

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

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.56>

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ ЭКСПЛАНТОВ ГОРОХА ПРИ ВВЕДЕНИИ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Научная статья

Сухопаров А.А.¹, Лебедев А.Н.^{2*}, Темиров К.С.³, Федорова О.В.⁴

²ORCID : 0000-0002-8107-2801;

^{1, 2, 3, 4} Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (sl4690653[at]gmail.com)

Аннотация

Представлены результаты исследований по влиянию различных стерилизующих агентов на состояние эксплантов при введении в культуру *in vitro*. Оптимальным являются вариант белизна в концентрации (1:4) + спирт 95% с экспозицией погружения 15 минут. Этот способ обеспечивает качественную стерилизацию эксплантов, получение наибольшего количества развитых растений и максимальный недельный и среднесуточный прирост, который составил 2,8 см и 0,39 см/сутки соответственно.

Следует отметить, что использование спирта в качестве второго стерилизующего агента является дополнительной гарантией в получении здоровых эксплантов, свободных от инфекции. По мере удлинения экспозиции и добавления второго стерилизующего агента выявлена сильная обратная зависимость ($r = -0,92$) между зелеными и погибшими эксплантами, а также сильная прямая зависимость ($r = 0,79$) между зелеными и развитыми эксплантами. Исходя из вышеуказанного, количество зеленых эксплантов определило число погибших на 85%, а развитых – на 62%.

Более высокие концентрации белизны (1:3) не способствовали получению большего количества развитых эксплантов.

Ключевые слова: горох, микроклональное размножение, эксплант, стерилизация.

INFLUENCE OF DIFFERENT METHODS OF STERILIZATION OF PEA EXPLANTS WHEN INTRODUCED INTO CULTURE *IN VITRO*

Research article

Sukhoparov A.A.¹, Lebedev A.N.^{2*}, Temirov K.S.³, Fedorova O.V.⁴

²ORCID : 0000-0002-8107-2801;

^{1, 2, 3, 4} Siberian Federal Research Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

* Corresponding author (sl4690653[at]gmail.com)

Abstract

The results of studies on the effect of various sterilizing agents on the condition of explants when introduced into *in vitro* culture are presented. The optimal method is bleach in concentration (1:4) + alcohol 95% with immersion exposure of 15 minutes. This method ensures qualitative sterilization of explants, obtaining the largest number of developed plants and maximum weekly and average daily growth, which was 2.8 cm and 0.39 cm/day, respectively.

It is worth noting that the use of alcohol as a second sterilizing agent is an additional guarantee in obtaining healthy explants free of infection. As the exposure lengthened and a second sterilizing agent was added, a strong inverse relationship ($r = -0.92$) was found between green and dead explants, and a strong direct relationship ($r = 0.79$) between green and developed explants. Based on the above, the number of green explants determined the number of dead explants by 85% and developed explants by 62%.

Higher concentrations of bleach (1:3) did not favour the production of more developed explants.

Keywords: pea, microclonal propagation, explant, sterilization.

Введение

В связи с введенными странами ЕЭС против РФ санкциями и в рамках решения Доктрины продовольственной безопасности РФ все большее значение приобретает разработка инновационных направлений в науке. Интенсификация сельского хозяйства определяет необходимость разработки новых эффективных технологий в производстве оздоровленного высококачественного посадочного материала. На современном этапе они неразрывно связаны с применением биотехнологических приемов. Одним из наиболее эффективных является микроклональное размножение, при котором реальные коэффициенты размножения в сотни и даже тысячи раз выше, чем при любом из традиционных приемов.

Горох посевной – высокобелковая культура, богатая медленно усвояемыми углеводами, пищевыми волокнами, витаминами, микроэлементами, в том числе железом, цинком, кальцием [1].

В России посевные площади и валовой сбор гороха к 2021 г. достигли 1444,9 тыс. га и 2700 тыс. тонн. [2].

В процессе селекции отбор и сохранение ценных исходных и полученных форм затрудняется. Нередко гибель зародышей возникает на ранних стадиях развития. Поэтому трудности получения необходимых признаков затягивают

всю селекционную работу. В связи с этим, необходимость получения высокопродуктивных, устойчивых к биотическим и абиотическим факторам сортов и гибридов также требует использования современных методов биотехнологии, ускоряющих селекционный процесс и повышающих его эффективность [3].

Биотехнологические методы дают возможность получать и сохранять генетически однородный материал и проводить направленные отборы. По литературным данным ранее разработанные методики микроразмножения гороха очень громоздки и трудоемки [4], [5].

В связи с этим является актуальной потребность в разработке и совершенствовании различных методов биотехнологии, позволяющих создавать новый и сохранять ценный селекционный материал в культуре изолированных органов и тканей такой важной культуры, как горох [6], [7].

Успех введения в культуру *in vitro* растительного материала во многом определяется качеством стерилизации. Выбор стерилизующего агента зависит от особенностей экспланта. Чем нежнее растительная ткань, тем меньше должна быть концентрация стерилизующего агента, чтобы сохранить её жизнеспособность. Часто внутреннее заражение исходных эксплантов бывает намного сильнее, чем поверхностное. Чтобы предотвратить это заражение, растительный материал предварительно обрабатывают фунгицидами и антибиотиками против грибной и бактериальной инфекций [8].

Вид стерилизующего агента, его концентрацию и время действия, зависящие от особенностей тканей исходных растений, необходимо подобрать таким образом, чтобы убить микроорганизмы и не повредить ткани экспланта.

Еще одним важным условием является то, что стерилизующее вещество должно легко удаляться из ткани промывкой дистиллированной водой или разлагаться. Иначе происходит отравление тканей, что негативно влияет на дальнейший рост культуры. Чаще всего для поверхностной стерилизации растительных тканей используют соединения, содержащие активный хлор (гипохлорит натрия, гипохлорит кальция, хлорамин) и другие [9].

Исследования по подбору стерилизующего агента немногочисленны, что является актуальным и своевременным.

Поэтому цель наших исследований – оптимизировать процесс стерилизации эксплантов гороха при введении в культуру *in vitro*.

В соответствии с этим были поставлены следующие задачи:

1. Подобрать стерилизующий агент, оказывающий наиболее эффективное обеззараживающее действие на вводимый эксплант;
2. Определить оптимальную концентрацию и экспозицию стерилизующего агента;

Методы и принципы исследования

Исследования проводили в 2023 году в лаборатории автоматизации микрклонального размножения Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий РАН.

Объект исследований – среднеспелый сорт гороха Холик. Среднеустойчив к растрескиванию и осыпанию. Урожайность зерна составляет 2,2–3,0 т/га [10].

Для эксперимента в качестве экспланта брали стебель с листом. Работы по стерилизации проводили согласно схеме опыта (табл. 1).

Таблица 1 - Схема опыта

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.56.1>

Вариант	Концентрация	Экспозиция, мин
Контроль (промывка в дистиллированной автоклавированной воде)	-	-
Контроль без цефотаксима (промывка в дистиллированной автоклавированной воде)	-	-
Белизна	1:4	10
Белизна	1:4	15
Белизна	1:3	10
Белизна	1:3	15
Спирт	95%	10
Спирт	95%	15
Белизна+ спирт	1: 4+95%	10+10
Белизна+ спирт	1: 4+95%	15+10
Белизна+ спирт	1: 4+95%	15+15
Белизна+ спирт	1: 4+95%	10+15
Белизна+ спирт	1:3+95%	10+10
Белизна+ спирт	1:3+95%	15+10

Белизна+ спирт	1:3+95%	10+15
Белизна+ спирт	1:3+95%	15+15

Культивирование эксплантов осуществляли на питательной среде Мурасиге и Скуга с концентрацией 6-БАП – 0,5 мг/л; ИУК – 0,1 мг/л. приготовленной по общепринятой методике [11], [12].

Температурный режим +23-25 °С, с 16-часовым фотопериодом.

За контроль брали дистиллированную автоклавированную воду с антибиотиком цефотаксим и без него. Белизну разбавляли дистиллированной автоклавированной водой в определенной пропорции согласно схеме эксперимента.

Стерилизацию проводили по следующему алгоритму:

- В случае с одним стерилизующим агентом эксплант погружали в стерилизующий агент, выдерживали время экспозиции, далее его переносили в емкость с дистиллированной автоклавированной водой, промывали, помещали в емкость с раствором антибиотика цефотаксим в концентрации 5%.

- В случае с двумя стерилизующими агентами эксплант погружали в первый стерилизующий агент, выдерживали время экспозиции, далее его переносили в емкость с дистиллированной автоклавированной водой, промывали, погружали в емкость со вторым стерилизующим агентом, выдерживали время экспозиции, далее снова промывали дистиллированной автоклавированной водой, помещали в емкость с раствором антибиотика цефотаксим в концентрации 5%.

Количественный учет эксплантов проводили в день их пересадки в пробирки (30 августа). Визуальные наблюдения за эксплантами – в течении всего периода эксперимента. Высоту растений подсчитывали на 7 и 14-е сутки.

Всего изучалось 16 вариантов, повторность опыта – 2-кратная (по 2 пробирки каждого варианта), количество эксплантов в каждой пробирке – 2.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ Snedecor [13]. Корреляционный анализ – программа MS Office Excel 2019.

Основные результаты

В результате исследований по влиянию способов стерилизации оптимальным вариантом оказалось применение двух стерилизующих агентов Белизна (1:4) +спирт (95%), с экспозицией 15 минут. Количество развитых стерильных эксплантов было наибольшим по отношению к варианту с дистиллированной водой. Контроль, несмотря на выход всех развитых эксплантов, не дает возможности в получении здоровых, из-за отсутствия активного барьера против инфекции, что в дальнейшем может негативно отразиться на росте и развитии растений. Более высокие концентрации белизны (1:3) не способствовали получению большего количества развитых эксплантов (табл. 2, рис. 1).

Таблица 2 - Состояние эксплантов в зависимости от способа стерилизации

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.56.2>

Вариант стерилизации	Общее количество эксплантов, шт	Состояние эксплантов, шт.			Развитые экспланты, шт.
		Инфекция	Зеленые	Погибшие	
Контроль с антибиотиком	4	4	2	0	0
Контроль без антибиотика	4	4	4	0	4
Белизна (1:4), 10 мин	4	3	2	1	0
Белизна (1:4), 15 мин	4	1	3	1	3
Белизна (1:3), 10 мин	4	2	4	0	2
Белизна (1:3), 15 мин	4	2	4	0	2
Спирт 95%, 10 мин	4	4	0	4	0
Спирт 95%, 15 мин	4	3	0	3	0
Б (1: 4) + спирт, 10+10 мин	4	0*	0	4	0
Б (1: 4) + спирт, 15+10	4	2	4	0	3

мин					
Б (1:4) + спирт, 15+15 мин	4	0*	4	0	4*
Б (1:4) + спирт, 10+15 мин	4	0*	0	4	0
Б (1:3) + спирт, 10+10 мин	4	0*	3	2	0
Б (1:3) + спирт, 15+10 мин	4	0*	4	0	2
Б (1:3) + спирт, 10+15 мин	4	0*	0	4	0
Б (1:3) + спирт, 15+15 мин	4	0*	2	2	2
НСР ₀₅		1,4990			1,7577

Примечание: *-существенно на 5%-ном уровне значимости

Установлено, что контроль без антибиотика дал наибольшее количество развитых эксплантов, при этом среди них два зеленых, в сравнении с контролем, где применялся цефотаксим. Вероятно, 5% концентрация привела к ингибированию роста эксплантов.



Рисунок 1 - Общий вид культивируемых эксплантов на 7-е сутки
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.56.3>

Следует отметить, что использование спирта в качестве второго стерилизующего агента является дополнительной гарантией в получении здоровых эксплантов, свободных от инфекции. О чем свидетельствует корреляционный анализ. По мере удлинения экспозиции и добавления второго стерилизующего агента отмечается сильная обратная зависимость ($r = -0,92$) между зелеными и погибшими эксплантами, а также сильная прямая зависимость ($r = 0,79$) между зелеными и развитыми эксплантами.

Наибольший недельный и среднесуточный прирост отмечен на варианте с белизной в концентрации 1:4 совместно со спиртом с экспозицией 15 минут, и составил 2,8 см и 0,39 см/сутки соответственно (табл. 3).

Таблица 3 - Морфометрические показатели развитых неинфицированных эксплантов

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.56.4>

Вариант стерилизации	Высота эксплантов, см		Прирост за неделю,	Среднесуточный прирост, см
	7 сентября	14 сентября		

			см	
Б (1:4) + спирт, 15+15 мин	4,0	6,8	2,8	0,39
Б (1:3) + спирт, 15+10 мин	2,0	2,5	0,5	0,07
Б (1:3) + спирт, 15+15 мин	3,0	3,5	0,5	0,07

Повышение концентрации стерилизующего агента независимо от его экспозиции привело к снижению интенсивности роста до 0,07 см/сутки. Визуально эти экспланты имели желтую окраску нижних листьев, а в некоторых случаях происходило их увядание.

Заключение

1. Оптимальным вариантом является сочетание двух стерилизующих агентов. Концентрация белизны (1:4) и спирта (95%) с экспозицией погружения 15 минут способствует наибольшему эффекту от стерилизации и получению максимального количества развитых эксплантов.

2. По мере удлинения экспозиции и добавления второго стерилизующего агента отмечается сильная обратная зависимость ($r = -0,92$) между зелеными и погибшими эксплантами, а также сильная прямая зависимость ($r = 0,79$) между зелеными и развитыми эксплантами.

3. Интенсивность роста эксплантов была наибольшей и составила 0,39 см/сутки, что в 6 раз выше, чем на вариантах с высокими концентрациями стерилизующего агента.

4. Более высокие концентрации белизны (1:3) не способствовали получению большего количества развитых эксплантов.

Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного задания FNUU-2022-0006.

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

The work was performed under the state assignment FNUU-2022-0006.

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. Зотиков В.И. Современная селекция зернобобовых и крупяных культур в России / В.И. Зотиков, С.Д. Вилунов // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2021. — 25 (4). — с. 381-387.
2. Пахотина И.В. Перспективные сорта гороха для использования в крупяной промышленности в условиях юга Западной Сибири / И.В. Пахотина, Л.В. Омелянюк, Е.Ю. Игнатъева, А.М. Асанов, Л.Т. Солдатова // Зерновое хозяйство России. — 2023. — 4 (Том 15). — с. 28-34.
3. Жужжалова Т.П. Особенности вегетативного размножения гороха в культуре *in vitro* / Т.П. Жужжалова, М.Н. Сащенко // Научные ведомости. — 2011. — 9 (104), Вып. 15/2. — с. 140-144.
4. Внучкова В.В. Методические рекомендации по микроклонированию растений гороха в культуре ткани *in vitro* / В.В. Внучкова — Москва: ВАСХНИЛ, 1988. — 15 с.
5. Суркова Г.Н. Технологии клонирования зернобобовых и крупяных культур (методические рекомендации) / Г.Н. Суркова, С.В. Бобков, Г.В. Соболева — Москва: Россельхозакадемия, 2005. — 19 с.
6. Сащенко М.Н. Особенности развития растений гороха при микроклональном размножении в условиях культуры *in vitro* / М.Н. Сащенко, О.А. Подвигина // Вестник Алтайского ГАУ. — 2014. — 6 (116). — с. 24-29.
7. Ермоленко Н.П. Особенности введения в культуру *in vitro* гороха посевного с целью последующего микроклонального размножения / Н.П. Ермоленко, И.Н. Сеница, Е.Н. Куликович // Земледелие и селекция в Беларуси. — 2020. — 56. — с. 388-394.
8. Беседина Е.Н. Усовершенствование метода клонального микроразмножения подвоев яблони *in vitro* : дис. ...д-ра : 06.01.08 : защищена 2015-12-18 : утв. 2015-12-18 / Е.Н. Беседина — Краснодар: 2015.— 142 с.
9. Рубцов С.Л. Методика микроклонального размножения и производство оздоровленных миниклубней в оригинальном семеноводстве картофеля в условиях высокой инфекционной нагрузки Самарской области / С.Л. Рубцов, А.В. Милехин, С.В. Шевченко, А.Л. Бакунов, Н.Н. Дмитриева // Известия Самарского НЦ РАН. — 2017. — 2 (4), Т. 19. — с. 650-658.
10. Кашеваров Н.И. Сорты сельскохозяйственных культур селекции СФНЦА РАН и НГАУ: проспект / Н.И. Кашеваров, Р.И. Полюдина, Н.А. Лапшинов [и др.] — Новосибирск,: РАН. Сибирское отделение. СФНЦА РАН: НГАУ, 2019. — 112 с.
11. Murashige T. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-assays with Tobacco Tissue Cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol Plant*. — 1962. — 15 (3). — p. 473-497.

12. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко — Москва: Наука, 1964. — 270 с.
13. Сорокин О.Д. Прикладная статистика на компьютере / О.Д. Сорокин — Краснообск: ГУП РПО РАСХН: 2-е издание, 2009. — 222 с.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Zotikov V.I. Sovremennaja selektsija zernobobovyh i krupjanyh kul'tur v Rossii [Modern Breeding of Leguminous and Cereal Crops in Russia] / V.I. Zotikov, S.D. Viljunov // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. — 2021. — 25 (4). — p. 381-387. [in Russian]
2. Pahotina I.V. Perspektivnye sorta goroha dlja ispol'zovanija v krupjanoj promyshlennosti v uslovijah juga Zapadnoj Sibiri [Promising Pea Varieties for Use in Cereal Industry in the South of Western Siberia] / I.V. Pahotina, L.V. Omel'janjuk, E.Ju. Ignat'eva, A.M. Asanov, L.T. Soldatova // Grain Farming in Russia. — 2023. — 4 (V. 15). — p. 28-34. [in Russian]
3. Zhuzhzhhalova T.P. Osobennosti vegetativnogo razmnozhenija goroha v kul'ture in vitro [Peculiarities of Vegetative Reproduction of Pea in In Vitro Culture] / T.P. Zhuzhzhhalova, M.N. Saschenko // Scientific Bulletins. — 2011. — 9 (104), No. 15/2. — p. 140-144. [in Russian]
4. Vnuchkova V.V. Metodicheskie rekomendatsii po mikroklonirovaniju rastenij goroha v kul'ture tkani in vitro [Methodological Recommendations on Microcloning of Pea Plants in In Vitro Tissue Culture] / V.V. Vnuchkova — Moskva: VASHNIL, 1988. — 15 p. [in Russian]
5. Surkova G.N. Tehnologii klonirovanija zernobobovyh i krupjanyh kul'tur (metodicheskie rekomendatsii) [Technologies of Cloning of Grain Legumes and Cereal Crops (methodical recommendations)] / G.N. Surkova, S.V. Bobkov, G.V. Soboleva — Moskva: Rossel'hozakademija, 2005. — 19 p. [in Russian]
6. Saschenko M.N. Osobennosti razvitija rastenij goroha pri mikroklonal'nom razmnozhenii v uslovijah kul'tury in vitro [Peculiarities of Pea Plant Development at Microclonal Propagation under In Vitro Culture Conditions] / M.N. Saschenko, O.A. Podvigina // Bulletin of Altai SAU. — 2014. — 6 (116). — p. 24-29. [in Russian]
7. Ermolenko N.P. Osobennosti vvedenija v kul'turu in vitro goroha posevnogo s tsel'ju posledujuschego mikroklonal'nogo razmnozhenija [Peculiarities of In Vitro Introduction of Pea Seed into Culture for the Purpose of Subsequent Microclonal Propagation] / N.P. Ermolenko, I.N. Sinitsa, E.N. Kulinkovich // Farming and Breeding in Belarus. — 2020. — 56. — p. 388-394. [in Russian]
8. Besedina E.N. Uovershenstvovanie metoda klonal'nogo mikrorazmnozhenija podvoev jabloni in vitro [Improvement of the Method of Clonal Micropropagation of Apple Rootstocks in Vitro] : dis....of PhD in Agriculture : 06.01.08 : defense of the thesis 2015-12-18 : approved 2015-12-18 / E.N. Besedina — Krasnodar: 2015.— 142 p. [in Russian]
9. Rubtsov S.L. Metodika mikroklonal'nogo razmnozhenija i proizvodstvo ozdorovlennyh miniklubnej v original'nom semenovodstve kartofelja v uslovijah vysokoj infektsionnoj nagruzki Samarskoj oblasti [Methods of Microclonal Propagation and Production of Healthy Minitubers in Original Potato Seed Production under Conditions of High Infectious Load of Samara Region] / S.L. Rubtsov, A.V. Milehin, S.V. Shevchenko, A.L. Bakunov, N.N. Dmitrieva // Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. — 2017. — 2 (4), V. 19. — p. 650-658. [in Russian]
10. Kashevarov N.I. Sorta sel'skohozjajstvennyh kul'tur selektsii SFNTsA RAN i NGAU: prospekt [Crop Varieties of Selection of SFSCA RAS and NSAU: Prospectus] / N.I. Kashevarov, R.I. Poljudina, N.A. Lapshinov [et al.] — Novosibirsk: RAS. Siberian branch. SFNTsA RAN: NGAU, 2019. — 112 p. [in Russian]
11. Murashige T. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-assays with Tobacco Tissue Cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol Plant. — 1962. — 15 (3). — p. 473-497.
12. Butenko R.G. Kul'tura izolirovannyh tkanej i fiziologija morfogeneza rastenij [Isolated Tissue Culture and Physiology of Plant Morphogenesis] / R.G. Butenko — Moskva: Nauka, 1964. — 270 p. [in Russian]
13. Sorokin O.D. Prikladnaja statistika na komp'jutere [Applied Statistics on a Computer] / O.D. Sorokin — Krasnoobsk: GUP RPO RASHN: 2-nd edition, 2009. — 222 p. [in Russian]