николаевна
SPIN-код 2082-2580
caterina.paletskaya@mail.ru

Besedina Ekaterina Nikolaevna
RSCI SPIN-code 2082-2580
caterina.paletskaya@mail.ru

Бунцевич Леонид Леонтьевич
канд. биол. наук
SPIN-код 2314-5652

Buntsevich Leonid Leontievich
Cand.Biol.Sci.
RSCI SPIN-code 2314-5652

leobun@mail.ru

Federal State Budget Scientific Organization

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

*«North Caucasian Regional Research Institute of
Horticulture and Viticulture», Krasnodar, Russia*
leobun@mail.ru

Этап введения эксплантов в культуру in vitro является важным этапом технологии клонального микроразмножения растений. С целью снижения доли погибших от инфекции эксплантов и повышения их регенерационной способности были выделены эффективные и безопасные для эксплантов подвоев яблони стерилизаторы и антибиотики, а также выделены благоприятные сроки введения в культуру in vitro. В результате проведенных исследований установили, что по влиянию на средовую и посадочную инфекцию и на рост и развитие растений, благоприятное влияние на микропобеги подвоев яблони оказывает антибиотик нистатин 200 мг/л: коэффициент размножения на среде с данным антибиотиком равен 4,3, в этой же концентрации нистатин обладает saniрующим эффектом 60-75 % для подвоев СК 2 и ММ 106. В ходе исследований стерилизаторов эксплантов подвоев яблони СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106 в качестве альтернативы широко применяемому высокотоксичному стерилизатору сулема (первый класс опасности) были подобраны эффективные и безопасные препараты для санации эксплантов от инфекции, такие как бытовой препарат «Белизна» (гипохлорит натрия) в разведении 1:2, малоопасное вещество четвертого класса опасности (доля жизнеспособных эксплантов 75,5% от изначально высаженных), а также фосфопог, препарат четвертого класса опасности (доля жизнеспособных эксплантов 65% от изначально высаженных). Благоприятным сроком введения меристемы подвоев яблони в культуру in vitro являются фазы распускания почек (март) и интенсивного роста побегов (май – июнь)

The stage of introduction of plantlets to in vitro culture is an important stage of technology of clonal micropropagation of plants. For the purpose of decrease in a share of the plantlets that were lost from an infection and increase of their regeneration ability, sterilizers and antibiotics, effective and safe for apple rootstocks' plantlets were allocated, and also favorable terms of introduction to in vitro culture were allocated. As a result of the conducted researches, we have established that on influence on a nutrient medium and plantlets infection and on growth and development of plants, beneficial effect on apple rootstocks' plantlets has an antibiotic nystatin of 200 mg/l: the reproduction coefficient on the medium with this antibiotic is equal 4,3, in the same concentration nystatin has the sanifying effect of 60-75% for stocks of SK 2 and MM 106. During researches of sterilizers for apple rootstocks' plantlets SK 2, SK 3, SK 4, SK 7, MM 106 as an alternative to widely applied highly toxic sterilizer corrosive sublimate (the first class of danger) were picked up effective and safe preparations for sanitation of plantlets from an infection, such as the household preparation "Whiteness" (sodium hypochlorite) in cultivation 1:2, low-dangerous substance of the fourth class of danger (a share of viable plantlets of 75,5% from initially introduced), and also fosfopag, a preparation of the fourth class of danger (a share of viable plantlets of 65% from initially introduced). The favorable term for a meristem of apple rootstocks' plantlets' introduction to in vitro culture are phases of buds' burgeoning (March) and the intensive growth of shoots (May – June)

Ключевые слова: КЛОНАЛЬНОЕ

Keywords: CLONAL MICROPROPAGATION,

МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ, ПОДВОИ ЯБЛОНИ,
СТЕРИЛИЗАТОРЫ, АНТИБИОТИКИ, СРОКИ
ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ IN VITRO

APPLE ROOTSTOCKS, STERILIZERS,
ANTIBIOTICS, TERMS FOR INTRODUCTION
TO IN VITRO CULTURE

Введение. Метод клонального микроразмножения растений является на данный момент времени наиболее перспективным методом размножения растений. Этап введения эксплантов в культуру *in vitro* является важным этапом технологии клонального микроразмножения. Основными проблемами на данном этапе являются гибель эксплантов от инфекции, как занесённой в культуру *in vitro* с самими эксплантами, так и попавшей из внешней среды во время пассажа, а также низкий уровень регенерации микропобегов. Для санации эксплантов и питательных сред от инфекции применяют стерилизаторы и антибиотики. Проявление регенерационной способности эксплантов в значительной степени зависит от срока их изоляции с исходных маточных растений.

Новизна работы заключается в том, что на этапе введения эксплантов в культуру *in vitro* нами протестирован ряд не применявшихся ранее в клональном микроразмножении препаратов для стерилизации эксплантов и антибиотиков наравне с уже известными в данной технологии препаратами, была испытана их эффективность для подвоев яблони серии СК и ММ 106, а также выделены оптимальные сроки изоляции эксплантов данных подвоев с исходных маточных растений.

Объекты и методы исследований. За основу для проведения эксперимента была взята методика Высоцкого В.А. и др. [2, 4, 6].

Объектами исследований явились различные химические соединения – антибиотики и стерилизаторы, а также приёмы культивирования, в частности, различные сроки введения в культуру *in vitro* подвоев яблони СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106.

Для стерилизации использованы ранее не применявшиеся в клональном микроразмножении подвоев яблони препараты фосфопаг,

скор, эупарен, делан. Выбор в пользу данных веществ был сделан потому, что они являются умеренно опасными и малоопасными: скор, эупарен, делан относятся к третьему классу опасности, фосфопаг – к четвёртому. Экспериментальные препараты обладают различным спектром действия: скор – системный фунгицид [8], делан – контактный фунгицид [3], эупарен эффективен против грибных болезней и клещей [14], фосфопаг обладает противомикозной, антибактериальной, а также противовирусной активностью [10, 11]. Также были использованы уже известные в технологии клонального микроразмножения стерилизаторы, испытана их эффективность для подвоев яблони серии СК и ММ 106, такие как перекись водорода (H_2O_2), бытовой препарат «Белизна» (гипохлорит натрия ($NaClO$)). В качестве стандарта нами было использовано широко применяемое в технологии клонального микроразмножения вещество – сулема, препарат относится к первому классу опасности - вещества чрезвычайно опасные [4].

Проведён анализ эффективности группы антибиотиков: цефотаксим, тетрациклин, нистатин. Цефотаксим — лекарственное средство, полусинтетический антибиотик группы цефалоспоринов III поколения, эффективен в отношении многих грамположительных аэробов и анаэробов и обладает высокой активностью к грамотрицательным бактериям. [12]. Тетрациклин - бактериостатический антибиотик из группы тетрациклинов. Активен в отношении грамположительных микроорганизмов, грамотрицательных микроорганизмов, большинства энтеробактерий [9]. Нистатин - антибиотик из группы полиенов, обладает фунгистатическим действием. Высокоактивный в отношении дрожжеподобных грибов препарат. [7].

Экспланты подвоев яблони СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106 вводили в культуру *in vitro* в разные месяцы с февраля по июль.

На этапе введения эксплантов в культуру *in vitro* использовали среду Мурасиге-Скуга с половинным содержанием минеральных солей, дополненную 6-БАП 0,4 мг/л. В состав сред отдельно вносили 400-500 мг/л антибиотиков. Культивирование микропобегов осуществляли в условиях стандартного фотопериода 16/8 (день - 16 часов, ночь - 8 часов), освещенности 2500-3000 люкс, температуре $+23\pm 3$ °С и влажности 50-60 %. Каждые 30-40 суток проводили субкультивирование новых побегов на свежую питательную среду.

Обсуждение результатов.

Эффективность антибиотиков различных групп для оздоровления эксплантов подвоев яблони от инфекций различной этиологии. Изучали влияние комплексных антибиотиков на средовую инфекцию, посадочную инфекцию, на рост растений, а также на эффективность лечения эксплантов, заражённых во время пассажей бактериальными или грибными болезнями. В процессе культивирования пробирочных растений осуществляли контроль за наличием бактериального и грибного заражения, за развитием растений.

Изучено влияние антибиотиков на средовую инфекцию. Эксплантаты отбирали в фазу активного роста. Верхушечные и боковые почки поверхностно стерилизовали водным мыльным раствором в течение 10 минут при тщательном помешивании и промывали час проточной водой. Почки стерилизовали 0,1 % раствором сулемы в течение 3 мин., при активном перемешивании стерилизующего раствора. Затем проводили двукратную промывку дистиллированной водой в течение 6 мин.

Питательную среду готовили по прописи Мурасиге-Скуга с 0,5 мг/л 6-БАП. Антибиотики растворяли в стерильной воде и добавляли в сосуды с питательной средой непосредственно перед автоклавированием. Концентрация препаратов 0,5; 10; 100; 200 мг/л. В качестве контроля

использовали среду без антибиотиков. Ревизия состояния эксплантов проходила через 30-35 дней от посадки. Результаты изучения эффективности антибиотиков приведены в таблицах 1, 2, 3.

Таблица 1 – Результативность введения в культуру *in vitro* клонового подвоя СК 2 на среды с различными антибиотиками

Среда	Посажено эксплантов, шт.	Инфицировано эксплантов		Экспланты без инфекции	
		шт.	%	шт.	%
Контроль (без антибиотика)	100	70,0	70,0	30,0	30,0
Цефотаксим 0,5 мг/л	100	40,0	40,0	60,0	60,0
Цефотаксим 10 мг/л	100	33,0	33,0	67,0	67,0
Цефотаксим 100 мг/л	100	56,0	56,0	44,0	44,0
Цефотаксим 200 мг/л	100	33,0	33,0	67,0	67,0
Тетрациклин 0,5 мг/л	100	33,0	33,0	67,0	67,0
Тетрациклин 10 мг/л	100	33,0	33,0	67,0	67,0
Тетрациклин 100 мг/л	100	60,0	60,0	40,0	40,0
Тетрациклин 200 мг/л	100	33,0	33,0	67,0	67,0
Нистатин 0,5 мг/л	100	33,0	33,0	67,0	67,0
Нистатин 10 мг/л	100	44,0	44,0	56,0	56,0
Нистатин 100 мг/л	100	88,0	88,0	12,0	12,0
Нистатин 200 мг/л	100	25,0	25,0	75,0	75,0
НСР ₀₅		12,0	12,0	12,0	12,0

Как видно из таблицы 1, максимальная доля прижившихся, нормально развитых (75%) микрорастений отмечена при использовании нистатина в концентрации 200 мг/л. Добавление в среду любого антибиотика из протестированных, кроме тетрациклина 100 мг/л и нистатина 100 мг/л, существенно повышает жизнеспособность эксплантов (НСР₀₅=12).

Таблица 2 – Результативность введения в культуру *in vitro* подвоя СК 3 на среды с различными антибиотиками

Среда	Посажено эксплантов, шт.	Инфицировано эксплантов, %		Экспланты инфекции, % без	
		шт.	%	шт.	%
Контроль (без антибиотика)	100	80	80	20,0	20,0
Цефотаксим 0,5 мг/л	100	60,0	60,0	40,0	40,0
Цефотаксим 10 мг/л	100	80,0	80,0	20,0	20,0
Цефотаксим 100 мг/л	100	60,0	60,0	40,0,	40,0,
Цефотаксим 200 мг/л	100	40,0	40,0	60,0	60,0
Тетрациклин 100 мг/л	100	40,0	40,0	60,0	60,0
Тетрациклин 200 мг/л	100	50,0	50,0	50,0	50,0
Нистатин 0,5 мг/л	100	60,0	60,0	40,0	40,0
Нистатин 10 мг/л	100	60,0	60,0	40,0	40,0
Нистатин 100 мг/л	100	100,0	100,0	0,0	0,0
Нистатин 200 мг/л	100	75,0	75,0	25,0	25,0
НСР ₀₅		13,0	13,0	13,0	13,0

Согласно таблице 2, для подвоя СК 3 наиболее эффективным оказались цефотаксим в концентрации 200 мг/л (60% здоровых эксплантов) и тетрациклин 100 мг/л (60% здоровых эксплантов). Существенно по сравнению с контролем повышают жизнеспособность эксплантов также препараты цефотаксим в концентрации 0,5 мг/л, 100 мг/л, 200 мг/л, тетрациклин 100 мг/л, 200 мг/л, нистатин 0,5 мг/л, 10 мг/л (НСР₀₅=13).

Таблица 3 – Результативность введения в культуру *in vitro* подвоя ММ 106 на среды с различными антибиотиками

Среда	Посажено эксплан-тов, шт.	Инфицировано и некротировало эксплантов		Экспланты инфекции без	
		шт.	%	шт.	%
Контроль (без антибиотика)	100	65,0	65,0	35,0	35,0
Цефотаксим 0,5 мг/л	100	80,0	80,0	20,0	20,0
Цефотаксим 10 мг/л	100	75,0	75,0	25,0	25,0
Цефотаксим 100 мг/л	100	75,0	75,0	25,0	25,0
Цефотаксим 200 мг/л	100	100,0	100,0	0,0	0,0
Тетрациклин 100 мг/л	100	100,0	100,0	0,0	0,0
Тетрациклин 200 мг/л	100	100,0	100,0	0,0	0,0
Нистатин 0,5 мг/л	100	100,0	100,0	0,0	0,0
Нистатин 10 мг/л	100	70,0	70,0	25,0	25,0
Нистатин 100 мг/л	100	60,0	60,0	40,0	40,0
Нистатин 200 мг/л	100	40,0	40,0	60,0	60,0
НСР ₀₅		14,0	14,0	14,0	14,0

Для подвоя ММ 106 (таблица 3) эффективным оказался антибиотик нистатин 200 мг/л (60% здоровых эксплантов). Он единственный из протестированных препаратов существенно повышает жизнеспособность экплантов (относительно контроля, $НСР_{05}=14$).

Анализируя результаты (таблица 1-3) можно отметить, что морфогенетическая реакция эксплантов на антибиотики сортоспецифична. Установлено, что значительное количество введенных экплантов ММ 106 некротирует (25-100%). Количество нормально развитых апексов, дающих начало конгломерату микрорастений, для разных подвоев колеблется от 0 до 75 (таблица 1-3). Питательные среды с содержанием антибиотика нистатин в концентрации 200 мг/л оказались благоприятны для подвоев СК 2 (75% здоровых экплантов) и ММ 106 (60% здоровых экплантов), для подвоев СК 3 максимальный выход нормально развитых микропобегов наблюдается на средах с антибиотиками терациклин 100 мг/л и цефотаксим 200 мг/л (60% здоровых экплантов в обоих вариантах).

Важным аспектом применения антибиотиков является определение порядка ввода их в среду: до или после автоклавирования. Использовали среду Мурасиге-Скуга с 0,5 мг/л 6-БАП. Антибиотики растворяли в стерильной воде и добавляли в питательные среды непосредственно до и после автоклавирования.

В таблице 4 приведены результаты воздействия на среду и экпланты антибиотиков при добавлении их в среду непосредственно перед автоклавированием и после автоклавирования в охлажденную до 45 °С среду. В качестве контроля использовали среду без антибиотиков. Инфекцию в среде регистрировали в течение месяца.

Таблица 4 – Результаты инфицированности эксплантов при использовании антибиотиков до и после автоклавирования

Среда	Доля инфицированных эксплантов при добавлении антибиотика до автоклавирования, %	Доля инфицированных эксплантов при добавлении антибиотика после автоклавирования, %
Контроль (без антибиотика)	75,0	98,0
Цефотаксим 200 мг/л	17,0	89,0
Тетрациклин 100 мг/л	26,0	65,0
Нистатин 200 мг/л	44,0	91,0
НСР ₀₅		26,0

Данные таблицы 4 показывают очень высокий процент инфицированности среды при добавлении антибиотиков после автоклавирования. Значительно меньшая инфицированность проявляется при добавлении антибиотиков перед автоклавированием. Различие между вариантами «до» и «после» автоклавирования существенно по каждому виду антибиотиков. Проанализировав полученные данные при добавлении антибиотиков, можно сделать вывод о том, что метод «после автоклавирования» является нерациональным в использовании.

Для определения влияния антибиотиков на рост микробогеов экспланты СК 2 культивировали на средах с антибиотиками в течение 1-го месяца. Для культивирования использовали среду Мурасиге-Скуга с 0,5 мг/л 6-БАП. Применяли антибиотики: цефотаксим, тетрациклин и нистатин. Антибиотики растворяли в стерильной воде и добавляли в питательную среду непосредственно перед автоклавированием. Концентрация антибиотиков среде 0,5, 10, 100 и 200 мг/л. В качестве контроля использовали среду без антибиотиков (таблица 5).

Таблица 5 – Коэффициент размножения микробогеов СК 2 на средах с антибиотиками в различных концентрациях

Антибиотик	Концентрация антибиотиков, мг/л					
	0,5	10	20	50	100	200
Цефотаксим	2,4	2,9	1,0	1,0	1,8	2,0
Тетрациклин	1,0	1,0	3,0	3,2	1,8	2,7
Нистатин	3,6	1,5	2,1	2,4	2,7	4,3
Контроль	2,2	2,1	2,2	2,3	2,0	2,2
НСР ₀₅	1,3	1,0	1,0	1,1	0,7	1,3

Микропобеги подвоя СК 2 по-разному вели себя на опытных средах. На контрольной среде побеги развивались хорошо. Коэффициент размножения 2,2 (таблица 5).

На питательных средах с цефотаксимом во всех испытываемых концентрациях можно отметить, что микропобеги развивались положительно, однако, в концентрациях 20 мг/л и 50 мг/л мультипликации микропобегов не происходит (рисунок 1).



Рисунок 1 – Микропобеги подвоя СК 2 на средах слева направо: с антибиотиком тетрациклин 200 мг/л, цефотаксимом 50 мг/л, нистатином 200 мг/л

Максимальный коэффициент размножения наблюдался в концентрации 10 мг/л и составляет 2,9 (таблица 5).

На наличие тетрациклина в концентрации 50 мг/л побеги реагировали положительно, коэффициент на данной среде наивысший и составляет 3,2 (таблица 5). На среде с тетрациклином в концентрации 20 мг/л наблюдалась витрификация побегов. На средах с тетрациклином 100 и 200 мг/л микропобеги развивались слабые и умеренно-зеленого цвета (рисунок 1).

Максимальная стимуляция процессов роста побегов отмечена при концентрации 200 мг/л антибиотика нистатина, что доказывает коэффициент размножения, равный 4,3 (различие с контролем

существенно). Нистатин в данной концентрации заметно ускорял развитие микропобегов (рисунок 1). Побегов на наличие в питательной среде нистатина в концентрациях 0,5 и 100 мг/л реагировали положительно, коэффициент размножения составил 3,6; 2,7 соответственно (различие с контролем существенно, таблица 5). Антибиотик нистатин в концентрации 10 мг/л стимулировал развитие каллуса, микропобеги развивались умеренно-зелёного цвета.

Таким образом, проанализировав полученные данные серии проведённых опытов с антибиотиками цефотаксим, тетрациклин, нистатин выявили, что по влиянию антибиотиков на средовую и посадочную инфекцию и на рост и развитие растений, наилучшее влияние на микропобеги оказывает нистатин 200 мг/л: коэффициент размножения на среде с данным антибиотиком равен 4,3, в этой же концентрации нистатин обладает saniрующим эффектом 60-75 % для подвоев СК 2 и ММ 106.

Подбор эффективных и безопасных стерилизаторов для санации эксплантов подвоев яблони. Для стерилизации использованы ранее не применявшиеся в клональном микроразмножении подвоев яблони препараты фосфопаг, скор, эупарен, делан. В качестве контроля высажены не стерилизованные меристемы, а в качестве стандарта взят йодид ртути, широко применяемый в клональном микроразмножении стерилизатор, который относится к первому классу опасности (таблица 6).

Таблица 6 - Анализ эффективности стерилизующих препаратов при обработке эксплантов перед посадкой

Стерилизующий агент	Повторности	Посажено эксплантов, шт.	Инфицировано, шт.	Выход, шт.	Доля жизнеспособных эксплантов, %	
					по повторностям	в среднем
без стерилизации (контроль)	1	100	100	0	0	0
	2	100	100	0	0	
Фосфопаг 0,5г/100мл г	1	100	50	50	50,0	65
	2	100	20	80	80,0	
Скор 0,2г/100мл	1	90	60	30	33,3	16,7
	2	90	90	0	0,0	
Эупарен 0,2г/100мл	1	90	80	20	22,2	11,1
	2	100	100	0	0,0	
Делан 0,2г/100мл	1	100	90	10	10,0	5
	2	90	90	0	0,0	
HgI ₂ 0,1г/100мл (стандарт)	1	450	260	190	42,2	25,3
	2	240	220	20	8,3	
НСР ₀₅					17,6	22,7

Установлено, что максимальный выход стерильных эксплантов обеспечивает препарат фосфопаг 0,5 г/100 мл (65%, различие среднего значения по двум повторностям со стандартом существенно, таблица б). Другие экспериментальные препараты, как видно из таблицы б, оказались неэффективными стерилизаторами эксплантов подвоев яблони.

В качестве замены высокотоксичному, но наиболее известному препарату сулемы был также испытан малотоксичный для человека и эффективный стерилизатор гидропирит. Объектами для подбора эффективных стерилизаторов послужили экспланты подвоев яблони серии СК и ММ 106. Исследовали 15% водный раствор гидропирита (CO(NH₂)₂xH₂O₂) в различных экспозициях.

В опыте 3 варианта: обработка эксплантов водой (контроль); обработка эксплантов йодидом ртути (HgI₂) 0,1 % с экспозицией 3 минуты (стандарт); обработка эксплантов 15% раствором гидропирита (CO(NH₂)₂xH₂O₂) - время стерилизации 10, 20, 30 минут.

После поверхностной обработки эксплантов их поместили на санитарную питательную среду по Мурасиге и Скугу, состоящую из минеральных солей, витаминов, сахарозы, агара, без ростовых веществ.

В течение месяца проводились наблюдения за регенерацией микропобегов. Оценивалось проявление стерилизующей активности вещества, т.е. обеспечение максимального количества стерильных эксплантов, а также влияние препаратов на регенерацию эксплантов. Результаты исследования представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Анализ эффективности стерилизующих веществ при предпосадочной поверхностной обработке эксплантов подвоев серии СК и ММ 106

Количество эксплантов	Стерилизующее вещество									
	Без обработки (конт-роль)		HgJ ₂ 0,1% (стандарт)		15% раствор гидропирита экспозиция 10 мин.		15% раствор гидропирита экспозиция 20 мин.		15% раствор гидропирита экспозиция 30 мин.	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Посажено	200	100	200	100	200	100	200	100	200	100
Инфицировано	200	100	80	40	200	100	180	90	140	70

Анализ данных таблицы 7 показывает, что максимальный выход санированных здоровых эксплантов подвоев яблони (60 %) обеспечивает стерилизация в водном растворе иодида ртути (HgJ₂) 0,1 %. Только 30 %-ную степень оздоровления обеспечивает стерилизация в водном 15 %-м растворе гидропирита с экспозицией в 30 минут (таблица 7). Дальнейшее уменьшение времени экспозиции ведёт к уменьшению выхода здоровых эксплантов до 10 % при стерилизации в течение 20 минут, и полному отсутствию здоровых эксплантов при экспозиции 10 минут (таблица 7).

Важно отметить, что длительное нахождение эксплантов в стерилизующем растворе гидропирита (30 мин), необходимое для достижения максимального эффекта санации, неблагоприятно сказывается на жизнеспособности оздоровленных эксплантов при дальнейшем культивировании *in vitro*.

Таким образом, применение 15 % раствора гидропирита для стерилизации эксплантов вегетативно-размножаемых подвоев нецелесообразно в силу низкого выхода санированного материала. По этой причине поиски эффективного стерилизатора продолжены.

Так в ходе исследований по подбору наиболее эффективного и безопасного стерилизующего средства для санации эксплантов подвоев яблони испытан бытовой препарат «Белизна» (действующее вещество - гипохлорит натрия), разбавленный водой в соотношении 1:1; 1:2 и 1:4. Время экспозиции 4 минуты. В качестве стандарта использовали 0,1 % раствор йодида ртути (HgJ_2).

Результаты исследований изложены в таблице 8.

Анализ полученных данных показывает, что максимально сильнодействующим стерилизатором является бытовой препарат «Белизна» в разведении 1:1. Инфицированных эксплантов в этом варианте опыта не было. Однако, действие реагента на меристемы было довольно жестким. При этом, четко прослеживается реакция испытуемых образцов. Так наиболее толерантным к стерилизующему агенту был образец СК 4. В данном варианте отмечен самый высокий выход жизнеспособных эксплантов (80,7 %) и наиболее низкий процент (19,3 %) погибших. У образцов СК 2 и СК 3 выход живых меристем составил 64,2 и 57,2 %, а погибших от токсичного действия стерилизатора 35,8 и 42,8 %, соответственно (таблица 8).

Таблица 8 – Результативность стерилизации эксплантов при введении в культуру *in vitro* эксплантов подвоев яблони серии СК

Стерилизующий реагент	Эффективность стерилизации, %	Сортообразец			В среднем
		СК 2	СК 3	СК 4	
HgJ ₂ , 0,1%, стандарт	жизнеспособные	58,9	84,3	72,2	71,8
	инфицированные	5,8	5,2	0,0	3,7
	некроз	35,3	10,5	27,8	24,5
«Белизна» 1:1	жизнеспособные	64,2	57,2	80,7	67,4
	инфицированные	0,0	0,0	0,0	0,0
	некроз	35,8	42,8	19,3	32,6
«Белизна» 1:2	жизнеспособные	77,6	69,3	79,6	75,5
	инфицированные	8,4	7,7	6,8	7,6
	некроз	14,0	23,0	13,6	16,9
«Белизна» 1:4	жизнеспособные	52,0	51,4	54,0	52,5
	инфицированные	37,7	36,2	36,7	36,9
	некроз	10,3	12,4	9,3	10,7
HCP ₀₅	жизнеспособные	12,8	17,2	14,5	

Действие препарата «Белизна» в разведении 1:2 было более мягким. Выход живых эксплантов составил 77,6 % у СК 2 (различие существенно) и 69,3 % у СК 3. Значительно ниже было количество погибших эксплантов: СК 2 - 14,3 и СК 3 - 23,0 %. У образца СК 4 эти показатели составили 79,6 и 13,6 %. Однако, в варианте с разведением «Белизны» 1:2 отмечено наличие инфицированных эксплантов, составившее для образцов СК 2, СК 3, СК 4 – 8,4; 7,7 и 6,8 %, соответственно.

Самый низкий эффект стерилизации отмечен в варианте опыта с использованием препарата «Белизна» в разведении 1:4. Так, количество инфицированных эксплантов у образцов СК 2, СК 3, СК 4 составило 37,7; 36,2; 36,7; а выход жизнеспособных эксплантов 52,0; 51,3 и 54,0 %, соответственно. В то же время действие препарата на растительную ткань здесь было наиболее мягким, так как количество погибших эксплантов было в пределах 9,3-12,4 % (таблица 8).

В стандартном варианте с использованием 0,1 % раствора йодида ртути также отмечен выпад эксплантов от токсичного действия препарата.

Следует отметить, что в этом варианте опыта также прослеживается различная реакция сортообразцов на действие реагента. Так, у образца СК 3 отмечен наиболее высокий выход жизнеспособных меристем 84,3 % и низкий процент (10,5) погибших. У образца СК 4 выход живых меристем несколько ниже 72,2 %, а погибших 27,8 %, наиболее чувствительным к стерилизатору был образец СК 2: количество погибших меристем здесь было самым высоким и составило 35,3 % (таблица 8).

Таким образом, в ходе исследований в качестве альтернативы широко применяемому высокотоксичному стерилизатору сулема (первый класс опасности) были подобраны эффективные и безопасные препараты для санации эксплантов подвоев яблони от инфекции, такие как бытовой препарат «Белизна» (гипохлорит натрия) в разведении 1:2, малоопасное вещество четвёртого класса опасности (доля жизнеспособных эксплантов 75,5% от изначально высаженных), а также фосфопаг, препарат четвёртого класса опасности (доля жизнеспособных эксплантов 65% от изначально высаженных).

Оптимизация сроков введения в культуру in vitro подвоев яблони. Были проведены опыты, в ходе которых экспланты подвоев яблони СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106 вводили в культуру in vitro в разные месяцы с февраля по июль. Использовали среду МС с половинным содержанием минеральных солей, дополненную 6-БАП 0,4 мг/л. В течение месяца проводились наблюдения за регенерацией микропобегов. Оценивалась доля регенерировавших эксплантов к числу изначально высаженных. Результаты эксперимента приведены в таблице 9.

Таблица 9 – Доля регенерировавших эксплантов серии СК и ММ 106, введенных в культуру *in vitro* в разные месяцы к моменту первого пассажа, в %

Месяц/ подвой	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь	Июль
СК 2	0,0	68,8	45,9	74,9	64,1	36,3
СК 3	0,0	52,4	32,1	78,6	54,2	29,1
СК 4	0,0	70,0	45,4	49,1	51,5	46,2
СК 7	0,0	52,4	58,8	64,6	63,2	38,8
ММ 106	0,0	54,8	56,1	70,6	74,1	35,1
среднее	0,0	59,7	47,7	67,6	61,4	37,1
НСР ₀₅						6,5

Согласно данным таблицы 9, благоприятными сроками изоляции и культивирования меристем подвоев яблони оказались март-июнь с некоторым снижением в апреле. Доля регенерировавших эксплантов, высаженных *in vitro* в период март-июнь через месяц после введения в культуру составляет 47,7-67,6 % (в среднем). По месяцам средний уровень регенерации эксплантов составил в марте – 59,7 %, апреле – 47,7 %, мае 67,6 %, июне 61,4 % (таблица 9). Отмечено, что сроки введения в культуру *in vitro* дифференцированы для генотипов подвоев. В частности, для СК 2 и СК 4 оптимальными являются фазы распускания почек (март), а для СК 2, СК 3, СК 7, ММ 106 - интенсивного роста побегов (май – июнь).

Снижение уровня регенерации эксплантов подвоев яблони в апреле объясняется тем, что на этот период приходится VIII-IX этап органогенеза. В этот период гинецей и андроцей цветка находятся на завершающей стадии формирования. Фенофаза розый бутон соответствует VIII этапу органогенеза. Согласно исследованиям Исаевой И.С., Бунцевича Л.Л., Чумакова С.С., на этом этапе интенсивность формирования всех органов цветка достигает максимума. Следовательно, формирование вегетативных органов побегов снижается, так как гормональный баланс сдвинут в сторону реализации генеративного потенциала [1, 5, 13]. Маточные растения подвоев яблони, с которых были изолированы экспланты,

генетически предрасположены к реализации программ нормального органогенеза с соблюдением гормонального сдвига.

Таким образом, благоприятным сроком введения меристемы подвоев яблони в культуру *in vitro* являются фазы распускания почек (март) – для СК 2 и СК 4 и интенсивного роста побегов (май – июнь) – для СК 2, СК 3, СК 7, ММ 106.

Выводы. По влиянию на средовую и посадочную инфекцию и на рост и развитие растений, благоприятное влияние на микропобеги подвоев яблони оказывает антибиотик нистатин 200 мг/л: коэффициент размножения на среде с данным антибиотиком равен 4,3, в этой же концентрации нистатин обладает saniрующим эффектом 60-75 % для подвоев СК 2 и ММ 106. В ходе исследований стерилизаторов эксплантов подвоев яблони СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106 в качестве альтернативы широко применяемому высокотоксичному стерилизатору сулема (первый класс опасности) были подобраны эффективные и безопасные препараты для санации эксплантов от инфекции, такие как бытовой препарат «Белизна» (гипохлорит натрия) в разведении 1:2, малоопасное вещество четвертого класса опасности (доля жизнеспособных эксплантов 75,5% от изначально высаженных), а также фосфопаг, препарат четвертого класса опасности (доля жизнеспособных эксплантов 65% от изначально высаженных). Благоприятным сроком введения меристемы подвоев яблони в культуру *in vitro* являются фазы распускания почек (март) – для СК 2 и СК 4 и интенсивного роста побегов (май – июнь) – для СК 2, СК 3, СК 7, ММ 106. Использование приведённых усовершенствований на этапе введения эксплантов подвоев яблони в культуру *in vitro* позволит повысить выход оздоровленных микропобегов на 25 %.

Литература

1. Бунцевич, Л.Л. Морфофизиологические особенности формирования урожайности яблони домашней (*Malus domestica* Borkh.) / Л.Л. Бунцевич. - Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии, 2012. -107 с.

2. 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.
3. Делан / Пестициды [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://www.pesticidy.ru/pesticide/delan.html>.
4. Джигадло, Е.Н. 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.
5. Исаева, И.С. Органогенез плодовых растений / И.С. Исаева. - М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 1977. – 33 с.
6. Кухарчик, Н.В. Научные и практические основы оздоровления от вирусов и размножения плодовых и ягодных культур *in vitro*: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.05 / Кухарчик Наталья Валерьевна. – Жодино, 2006. – 40 с.
7. Нистатин / Справочник здоровья [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://it-apharm.ru/nistatin.html>.
8. Скор / Мир растений (энциклопедия ухода за растениями) [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://www.floralworld.ru/fungicid/skor.html>.
9. Терацилин / Википедия [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Тетрацилин.html>.
10. Фосфопаг / Дезреестр [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа: <http://www.dezreestr.ru/pages/dezpgs/Phsphd.html>.
11. Фосфопаг / Экосмарт [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа: http://www.biopag.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=67&Itemid=176.html
12. Цефотаксим / Википедия [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Цефотаксим.html>
13. Чумаков, С.С. Особенности органогенеза яблони и возможности его оптимизации [Электронный ресурс] / С.С. Чумаков, В.К. Бугаевский // Научный журнал КубГАУ. – 2012. - 83 (09). - Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2012/09/pdf/56.pdf>
- Эупарен / Виноград [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://vinograd.info/spravka/himikaty-i-ydobreniya/euparen.html>

References

1. Buncevic, L.L. Morfofiziologicheskie osobennosti formirovaniya urozhajnosti jabloni domashnej (*Malus domestica* Borkh.) / L.L. Buncevic. - Krasnodar: GNU SKZNIISiV Rossel'hozakademii, 2012. -107 s.
2. 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. – М., 1998. – 44 с.
3. Delan / Pesticidy [Jelektronnyj resurs]. – 2015. – Rezhim dostupa: <http://www.pesticidy.ru/pesticide/delan.html>.
4. Dzhigadlo, E.N. Metodicheskie rekomendacii po ispol'zovaniju biotehnologicheskikh metodov v rabote s plodovymi, jagodnymi i dekorativnymi kul'turami / pod red. E.N. Dzhigadlo. – Orjol: GNU VNIISPK, 2005. – 50 s.
5. Isaeva, I.S. Organogenez plodovyh rastenij / I.S. Isaeva. - M.: MGU im. M.V. Lomonosova, 1977. – 33 s.

6. Kuharchik, N.V. Nauchnye i prakticheskie osnovy ozdorovlenija ot virusov i razmnozhenija plodovyh i jagodnyh kul'tur in vitro: avtoref. dis. ... d-ra s.-h. nauk: 06.01.05 / Kuharchik Natal'ja Valer'evna. – Zhodino, 2006. – 40 s.
7. Nistatin / Spravochnik zdorov'ja [Jelektronnyj resurs]. – 2015. – Rezhim dostupa: <http://it-apharm.ru/nistatin.html>.
8. Skor / Mir rastenij (jenciklopedija uhoda za rastenijami) [Jelektronnyj resurs]. – 2015. – Rezhim dostupa: <http://www.floralworld.ru/fungicid/skor.html>.
9. Teraciklin / Vikipedija [Jelektronnyj resurs]. – 2015. – Rezhim dostupa: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Tetraciklin.html>.
10. Fosfopag / Dezreestr [Jelektronnyj resurs]. – 2012. – Rezhim dostupa: <http://www.dezreestr.ru/pages/dezpgs/Phsphd.html>.
11. Fosfopag / Jekosmart [Jelektronnyj resurs]. – 2012. – Rezhim dostupa: http://www.biopag.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=67&Itemid=176 .html
12. Cefotaksim / Vikipedija [Jelektronnyj resurs]. – 2015. – Rezhim dostupa: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Cefotaksim.html>
13. Chumakov, S.S. Osobennosti organogeneza jabloni i vozmozhnosti ego optimizacii [Jelektronnyj resurs] / S.S. Chumakov, V.K. Bugaevskij // Nauchnyj zhurnal KubGAU. – 2012. - 83 (09). - Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2012/09/pdf/56.pdf>
14. Jeuparen / Vinograd [Jelektronnyj resurs]. – 2015. – Rezhim dostupa: <http://vinograd.info/spravka/himikaty-i-ydobreniya/eyparen.html>