

## СЕЛЕКЦИЯ, СЕМЕНОВОДСТВО И БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ/PLANT BREEDING, SEED PRODUCTION AND BIOTECHNOLOGY

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2026.66.3>

### ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ ЭКСПЛАНТОВ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИХ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Научная статья

**Рыбакова Т.Ю.<sup>1</sup>, Баранова А.И.<sup>2</sup>, Барсуков Н.М.<sup>3</sup>, Мельникова Н.В.<sup>4</sup>, Дмитриев А.А.<sup>5</sup>, Пушкирова Е.Н.<sup>6,\*</sup>**

<sup>3</sup> ORCID : 0009-0000-6303-3326;

<sup>4</sup> ORCID : 0000-0001-8083-3018;

<sup>5</sup> ORCID : 0000-0002-6827-9584;

<sup>6</sup> ORCID : 0000-0002-6071-5919;

<sup>1, 3, 4, 5, 6</sup> Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Российская Федерация

\* Корреспондирующий автор (pushkova18[at]gmail.com)

#### **Аннотация**

В данной работе нами исследовано влияние различных стерилизующих агентов (сулема, перекись водорода, белизна) на состояние эксплантов люцерны посевной (*Medicago sativa L.*) в культуре *in vitro*. Наиболее эффективным и щадящим протоколом являлась последовательная обработка 70% этианолом в течение 30 секунд с последующей стерилизацией раствором белизны (гипохлорита натрия) в концентрации 8% при экспозиции погружения 6 минут. Данный способ продемонстрировал максимальный выход жизнеспособных и стерильных эксплантов (85%), что подтверждалось низким уровнем контаминации (15%) и отсутствием визуальных признаков фитотоксичности. Разработанный протокол необходим для размножения ценных генотипов люцерны посевной с целью их дальнейшего использования в фундаментальных и прикладных исследованиях, а также селекционной работе.

**Ключевые слова:** люцерна, *Medicago sativa L.*, *in vitro*, микроразмножение, стерилизация эксплантов.

#### **THE INFLUENCE OF VARIOUS METHODS OF STERILIZATION OF ALFALFA EXPLANTS ON THE EFFECTIVENESS OF THEIR INTRODUCTION INTO *IN VITRO* CULTURE**

Research article

**Rybakova T.Y.<sup>1</sup>, Baranova A.I.<sup>2</sup>, Barsukov N.M.<sup>3</sup>, Melnikova N.V.<sup>4</sup>, Dmitriev A.A.<sup>5</sup>, Pushkova E.N.<sup>6,\*</sup>**

<sup>3</sup> ORCID : 0009-0000-6303-3326;

<sup>4</sup> ORCID : 0000-0001-8083-3018;

<sup>5</sup> ORCID : 0000-0002-6827-9584;

<sup>6</sup> ORCID : 0000-0002-6071-5919;

<sup>1, 3, 4, 5, 6</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russian Federation

\* Corresponding author (pushkova18[at]gmail.com)

#### **Abstract**

In this work, we studied the effect of various sterilizing agents (sulphuric acid, hydrogen peroxide, bleach) on the condition of alfalfa (*Medicago sativa L.*) explants in *in vitro* culture. The most effective and gentle protocol was sequential treatment with 70% ethanol for 30 seconds followed by sterilization with a bleach solution (sodium hypochlorite) at a concentration of 8% with an immersion exposure of 6 minutes. This method demonstrated the maximum yield of viable and sterile explants (85%), which was confirmed by a low level of contamination (15%) and the absence of visual signs of phytotoxicity. The developed protocol is necessary for the propagation of valuable alfalfa genotypes for their further use in fundamental and applied research, as well as in breeding work.

**Keywords:** alfalfa, *Medicago sativa L.*, *in vitro*, micropagation, explant sterilization.

#### **Введение**

Современная селекция сельскохозяйственных культур все в большей степени опирается на достижения геномики, позволяющие прогнозировать ценность генотипа по данным полигеномного анализа. Однако для полиплоидных многолетних видов, к которым относится ключевая кормовая культура — люцерна посевная (*Medicago sativa L.*), внедрение этих подходов сталкивается с системными трудностями [1]. Сложность сборки и аннотации генома, обусловленная автотетрапloidностью и высоким уровнем гетерозиготности, усугубляется отсутствием эффективных методов получения большого количества генетически однородного биоматериала [2]. Традиционное семенное размножение приводит к генетическому расщеплению, а вегетативное размножение в полевых условиях характеризуется крайне низкой эффективностью из-за ограниченной побегообразовательной способности и медленных темпов роста корневой системы. Исключение составляет деление корневой шейки куста, но этот метод не позволяет достичь нужных масштабов и стерильности [3], [4]. Таким образом, получение высококачественных

геномов и последующая геномная селекция люцерны посевной требуют принципиально иного подхода к размножению исходного материала.

Анализ литературных данных показывает, что большинство методик клонального микроразмножения люцерны посевной основаны на использовании семян, в то время как для задач геномного анализа принципиально важно работать с вегетативным материалом конкретного генотипа [5]. Однако использование вегетативных эксплантов от взрослых материнских растений сопряжено с существенными трудностями, в частности, с высокой степенью эндогенной и экзогенной контаминации, что требует разработки специализированных протоколов стерилизации.

В связи с этим нами был проведен эксперимент по оптимизации условий стерилизации вегетативных эксплантов люцерны посевной, отобранных от ценных селекционных генотипов. В ходе исследования оценивалась эффективность различных стерилизующих агентов, направленных на максимальное подавление микробиологической контаминации при сохранении жизнеспособности меристематических тканей. Особое внимание уделялось подбору концентраций дезинфицирующих растворов и продолжительности экспозиции, позволяющих обеспечить успешное введение в культуру *in vitro* пазушных почек от полевых растений.

Цель работы — разработка эффективного протокола стерилизации вегетативных эксплантов люцерны посевной, обеспечивающего получение стабильных асептических культур для клонального микроразмножения генетически однородного материала, пригодного для молекулярно-генетических исследований и селекционных работ.

### **Методы и принципы исследования**

Использовали сорт *Mulfeuil* люцерны посевной (*Medicago sativa* L.), предоставленный Федеральным исследовательским центром «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (г. Санкт-Петербург). В качестве исходных эксплантов использовали одноузловые сегменты длиной  $20\pm5$  мм, взятые из нижней части растения и содержащие пазушную почку и прилегающие к ней участки междуузлий [6], [7]. Предварительная подготовка материала включала тщательную промывку в проточной воде с добавлением 0,1% моющего средства в течение 30 минут для удаления поверхностных загрязнений и снижения бактериальной нагрузки.

Последовательность стерилизации состояла из трех этапов:

1. Предварительная обработка 70% этианолом в течение 30 секунд для обезжиривания поверхности и дегидратации микроорганизмов.

2. Стерилизация исследуемыми агентами с варьируемой экспозицией (Таблица 1).

3. Трехкратная отмыкация стерильной дистиллированной водой для полного удаления остатков стерилизующих веществ.

Между каждым этапом проводили асептические манипуляции по переносу эксплантов в новые стерильные емкости. После экспланты культивировали на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга [8], [9], [10]. Выращивание проводили при температуре  $24\pm2$  °C, 16-часовом фотопериоде и освещении люминесцентными фитолампами с мультиспектральным излучением с интенсивностью 4000 лк. Контроль эффективности стерилизации осуществляли визуально по отсутствию признаков микробной контаминации. Для каждого варианта стерилизации использовали по 20 эксплантов.

Таблица 1 - Режимы стерилизации эксплантов люцерны посевной при введении в культуру *in vitro*

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2026.66.3.1>

Стерилизующий агент	Концентрация, %	Время экспозиции, мин
Сулема ( $HgCl_2$ )	0,1	1
Сулема ( $HgCl_2$ )	0,1	2
Сулема ( $HgCl_2$ )	0,1	6
Белизна ( $NaOCl$ )	6	8
Белизна ( $NaOCl$ )	8	6
Перекись водорода ( $H_2O_2$ )	10	10
Перекись водорода ( $H_2O_2$ )	15	15

### **Основные результаты и обсуждение**

Провели сравнительный анализ различных режимов стерилизации эксплантов люцерны посевной (Таблица 1). Результаты сравнительного анализа показали преимущество варианта с использованием 8% раствора белизы (гипохлорита натрия), который обеспечивал максимальный выход жизнеспособных эксплантов (85%) при минимальном уровне контаминации (15%) (Таблица 2). При использовании сулемы жизнеспособные растения отсутствовали, а при применении перекиси водорода наблюдался низкий процент жизнеспособных растений (5–10%) при высоком уровне контаминации (45–65%). На рисунке 1 представлены экспланты люцерны посевной, стерилизованные раствором белизы, на 14-й день культивирования в условиях *in vitro*.

Таблица 2 - Оценка жизнеспособности и стерильности растений в зависимости от способа стерилизации

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2026.66.3.2>

Стерилизующий агент	Жизнеспособные, %	Уровень контаминации, %	Некроз, %
Сулема ( $HgCl_2$ ) 0,1%, 1 мин	0	20	80
Сулема ( $HgCl_2$ ) 0,1%, 2 мин	0	5	95
Сулема ( $HgCl_2$ ) 0,1%, 6 мин	0	0	100
Белизна ( $NaOCl$ ) 6%, 8 мин	50	30	20
Белизна ( $NaOCl$ ) 8%, 6 мин	85	15	0
Перекись водорода ( $H_2O_2$ ) 10%, 10 мин	10	65	25
Перекись водорода ( $H_2O_2$ ) 15%, 15 мин	5	45	50

Рисунок 1 - Экспланты люцерны посевной, стерилизованные раствором белизы, на 14-й день культивирования в условиях *in vitro*DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2026.66.3.3>

Ключевым отличием подхода с использованием белизы от известных аналогов является сочетание двух принципиальных особенностей. Во-первых, в сравнении с перекисью водорода способ обеспечивает более мягкое воздействие на меристематические ткани без возникновения окислительного шока, что подтверждается увеличением выхода жизнеспособных эксплантов. Во-вторых, в отличие от сулемы, метод исключает использование мутагенных соединений и не обладает кумулятивным токсическим эффектом. Также преимуществом является то, что подход с использованием белизы не предполагает применения гормональных препаратов на этапе предстерилизационной подготовки, что исключает потенциальное эпигенетическое влияние и обеспечивает сохранение исходных генетических характеристик генотипа.

Полученные результаты убедительно демонстрируют эффективность разработанного двухэтапного протокола стерилизации эксплантов люцерны посевной с использованием 70% этианола (30 с) и 8% раствора гипохлорита натрия (6 мин). Данный режим обеспечил максимальный выход жизнеспособных эксплантов — 85%, что значительно превысило показатели при использовании альтернативных схем обработки. Столь высокая эффективность обусловлена синергетическим действием компонентов: этиanol обеспечивал быстрое обезжиривание поверхности и дегидратацию клеточных оболочек микроорганизмов, а гипохлорит натрия проникал в поврежденные структуры и осуществлял их инактивацию за счет окислительного действия.

Значимые различия в выживаемости эксплантов между предложенным методом и другими исследованными вариантами (обработка сулемой 0,1% и перекисью водорода 10-15%) подтверждают избирательную фитотоксичность последних. Так, использование сулемы даже при минимальной экспозиции (1 мин) приводило к некрозу меристематических тканей, а более низкие концентрации перекиси водорода (10%) не обеспечивали достаточной стерильности.

Стандартизованные временные интервалы и концентрации должны позволить интегрировать данный протокол в рабочие процессы биотехнологических лабораторий без необходимости дополнительной оптимизации для каждого конкретного генотипа люцерны посевной. Это особенно важно для селекционных работ, где требуется массовое введение в культуру *in vitro* ценных образцов с сохранением их генетической стабильности.

### **Заключение**

На основании проведенных исследований установлена эффективность применения двухэтапного протокола стерилизации вегетативных эксплантов люцерны посевной. Определены оптимальные параметры обработки: предварительная стерилизация 70% этиловым спиртом в течение 30 секунд с последующей обработкой 8% раствором гипохлорита натрия в течение 6 минут. Данный протокол обеспечивает максимальный выход жизнеспособных эксплантов (85%) при минимальном уровне контаминации (15%) и полном отсутствии некротических повреждений тканей. Разработанный протокол необходим для размножения ценных генотипов люцерны посевной с целью их дальнейшего использования в фундаментальных и прикладных исследованиях, а также селекционной работе.

### **Финансирование**

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для НЦМУ ИМБ РАН «Высокотехнологичная биоэкономика», соглашение № 075-15-2025-582 от 24.06.2025 г.

### **Конфликт интересов**

Не указан.

### **Рецензия**

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

### **Funding**

This research was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation to the EIMB RAS Center for High-tech Bioeconomy, agreement number 075-15-2025-582.

### **Conflict of Interest**

None declared.

### **Review**

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

### **Список литературы / References**

1. Доева А.Т. Влияние технологических приемов воздействия на продуктивность люцерны / А.Т. Доева // Инновационные технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции: материалы Всероссийской научно-практической конференции в честь 90-летия факультета технологического менеджмента. — Владикавказ: Горский государственный аграрный университет. — 2019. — Т. 1. — С. 69–71.
2. Hawkins C. Recent progress in alfalfa (*Medicago sativa* L.) genomics and genomic selection / C. Hawkins, L. X. Yu // The Crop Journal. — 2018. — № 6 (6). — P. 565–575.
3. Zhang Y. Advances in basic biology of alfalfa (*Medicago sativa* L.): a comprehensive overview / Y. Zhang, L. Wang // Horticulture Research. — 2025. — № 12 (7). — P. uhaf081.
4. Shi S. The current status, problems, and prospects of alfalfa (*Medicago sativa* L.) breeding in China / S. Shi, L. Nan, K.F. Smith // Agronomy. — 2017. — № 7 (1) — P. 1.
5. Bhattacharai S. Evaluating effectiveness of clonal plant selection of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) in mixtures: Mean performance and stability in a multi-environment trial / S. Bhattacharai, H. Wang, H.P. Poudel [et al.] // Plant Breeding. — 2024. — № 143 (5). — P. 713–724.
6. Бородаева Ж.А. Изучение особенностей введения в культуру *in vitro* индивидуальных отборов *Medicago varia* Mart. для ускоренного размножения селекционных образцов / Ж.А. Бородаева, В.И. Чернявских, Е.В. Думачева // Плодоводство и ягодоводство России. — 2019. — № 59. — С. 19–24.
7. Строева Н.С. Микроразмножение люцерны в культуре *in vitro* в условиях Центральной Якутии / Н.С. Строева, В.Г. Дарханова // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова. — 2009. — № 3 (16). — С. 113–116.
8. Орлова Е.В. Оптимизация условий культивирования *in vitro* люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) / Е.В. Орлова, А.Ю. Степанова // Ученые записки Орловского государственного университета. Серия «Естественные науки». — 2012. — № 3. — С. 128–131.
9. Дарханова В.Г. Изучение генетического разнообразия люцерны методом *in vitro* / В.Г. Дарханова, Н.С. Строева // Успехи современного естествознания. — 2004. — № 7. — С. 51–52.
10. Campanelli A. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) clones tolerant to salt stress: *in vitro* selection / A. Campanelli, C. Ruta, I. Morone-Fortunato [et al.] // Central European Journal of Biology. — 2013. — № 8. — P. 765–776.

**Список литературы на английском языке / References in English**

1. Doeva A.T. Vliyanie tekhnologicheskikh priemov vozdelivaniya na produktivnost lyutserni [The influence of cultivation techniques on alfalfa productivity] / A.T. Doeva // Innovatsionnie tekhnologii proizvodstva i pererabotki selskokhozyaistvennoi produktsii: materiali Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii v chest 90-letiya fakulteta tekhnologicheskogo menedzhmenta [Innovative technologies for the production and processing of agricultural products: materials from the All-Russian Scientific and Practical Conference in honor of the 90th anniversary of the Department of Technology Management]. — Gorsky State Agrarian University. — 2019. — Vol. 1. — P. 69–71. [in Russian]
2. Hawkins C. Recent progress in alfalfa (*Medicago sativa* L.) genomics and genomic selection / C. Hawkins, L. X. Yu // The Crop Journal. — 2018. — № 6 (6). — P. 565–575.
3. Zhang Y. Advances in basic biology of alfalfa (*Medicago sativa* L.): a comprehensive overview / Y. Zhang, L. Wang // Horticulture Research. — 2025. — № 12 (7). — P. uhaf081.
4. Shi S. The current status, problems, and prospects of alfalfa (*Medicago sativa* L.) breeding in China / S. Shi, L. Nan, K.F. Smith // Agronomy. — 2017. — № 7 (1) — P. 1.
5. Bhattacharai S. Evaluating effectiveness of clonal plant selection of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) in mixtures: Mean performance and stability in a multi-environment trial / S. Bhattacharai, H. Wang, H.P. Poudel [et al.] // Plant Breeding. — 2024. — № 143 (5). — P. 713–724.
6. Borodaeva Zh.A. Izuchenie osobennosti vvedeniya v kulturu in vitro individualnikh otborov *Medicago varia* Mart. dlya uskorennogo razmnozheniya selektsionnikh obraztsov [Study of the characteristics of introducing individual selections of *Medicago varia* Mart. into in vitro culture for accelerated propagation of breeding samples] / Zh.A. Borodaeva, V.I. Chernyavskikh, Ye.V. Dumacheva // Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii [Fruit and Berry Cultivation in Russia]. — 2019. — № 59. — P. 19–24. [in Russian]
7. Stroeva N.S. Mikrorazmnozhenie lyutserni v kulture in vitro v usloviyah Tsentralnoi Yakutii [Micropropagation of alfalfa in vitro in Central Yakutia] / N.S. Stroeva, V.G. Darkhanova // Vestnik Buryatskoi gosudarstvennoi selskokhozyaistvennoi akademii im. V.R. Filippova [Bulletin of the V.R. Filippov Buryat State Agricultural Academy]. — 2009. — № 3 (16). — P. 113–116. [in Russian]
8. Orlova Ye.V. Optimizatsiya uslovii kultivirovaniya in vitro lyutserni posevnoi (*Medicago sativa* L.) [Optimization of in vitro cultivation conditions for alfalfa (*Medicago sativa* L.]) / Ye.V. Orlova, A.Yu. Stepanova // Uchenie zapiski Orlovskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya «Estestvennie nauki» [Scientific Notes of Orel State University. Series: Natural Sciences]. — 2012. — № 3. — P. 128–131. [in Russian]
9. Darkhanova V.G. Izuchenie geneticheskogo raznoobraziya lyutserni metodom in vitro [Study of alfalfa genetic diversity using the in vitro method] / V.G. Darkhanova, N.S. Stroeva // Uspekhi sovremennoi yestestvoznaniya [Advances in Modern Natural Science]. — 2004. — № 7. — P. 51–52. [in Russian]
10. Campanelli A. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) clones tolerant to salt stress: *in vitro* selection / A. Campanelli, C. Ruta, I. Morone-Fortunato [et al.] // Central European Journal of Biology. — 2013. — № 8. — P. 765–776.