

К ВОПРОСУ СТЕРИЛИЗАЦИИ ЭКСПЛАНТОВ ДРЕВЕСНЫХ И ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР ПРИ ВВЕДЕНИИ В УСЛОВИЯ *IN VITRO*

Рахмангулов Р. С., Маляровская В. И.,
Самарина Л. С., Конинская Н. Г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур»,
г. Сочи, Россия, e-mail: rakhmaruslan@yandex.ru

В обзоре рассматривается актуальная проблема получения стерильной культуры древесных и плодовых растений в условиях *in vitro*. Проанализирована современная литература по данной тематике. Приведены основные стерилизующие вещества, длительность обработки эксплантов и некоторые этапы стерилизации. Показано, что для различных видов растений очень важен выбор стерилизующих химических веществ и времени их экспозиции, отчего в большей степени зависит получение жизнеспособного стерильного материала, свободного от микроорганизмов.

Ключевые слова: стерилизация эксплантов, древесные, плодовые культуры, *in vitro*.

Клональное микроразмножение древесных и плодовых культур представляет собой значительный интерес, как в фундаментальном плане, так и в коммерческом. Одним из важных аспектов культивирования растений в условиях *in vitro* является стерилизация инициальных эксплантов. От выбора стерилизующего агента, времени экспозиции и этапов проведения дезинфекции зависит получение жизнеспособного стерильного растительного материала, свободного от микроорганизмов.

Среди основных стерилизующих веществ широко представлены ртутьсодержащие препараты: сулема, диацид, фамосепт и др. Также применяют пероксид водорода, этиловый спирт, нитрат серебра, гипохлорит натрия и кальция, растворы бытового отбеливателя «Белизна» и др. В практику дезинфекции вводятся такие стерилизаторы, как «Доместос», «Велтолен», «Хлорокс» и многие другие. Применение большинства представленных веществ в больших дозах, а также при длительной обработке приводит к чрезмерной стерилизации, вызывая токсические эффекты и со временем гибель исходного материала. Для снижения такого негативного воздействия стерилизующих веществ используют многократную промывку эксплантов стерильной дистиллированной водой [3].

Чаще всего для получения высокого количества стерильных эксплантов стерилизацию проводят в несколько этапов. Так, Vacchetta с соавторами [10] проводили первичную обработку эксплантов *Corylus avellana* L. путём промывания под потоком водопроводной воды с последующим поверхностным очищением антибактериальным мылом (Lysoform Medical) и повторным промыванием водопроводной водой. Непосредственно сам процесс стерилизации осуществляли путём погружения в 70%-ный спирт в течение 5 секунд, затем обрабатывали 0,05%-ным мертиолатом натрия в течение 10 минут с добавлением нескольких капель Tween-20. Завершающим этапом стерилизации служило трёхкратное промывание эксплантов в стерильной дистиллированной воде с экспозицией в течение 5 секунд. Раствор гипохлорита натрия (1 : 5) авторы применяли для эксплантов фундука, собранных в течение зимнего периода времени [10]. Ртутьсодержащий препарат сулему использовали в виде 0,1%-ного раствора для обработки эксплантов *C. avellana* [11]. Также этим стерилизатором в течение 10 минут обрабатывали экспланты *Corylus colurna* L. [16], а экспланты *Wrightia tomentosa* Roem. & Schult. обрабатывали с добавлением Tween-20 при экспозиции 5 минут [17]. Растительный материал *Rauvolfia tetraphylla* L. перед использованием 0,1%-ного раствора сулемы в течение 3 минут поверхностно очищали 5%-ным раствором моющего средства “Teepol” [13]. Для стерилизации узловых сегментов *Shorea robusta* Gaertn. авторы использовали 0,2%-ный раствор сулемы со временем экспозиции 5 минут [19].

Аёшина Е. Н. с соавторами [1] получили 97,5 % чистых эксплантов *Juniperus sibirica* Burgsd. при стерилизации 0,1%-ным раствором диацетида с добавлением твина-80 в течение 25 минут. Для ряда древесных культур Дальнего Востока применялась обработка мыльно-щелочным раствором и 0,1%-ным раствором диацетида [2]. В результате исходный растительный материал листовых пород (*Rhododendron*, *Philadelphus tenuifolius* Rupr. et Maxim, *Princepia sinensis* (Oliv.) Bean.) имел высокий показатель выхода стерильных эксплантов (до 70 %), тогда как для хвойных растений (*Juniperus rigida* Siebold et Zucc. subsp. *litoralis* Urussov, *Taxus cuspidata* Siebold & Zucc. и *Picea pungens* Engelm.), наоборот, выход стерильной культуры составлял всего лишь от 20 до 40 %.

Для стерилизации также широко используются гипохлорит натрия и кальция. Многие исследователи в процессе стерилизации эксплантов различных видов растений (*Corylus avellana* L.) применяли гипохлорит натрия. Так, Yu и Reed (1985) при стерилизации гипохлоритом натрия эксплантов сортов фундука ‘Barcelona’ и ‘Gasaway’ получили 7 и 60 % жизнеспособных эксплантов соответственно [20]. Применение другого

стерилизующего вещества – хлорокса – в концентрации 30 % обеспечивало 96 % незаражённых жизнеспособных эксплантов *Acacia senegal* (L.) Britton [12].

Также ведутся исследования по подбору оптимальных концентраций стерилизующих агентов. Положительные результаты были получены Ferreira de Santana с соавторами [14] при введении в культуру *in vitro* эксплантов *Annona cauliflora* Mart., *A. bahiensis* (Maas & Westra) H. Rainer и *A. glabra* L., которые использовали стандартные этапы стерилизации с различными вариантами растворов гипохлорита натрия в концентрациях 20, 50 и 100 % (2,0–2,5% активного хлора) с добавлением Tween-20 и предварительной обработкой 70%-ным спиртом в течение 30 секунд. Негмауни с соавторами [15] для стерилизации черенков *Durio zibethinus* L. использовали 20, 30, 40 и 50%-ные растворы гипохлорита натрия и кальция в экспозиции 10 и 15 минут с добавлением Tween-20. При стерилизации этими веществами результаты были неодинаковы. Так, при стерилизации гипохлоритом натрия в концентрации 20 и 30 % было получено 60 % жизнеспособных эксплантов; в то время как при стерилизации гипохлоритом кальция в данной концентрации получено 100 % живых эксплантов.

Для получения стерильных эксплантов используют комплекс различных антибиотиков и фунгицидов. Так, Ferreira de Santana с соавторами [14] добавляли в питательные среды фунгицид бенлат и антибиотик ампициллин в различных концентрациях от 1 до 4 г/л. В результате совместного применения фунгицида и антибиотика в питательной среде для видов *Annona cauliflora*, *A. bahiensis* и *A. glabra* выход стерильных эксплантов составил 91,5 %, 54,1 % и 37,7 % соответственно. Некоторые авторы для подавления микрофлоры в питательной среде используют 0,1–0,2%-ный бавистин и 0,1%-ный тетрациклин в течение 10–15 минут с последующей стерилизацией 0,1%-ным раствором хлорида ртути продолжительностью 5–6 минут при дополнительной обработке эксплантов 90%-ным спиртом в течение 60 секунд. [19]. Из литературных источников также известно, что добавление 400 мг/л тетрациклина повышало процент стерильных эксплантов *Citrus limon* L. (Burm.) до 65,4 %, по сравнению с контролем (27,7 %) [9].

Для растительного материала *Camellia japonica* L. также было показано положительное действие в составе питательной среды тетрациклина гидрохлорида в концентрации 600–800 мг/л, который обеспечивал выход до 45,4 % стерильных эксплантов [7]. Аналогичное действие было выявлено и для эксплантов *Thea sinensis* L., при концентрации 500 мг/л выход стерильного материала составлял до 22,9 % [5].

Некоторыми исследователями для усиления стерилизующего эффекта применяется постоянное перемешивание эксплантов со стерилизующими веществами в сосудах с помощью шейкеров, диапазон которых 170–250 оборотов в минуту [15].

В целом, несмотря на сложность введения в условия *in vitro* эксплантов различных древесных и плодовых культур, отмечается интенсивное развитие и корректировка регламентов стерилизации растительного материала [5, 6, 8]. Многие исследователи применяют широкий спектр доступных стерилизующих веществ, вспомогательных омыляющих детергентов; внедряют новые современные технические решения. В результате проведённых опытов авторами получены стерильные жизнеспособные экспланты как задел для дальнейшей работы в области культуры клеток и тканей.

Библиографический список

1. Аёшина Е.Н., Величко Н.А. Регенерация *Juniperus sibirica* В. *in vitro* // Хвойные бореальной зоны. – 2008. – Т. 25 (3). – С. 333-336. – ISSN: 1993-0135.
2. Бабилова А.В., Гафицкая И.В., Журавлёв Ю.Н. Микрклональное размножение древесных лесных растений Дальнего Востока России: перспективы развития // Размножение лекарственных растений в культуре *in vitro* как основа плантационного лесовыращивания: материалы междунар. научно-практ. конф., г. Йошкар-Ола, 24-27 сентября 2014 г. – Йошкар-Ола, 2014. – 172 с. – ISBN: 978-5-8158-1463-9.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 158 с.
4. Гвасалия М.В. Клональное микроразмножение растений чая (*Thea sinensis* L.) в культуре *in vitro* // Садоводство и виноградарство. – 2012. – № 6. – С. 27-30. – ISSN: 0235-2591.
5. Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Гвасалия М.В., Самарина Л.С., Соколов Р.Н. Микроразмножение *in vitro* субтропических, декоративных культур и эндемиков Западного Кавказа: оригинальные и оптимизированные протоколы // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 3. – С. 49-58. – doi: 10.15389/agrobiology.2014.3.49rus
6. Коломиец Т.М., Самарина Л.С. Методика длительного сохранения *in vitro* промышленных видов и перспективных сортов рода *Citrus* // Субтропическое и декоративное садоводство: сб. науч. тр. – Сочи: ВНИИЦиСК, 2016. – Т. 56. – С. 169-184. – ISSN: 2225-3068.
7. Маляровская В.И. Особенности получения стерильной культуры камелии японской (*Camelia japonica* L.) // Субтропическое и декоративное садоводство: сб. науч. тр. – Сочи: ВНИИЦиСК, 2012. – Вып. 47. – С. 161-167. – ISSN: 2225-3068.
8. Маляровская В.И., Самарина Л.С. Введение в культуру *in vitro* *Hydrangea macrophylla* Ser. и изучение её регенерационного потенциала // Труды ботанического института. – Сухум, 2017. – Вып. V. – С. 88-97.
9. Самарина Л.С., Коломиец Т.М., Горшков В.М. Оценка регенерационной способности эксплантов цитрусовых *in vitro* // Садоводство и виноградарство. – 2012. – № 6. – С. 27-30. – ISSN: 0235-2591.
10. Vacchetta L., Aramini M., Bernardini C., Rugini E. *In vitro* propagation of traditional Italian hazelnut cultivars as a tool for the valorization and conservation of local genetic resources // Horticultural Science. – 2008. – Vol. 43. – P. 562-566.

11. Ebrahimi C., Solouki M., Omidi M., Forootan M. High-frequency development of leaf-derived pre-embryos in hazel (*Corylus avellana*) // *Trakia J. of Sci.* – 2014. – Vol. 2. – P. 162-168.
12. Elbasheer Y.H., Osman E.E. Effective and economical explants surface sterilization protocol for microbial contamination of field grown explants *in vitro* cultures of some forest trees; *Acacia senegal* as a model // *Basic Research J. of Microbiology*– 2017. – Vol. 4(2). – P. 12-17. – ISSN 2354-4082.
13. Faisal M., Ahmad N., Anis M. Shoot multiplication in *Rauvolfia tetraphylla* L. using thidiazuron // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2005. – Vol. 80. – P. 187-190.
14. Ferreira de Santana J.R., Paiva R., Aloufac M.A.I., Pinto de Lemos E.E. Efficiency of ampicillin and benomyl at controlling contamination of *Annonaceae* leaf segments cultured *in vitro* // *Fruits.* – 2003. – Vol. 58. – P. 357-361.
15. Hermayani N., Retnoningsih A., Rahayu E.S. Optimising sterilization techniques and callus induction of nodes *Durio zibethinus* Murr. *in vitro* method with various media // *IOP Journal of Physics: Conference Series.* – 2017. – Vol. 824(1). – P. 1-6. – doi:10.1088/1742-6596/824/1/012062
16. Kosenko I.S., Boyko A.L., Opalko A.I., Nebykov M.V., Tarasenko G.A. Micropropagation of *Corylus colurna* L. // *Acta Hort. (ISHS).* – 2009. – Vol. 845. – P. 261-266.
17. Purohit S.D., Joshi P., Tak K., Nagori R. Development of high Efficiency micropropagation protocol of an adult tree – *Wrightia tomentosa* // *Plant Biotechnology and Molecular Markers.* – New Delhi: Anamaya Publishers, 2004. – P. 217-227.
18. Rathore J.S., Rathore V., Shekhawat N.S., Singh R.P., Liler G., Phulwaria M., Dagla H.R. Micropropagation of Woody Plants // *Plant Biotechnology and Molecular Markers.* – New Delhi: Anamaya Publishers, 2004. – P. 195-205.
19. Singh M., Sonkusale S., Niratker Ch., Shukla M. Micropropagation of *Shorea robusta*: an economically important woody plant // *J. of Forest Sci.* – 2014. – Vol. 60(2). – P. 70-74.
20. Yu X., Reed B.M. A micropropagation system for hazelnuts (*Corylus* species) // *Horticultural Science* – 1995. – Vol. 30(1). – P. 120-123.

**TO THE PROBLEM
OF STERILIZING EXPLANTS OF WOOD
AND FRUIT CROPS WHEN INTRODUCING
INTO *IN VITRO* CONDITIONS**

Rakhmangulov R. S., Malyarovskaya V. I., Samarina L. S., Koninskaya N. G.

*Federal State Budgetary Scientific Institution
“Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops”,
c. Sochi, Russia, e-mail: rakhmaruslan@yandex.ru*

The review considers an actual problem of obtaining a sterile culture of wood and fruit crops in *in vitro* conditions. The modern literature on this subject is analyzed. The main sterilizing substances, the duration of explant treatment, and some stages of sterilization are given. It is shown that for various plant species the choice of sterilizing chemicals and their exposure time is very important; production of a viable, sterile material free of microorganisms depends on it to a greater extent.

Key words: explant sterilization, woody, fruit crops, *in vitro*.