

УДК 58.085:634.2

UDC58.085:634.2

4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (биологические науки, сельскохозяйственные науки)

4.1.2. Plant breeding, seed production and biotechnology (biological sciences)

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ
САНИРУЮЩИХ СРЕДСТВ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ
ХИМИЧЕСКИХ КЛАССОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ
ПОДВОЕВ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР
IN VITRO¹**

**ASSESSMENT OF THE EFFECTIVENESS OF
SANITIZING AGENTS FROM VARIOUS
CHEMICAL CLASSES DURING THE
INTRODUCTION OF STONE FRUIT
CULTURES UNDER IN VITRO CONDITIONS**

Авакимян Анастасия Олеговна
младший научный сотрудник
селекционно-биотехнологической лаборатории
РИНЦ SPIN-код8088-1906

Avakimyan Anastasia Olegovna
Junior researcher
breeding and biotechnological laboratory
RSCI SPIN-code 8088-1906

Амосова Марина Александровна
канд. с.-х. наук
зав. лабораторией вирусологии
РИНЦ SPIN-код 4914-5332

Amosova Marina Alexandrovna
Cand.Agr.Sci.
Head of Laboratory of Virology
RSCI SPIN-code 4914-5332

Карпушина Марина Владимировна
канд. с.-х. наук
старший научный сотрудник
лаборатории вирусологии
РИНЦ SPIN-код4668-1513
*Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Северо-Кавказский
федеральный научный центр садоводства,
виноградарства, виноделия», Краснодар, Россия*

Karpushina Marina Vladimirovna
Cand.Agr.Sci.
Senior researcher Virology laboratory
RSCI SPIN-code 4668-1513
*Federal State Budget Scientific Institution "North
Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture,
Viticulture, Wine-making"; Krasnodar, Russia*

В работе представлена оценка эффективности
санирующих средств из различных химических
классов при поверхностной обработке explantов
косточковых культур на этапе введения *in vitro*.
Для санации использованы хлорсодержащие
вещества гипохлорит натрия (в составе средства
«Белизна») и «ОКА-ТАБ», кислородсодержащее
средство «Перкарбонат натрия», а также
«Перманганат калия». В результате работы
установлено, что хлорсодержащие средства
являются наиболее эффективными. Для
поверхностной стерилизации explantов подвоев
косточковых культур ПК СК 1, АИ 1 и АИ 11
рекомендуется использовать средство «ОКА-
ТАБ», в концентрации раствора 0,5 % и
экспозицией 7 минут, обеспечивающее успешное
введение explantов в культуры *in vitro*. Выход
жизнеспособных explantов составляет 81,5-91,3
%. Средство «Аламинол» (1 % р-р в экспозиции 5
минут) показало эффективность 71,1 % только
при обработке explantов подвоя АИ 11. Выход
жизнеспособных explantов при обработке
«Перкарбонатом натрия» варьировал от 30,2 до
64,9 % в зависимости от подвоя, «Перманганатом

The work evaluates the effectiveness of sanitizing
agents from various initial classes during the surface
treatment of stone fruit explants at the stage of *in vitro*
initiation. For sanitation we used the -chlorine-
containing substances sodium hypochlorite (as part of
the «Belizna») and «OKA-TAB» products, the
oxygen-containing agent «Sodium Percarbonate»,
and «Potassium Permanganate». As a result of the
work, it was found that chlorine-containing products
are the most effective. For surface sterilization of
explants of rootstocks of stone fruit crops ПК СК 1,
АИ 1 and АИ 11, it is recommended to use the
«OKA-TAB» product, in a solution concentration of
0,5% and with an exposure of 7 minutes, which
ensures the successful introduction of explants into *in vitro*
cultures. The number of viable explants was
81,5-91,3%. The "Alaminol" agent (1 % solution in
exposure for 5 minutes) showed an efficiency of
71,1 % on treating explants of АИ 11 rootstock. The
number of viable explants when treating with
"Sodium Percarbonate" varied from 30,2 to 64,9 %
depending from rootstock, "Potassium
permanganate" – 34,1 to 48,3 %.
Phytotoxicity from disinfectants was determined by

¹ Работа выполнена при содействии Фонда содействия инновациям (ФСРМФПНТС) в рамках проекта №3079ГС3/11477 и выполнения Госзадания ФГБНУ СКФНЦСВВ по теме №0498-2022-0002

калия» от 34,1 до 48,3 %. Фитотоксичность от дезинфицирующих средств определялась сортовыми особенностями. У подвоя ПК СК 1 при обработке «Перманганатом калия» и «Перкарбонатом натрия» некроз эксплантов варьировал от 35,8 до 84,1 %, у подвоев ПКГ 18/3, АИ 1 и АИ 11 – 14,3-37,6 %

Ключевые слова: ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИЕ СРЕДСТВА, САНАЦИЯ, КЛОНОВЫЕ ППОДВОИ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР, КОНТАМИНАЦИЯ, НЕКРОЗ

varietal characteristics. In the PK SK 1 rootstock when treated with “Potassium Permanganate” and “Sodium Percarbonate”, explant necrosis varied from 35,8 to 84,1 %, in the PKG 18/3, AI 1 and AI 11 rootstocks – 14,3-37,6%

Keywords: DISINFECTANTS, SANITATION, CLONE ROOTSTOCKS OF STONE FRUCHTE, CONTAMINATION, NECROSIS

<http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-204-045>

Введение. Контаминация микроорганизмами, является серьезной проблемой, влияющей на успешность введения эксплантов в культуру *in vitro*. Поэтому удаление инфекции с поверхности растительных эксплантов является первой задачей в технологии клонального микроразмножения растений. Дезинфектант должен полностью удалять патогенную микрофлору с поверхности тканей растений и не оказывать негативного влияния на ткани растений. Для поверхностной дезинфекции эксплантов используют различные химические средства, содержащие руть, серебро, активный хлор, активный кислород, спиртовые растворы, а также различные антибиотики и фунгициды [1].

Каждый дезинфектант имеет свои особенности, преимущества и недостатки. Для применения их на растительных объектах важно подобрать оптимальную концентрацию и длительность обработки.

Хлорсодержащие соединения. Одним из самых распространенных дезинфицирующих средств среди хлорсодержащих соединений является гипохлорит натрия (NaOCl). Он высокоэффективен в борьбе с большинством микроорганизмов, включая бактерии, грибы и вирусы. Средство применяется для поверхностной стерилизации эксплантов различных плодово-ягодных культур в концентрациях 0,5 % - 8 % и длительностью обработки от 1 до 15 минут в зависимости от вида растения и типа экспланта [1, 2]. Главным недостатком данной группы соединений

<http://ej.kubagro.ru/2024/10/pdf/45.pdf>

является токсичность для растительных клеток, которую можно снизить многократной промывкой эксплантов в стерильной воде [3].

Кислородсодержащие соединения. Перекись водорода (H_2O_2) — обладает мощным окислительным действием, что позволяет разрушать клеточные структуры микробов. Средство эффективно против широкого спектра патогенов, не оставляет токсичных остатков и разлагается на воду и кислород. Применяется перекись водорода в основном при стерилизации семян в концентрациях от 3 до 30 %, с продолжительностью обработки от 20 до 60 минут. Длительная обработка является главным недостатком [1, 4].

Соединения на основе серебра. Для стерилизации растительных эксплантов также используют раствор нитрата серебра с концентрацией от 0,1% до 0,3 % [1].

Ртутьсодержащие соединения. Наиболее распространенным стерилизующим средством, содержащим ртуть, является раствор сулемы ($HgCl_2$). Также применялись ртутьсодержащие средства метиолят и диацид. В зависимости от типа экспланта, использовались рабочие растворы с концентрациями от 0,1 % до 1,0 % и продолжительностью обработки от 1 до 10 минут. Препараты на основе ртути, использовались как эффективное средство для стерилизации эксплантатов благодаря своей высокой антимикробной активности. Однако они высокотоксичны как для человека, так и для окружающей среды, кроме того, могут оказывать влияние на начало регенерации эксплантов [1, 2]. С 2020 г., введен запрет на производство, экспорт и импорт ртутьсодержащих продуктов, поэтому поиск новых, менее токсичных для обработки эксплантов дезинфицирующих средств, при выращивании растений *in vitro* остается актуальным [5].

Выбор дезинфицирующего средства для стерилизации растительных эксплантов зависит от типа растения, фитосанитарного состояния, условий

отбора эксплантов. Совершенствование способов стерилизации играют ключевую роль, поскольку влияет на эффективность процесса микроразмножения растений.

Цель исследований: определить эффективность дезинфицирующих средств, содержащих различные химические вещества при обработке эксплантов клоновых подвоев косточковых культур на этапе введения в культуру *in vitro*.

Объекты и методы исследований. Работа проводилась в 2022-2023 гг., в лаборатории вирусологии ФГБНУ СКФНЦСВВ. Объекты исследования: экспланты подвоев косточковых культур: ПК СК 1, ПКГ18/3, АИ 1, АИ 11.

Повторность трехкратная, по 10 эксплантов в повторности.

Предварительная подготовка эксплантов:

Отобранные апексы побегов сначала промывали мыльным раствором, затем в течение 30 минут под проточной водой.

Оценка эффективности средств проводилась в 2 этапа:

1 этап - Определение эффективности средств при обработке эксплантов подвоя ПК СК 1.

2 этап - Определение эффективности дезинфицирующих средств при обработке эксплантов подвоев ПКГ 18/3, АИ 1, АИ 11 (по вариантам, показавшим лучшие результаты).

Контрольный вариант - гипохлорит натрия (средство торговой марки «Белизна»), разведение 1:3, длительность обработки 5 мин.

В качестве saniрующих веществ использованы дезинфицирующие средства из различных химических групп с концентрацией рабочих растворов 0,5 %, 1 % и 1,5 %, с продолжительностью обработки эксплантов 5, 7 и 10 минут.

1 вариант: средство «ОКА-ТАБ» (натриевая соль дихлоризоциануровой кислоты);

2 вариант: средство «Аламинол», содержит 5% алкилдиметил бензиламмоний хлорида и 8% глиоксаля.

3 вариант: средство «Перкарбанат натрия» (кристаллосольваткарбоната натрия и пероксида водорода).

4 вариант: средство «Перманганат калия» (KMnO₄).

Для удаления остатков дезинфицирующего средства, после обработки проводилась трёхкратная промывка эксплантов в дистиллированной воде.

Обработанные экспланты высаживали на питательную среду Мурасиге и Скуга, с добавлением 6-бензиламинопурина (6-БАП) – 0,3 мг/л, сахарозы - 30 г/л, и агар-агара – 6,7 г/л. Культивировали экспланты при температуре 24±2°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности 3000 люкс.

Оценка эффективности обработки проводилась на 21-й день после введения эксплантов в культуру, учитывалось наличие или отсутствие микробиологической контаминации (бактерий, грибов); некроз тканей эксплантов.

Обсуждение результатов. На первом этапе работы были испытания проводились при введении эксплантов только подвоя ПК СК 1. Результаты обработки представлены в таблице 1.

По данным таблицы 1 видно, что максимальный выход чистых жизнеспособных эксплантов достигнут при использовании 0,5 %-го раствора средства «ОКА-ТАБ» в течение 7 минут. Жизнеспособность эксплантов составила 91,3 %, при контаминации - 5,2 %. При более высоких концентрациях раствора и экспозициях обработки жизнеспособных эксплантов оставалось очень мало, проявлялась сильная фитотоксичность средства на растительные ткани. Уровень некроза эксплантов достигал 78,9-97,5 %.

Таблица 1 - Эффективность дезинфицирующих средств при обработке эксплантов ПК СК 1 (%), 21 день

Вариант	Концентрация, %	Показатели								
		Жизнеспособные экспланты, %			Контаминация, %			Некроз, %		
	Экспозиция, мин	5	7	10	5	7	10	5	7	10
Гипохлорит натрия (к)	0,5	85,6	-	-	6,5	-	-	7,9	-	-
ОКА-ТАБ	0,5	73,9	91,3	62,7	23,0	5,2	4,6	3,1	3,5	32,7
	1,0	13,8	15,9	18,5	7,3	5,1	1,1	78,9	79,0	80,4
	1,5	7,3	4,8	1,9	3,8	2,5	0,6	88,9	92,7	97,5
Аламинол	0,5	11,6	10,6	8,9	85,6	86,3	85,0	2,8	3,1	6,1
	1,0	30,8	11,4	8,2	65,1	61,8	63,7	4,1	26,8	28,1
	1,5	10,2	12,5	13,9	64,5	59,1	57,3	25,3	28,4	28,8
Перкарбонат натрия	0,5	24,4	29,5	26,7	27,1	17,2	11,2	48,5	53,3	62,1
	1,0	27,1	28,4	25,4	18,8	9,4	5,4	54,1	62,2	69,2
	1,5	30,2	24,8	20,1	12,5	8,1	4,5	57,3	67,1	75,4
Перманганат калия	0,5	13,5	20,2	18,4	50,7	35,6	12,5	35,8	44,2	69,1
	1,0	21,6	34,1	15,6	30,3	15,7	11,9	48,1	50,2	72,5
	1,5	25,5	18,2	13,8	5,8	3,4	2,1	68,7	78,4	84,1

В других вариантах максимальный уровень жизнеспособных эксплантов не превышал 30,2-34,1 %. При обработке средством «Аламинол» отмечена самая высокая контаминация эксплантов от 59,1 до 86,3 %, по всем концентрациям и экспозициям опыта. В выбранных концентрациях и экспозициях обработки средство оказалось не эффективным против поверхностной микрофлоры.

В вариантах с «Перманганатом калия» и «Перкарбонатом натрия» отмечена высокая фитотоксичность для тканей растений, от 35,8 до 84,1 %.

Для второго этапа исследований, выбрали лучшие варианты, которые проверили при обработке еще 3 клоновых подвоев (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты оценки эффективности дезинфицирующих средств при введении подвоев косточковых культур *in vitro*

Вариант	Показатель, %	Сортообразец		
		ПКГ 18/3	АИ 1	АИ 11
Гипохлорит натрия (к) 1:3, 5 мин.	Жизнеспособные	78,4	84,9	78,3
	Контаминация	13,2	13,2	19,3
	Некроз	18,4	1,9	2,4
ОКА-ТАБ, 0,5 %-й р-р, 7 мин.	Жизнеспособные	70,6	89,6	81,5
	Контаминация	21,0	8,9	16,4
	Некроз	8,4	1,5	2,1
Аламинол, 1,0 %-р-р, 5 мин.	Жизнеспособные	34,5	49,5	71,1
	Контаминация	37,3	32,8	18,6
	Некроз	28,2	17,7	10,3
Перкарбонат натрия, 1,5 %-р-р, 5 мин.	Жизнеспособные	47,7	52,4	64,9
	Контаминация	29,1	27,3	20,8
	Некроз	23,2	20,3	14,3
Перманганат калия, 1,0 %-ый р-р, 7 мин.	Жизнеспособные	32,1	48,3	39,6
	Контаминация	30,3	29,6	28,7
	Некроз	37,6	22,1	31,7

В результате обработки установлено, что хлорсодержащие средства являются наиболее эффективными для санации эксплантов. Выход чистых жизнеспособных эксплантов при обработке средством «ОКА-ТАБ» (0,5 %, 7 мин.) составляет 70,6-89,6 %, в контрольном варианте 78,3-84,9 %.

Другие стерилизаторы, показали менее удовлетворительный результат, однако эффективность обработки была выше, чем при обработке эксплантов подвоя ПК СК 1. Так количество жизнеспособных эксплантов при обработке средством «Аламинол» составляло 34,5 % при

обработке эксплантов ПКГ 18/3, 49,5 %, при обработке АИ 1 и 71,1 % при обработке АИ 11. Количество контаминированных эксплантов составляло 32,8 и 37,3 %, у ПКГ 18/3 и АИ 1, 18,6 % у подвоя АИ 11.

Жизнеспособность эксплантов при обработке «Перкарбонатом натрия» (1,5 %, 5 мин.) варьировала в зависимости от подвоя от 47,7 до 64,9 %, при обработке «Перманганатом калия» (1,0 %, 7 мин.) от 32,1 до 48,3 %.

Некроз эксплантов в этих двух вариантах составлял от 20,3 до 37,6 %. Фитотоксичность для тканей подвоев, особенно АИ 1 и АИ 11 была в среднем в 2,5 раза ниже, чем для ПК СК 1. Таким образом, чувствительность растений (фитотоксичность) к дезинфицирующим средствам определяется сортовыми особенностями.

Выводы. Среди проверенных протоколов стерилизации подвоев косточковых культур выделен один обеспечивающий успешное введение эксплантов в культуры *in vitro*. Эффективность стерилизации зависела от концентрации веществ, времени экспозиции и типа эксплантатов.

Для поверхностной стерилизации эксплантов подвоев косточковых культур ПК СК 1, АИ 1 и АИ 11 рекомендуется использовать хлорсодержащее средство «ОКА-ТАБ», которое оказалось наиболее эффективным, с выходом жизнеспособных эксплантов 81,5-91,3 % при концентрации 0,5 %-раствора и длительностью обработки 7 минут. Средство «Аламинол», 1 % р-р в экспозиции 5 минут можно применять для обработки подвоя АИ 11. Эффективность обработки составляет 71,1 %.

Литература

1. Винтер, М. А. Совершенствование приемов оздоровления и клонального микроразмножения сливы домашней на основе оценки адаптивного потенциала сортов: дис. ... канд. с.-х. наук : 06.01.08 / М. А. Винтер. Краснодар, 2018. 170 с.
2. Рахмангулов Р. С., Маляровская В. И., Самарина Л. С., Конинская Н. Г. К вопросу стерилизации эксплантов древесных и плодовых культур при введении в условия *in vitro* // Субтропическое и декоративное садоводство. 2018. №64. С. 116-120.
3. Костюк М.А., Бунцевич Л.Л. Стерилизация эксплантов в технологии производства оздоровленного посадочного материала сливы домашней // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2017. Т. 44, № 2. С. 186-194.
4. Мякишева Е.П., Бычкова О.В., Мироненко О.Н., Небылица А.В., Полтарацкая Ю.Р., Создание коллекции *in vitro* сирени обыкновенной (*Syringa L.*) // АгроЭкоИнфо: Электронный научно-производственный журнал. 2024. № 4. Режим доступа: http://agroecoinfo.ru/STATYI/2024/4/st_410.pdf
5. Коваленко Н.Н., Полиvara Н.В. Совершенствование способа получения свободных от сапрофитной микрофлоры зародышей рода *Prunus* для культуры *in vitro* // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2020. № 63(3). С. 107-120.

References

1. Vinter, M. A. Sovershenstvovanie priemov ozdorovleniya i klonal'nogo mikrorazmnozheniya slivy domashnej na osnove ocenki adaptivnogo potenciala sortov: dis. ... kand. s.-h. nauk : 06.01.08 / M. A. Vinter. Krasnodar, 2018. 170 s.
2. Rahmangulov R. S., Malyarovskaya V. I., Samarina L. S., Koninskaya N. G. K voprosu sterilizacii eksplantov drevesnyh i plodovyh kul'tur pri vvedenii v usloviya *in vitro* // Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo. 2018. №64. S. 116-120.
3. Kostyuk M.A., Buncevich L.L. Sterilizaciya eksplantov v tekhnologii proizvodstva ozdorovlennogo posadochnogo materiala slivy domashnej // Plodovodstvo i vinogradarstvo YUga Rossii. 2017. T. 44, № 2. S. 186-194.
4. Myakishева E.P., Bychkova O.V., Mironenko O.N., Nebylica A.V., Poltarackaya YU.R., Sozdanie kollekcii *in vitro* sireni obyknovennoj (*Syringa L.*) // AgroEkoInfo: Elektronnyj nauchno-proizvodstvennyj zhurnal. 2024. № 4. Rezhim dostupa: http://agroecoinfo.ru/STATYI/2024/4/st_410.pdf
5. Kovalenko N.N., Polivara N.V. Sovershenstvovanie sposoba polucheniya svobodnyh ot saprofitnoj mikroflory zarodyshej roda Rrunus dlya kul'tury *in vitro* // Plodovodstvo i vinogradarstvo YUga Rossii. 2020. № 63(3). S. 107-120.