

УДК 631/581

<https://www.doi.org/10.47813/rosnio-III.2024.1004>

EDN UUMJMA

## Оптимальные условия стерилизации для получения жизнеспособных эксплантов

К.В. Кукушкина\*

Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, пр. Свободный, 66, Красноярск, 660041, Россия

\*E-mail: kristina\_fenix92@mail.ru

**Аннотация.** Проведена оценка условий стерилизации фрагментов листовых пластин мягкой яровой пшеницы для получения жизнеспособных эксплантов. Установлено, что при использовании стерилизующего агента разной концентрации и времени воздействия доля образцов сохранивших зеленую окраску составляет 0,38. Доля контаминации образцов при использовании пятидесяти процентного раствора коммерческого препарата «Белизна» (АО «Саянскхимпласт», Россия) составляет 0,06. Выявлена статически значимая зависимость ( $p < 0.0220$ ) пожелтения листовой пластины от концентрации стерилизующего агента при использовании двадцати пяти процентного раствора коммерческого препарата «Белизна» (АО «Саянскхимпласт», Россия), статически значимая зависимость ( $p < 0.0001$ ) пожелтения листовой пластины от концентрации стерилизующего агента при использовании пятидесяти процентного раствора коммерческого препарата «Белизна» (АО «Саянскхимпласт», Россия) в течении 10-15 минут и статически значимая зависимость ( $p < 0.0258$ ) пожелтения листовой пластины от концентрации стерилизующего агента при использовании пятидесяти процентного раствора коммерческого препарата «Белизна» (АО «Саянскхимпласт», Россия) в течении 1-5 минут.

**Ключевые слова:** эксплант, стерилизация, стерилизующий агент, контаминация.

## Optimal sterilization conditions for obtaining viable explants

K.V. Kukushkina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Krasnoyarsk Research Institute of Agriculture - a separate subdivision of the FRC KSC SB RAS, 66 Svobodny pr., Krasnoyarsk, 660041, Russia

\*E-mail: kristina\_fenix92@mail.ru

**Abstract** The conditions of sterilization of fragments of leaf plates of soft spring wheat for obtaining viable explants were evaluated. It was found that when using a sterilizing agent of different concentrations and exposure time, the proportion of samples that retained a green color is 0.38. The proportion of contamination of samples using a fifty percent solution of the commercial drug Bielizna (Sayanskkhimplast JSC, Russia) is 0.06. A statically significant dependence ( $p < 0.0220$ ) of the yellowing of the leaf plate on the concentration of the sterilizing agent was revealed when using a twenty-five percent solution of the commercial drug Belizna (Sayanskkhimplast JSC, Russia), a statically significant dependence ( $p < 0.0001$ ) of the yellowing of the leaf plate on the concentration of the sterilizing agent when using a fifty percent solution of the commercial drug Belizna" (Sayanskkhimplast JSC, Russia) for 10-15 minutes and and a statically significant dependence ( $p < 0.0258$ ) of the yellowing of the sheet plate on the concentration of the sterilizing agent when using a fifty percent solution of the commercial drug Belizna (Sayanskkhimplast JSC, Russia) for 1-5 minutes.

**Keywords:** explant, sterilization, sterilizing agent, contamination.

## 1. Введение

Работа с изолированными тканями растений требует использование богатых питательных сред [1]. Обогащенные питательными веществами: витаминами и сахарами они служат благоприятной средой для развития бактерий, грибов, которые способны лизировать растительные ткани и влиять на жизнеспособность растительного материала [1,2,3]. Культивирование на таких средах подразумевает полное освобождение от контаминирующих агентов, помещаемых на эти среды эксплантов. Для этого проводится их стерилизация [1]

Эффективная стерилизация – это первый и самый важный шаг при подготовке растительного объекта к введению культуры [1]. При этом очень важно соблюдать баланс между деконтаминацией и временем воздействия стерилизующих агентов [1]. Образцы должны быть стерильны и жизнеспособны [1,2].

Стерилизация проводится различными методами, в том числе с использованием химических препаратов, такими как гипохлорит натрия, этанол или перекись водорода [1,2]. При оптимально подобранном сроке стерилизации и концентрации агенты не повреждают растительные ткани и обеспечивают необходимую стерильность [1,2,3].

Следовательно, для получения чистого фотосинтезирующего материала необходимо определить оптимальные условия временного воздействия стерилизующего агента.

## 2. Постановка задачи (Цель исследования)

Целью работы являлось определение оптимальных условий стерилизации, позволяющих получить жизнеспособный эксплант при минимальном времени воздействия стерилизующего агента.

Для этого необходимо определить оптимальное время стерилизации и концентрацию стерилизующего агента.

## 3. Методы и материалы исследования

В работе использованы листовые пластины 10-дневных проростков мягкой яровой пшеницы сорта Красноярская 12 селекции КрасНИИСХ г. Красноярск. Выращены в условиях светокультуры при температуре 20-22°C в 16-часовом дне.



**Рисунок 1.** 10-дневные проростки мягкой яровой пшеницы сорта Красноярская 12 селекции КрасНИИСХ г. Красноярск.

В качестве питательной среды для эксплантов использовалась среда МС. Стерилизацию проводили в растворах коммерческого препарата «Белизна» (АО «Саянскхимпласт», Россия). Листовые пластины помещали в марлевые мешочки целиком и проводили стерилизацию, используя определенные сочетания времени и концентрации стерилизующего агента (таблица 1).

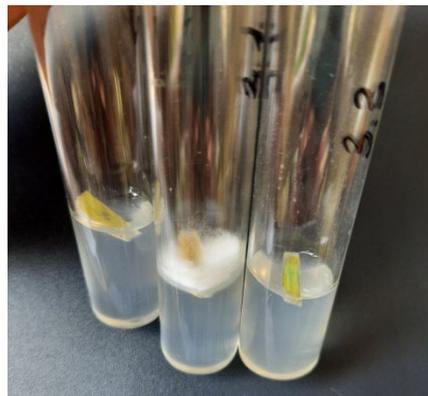
**Таблица 1.** Время использования и концентрация стерилизующего агента.

Время (мин)	Концентрация (%)
10-15	50
1-5	50
1-5	25

После стерилизации листья промывали стерильной водой, помещая их в стаканы с дистиллированной водой на 5, 10, 15 минут [4]. Пластины разрезали на фрагменты, длиной около 1 см и помещали на питательную среду Мурасиге-Скуга (рисунок 2,3). Фиксация результатов производилась на 1, 3 и 5 сутки: цвет, наличие контаминации [5] (рисунок 4,5) (таблица 2, 3)



**Рисунок 2.** Фрагменты листовых пластин на питательной среде Мурасиге-Скуга.



**Рисунок 3.** Здоровые и зараженный фрагменты листовых пластин на питательной среде Мурасиге-Скуга.



**Рисунок 4.** Изменение окраски фрагментов листовых пластин.



**Рисунок 5.** Изменение окраски фрагментов листовых пластин с наличием контаминации образца.

**Таблица 2.** Наличие контаминация исследуемых образцов.

Время (мин)	Концентрация (%)	Количество (шт)
13	50	2
9	50	1
6	50	4

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета Microsoft Excel 2007 для Windows с применением двустороннего F-теста для четырехпольных таблиц.

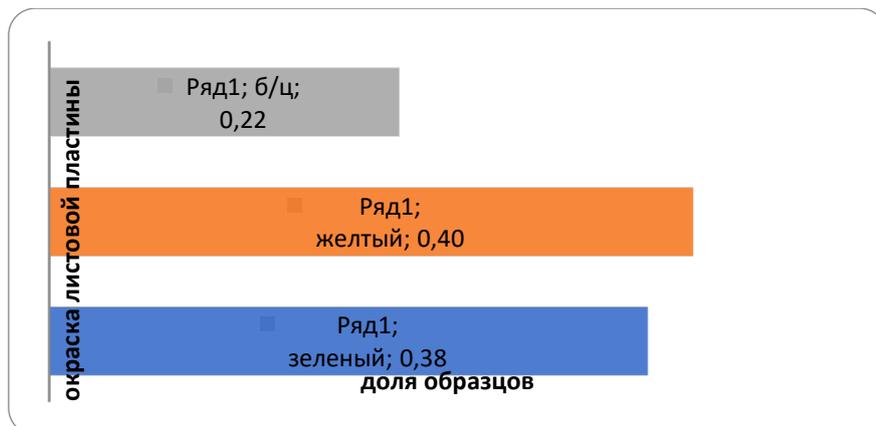
**Таблица 3.** Окраска листовой пластины эксплантов при воздействии стерилизующего агента.

Время (мин)	Концентрация (%)	Окраска		
		Зеленый (шт)	Желтый (шт)	Без цвета (шт)
10	50	0	9	1
11	50	0	8	2
12	50	1	5	4
13	50	5	3	2
14	50	3	4	3
15	50	2	3	5
5	50	5	3	2
4	50	8	2	0
3	50	6	3	1
2	50	3	0	7
1	50	6	1	3
5	25	5	2	0
4	25	3	2	0
3	25	2	4	0
2	25	2	3	1
1	25	2	5	0

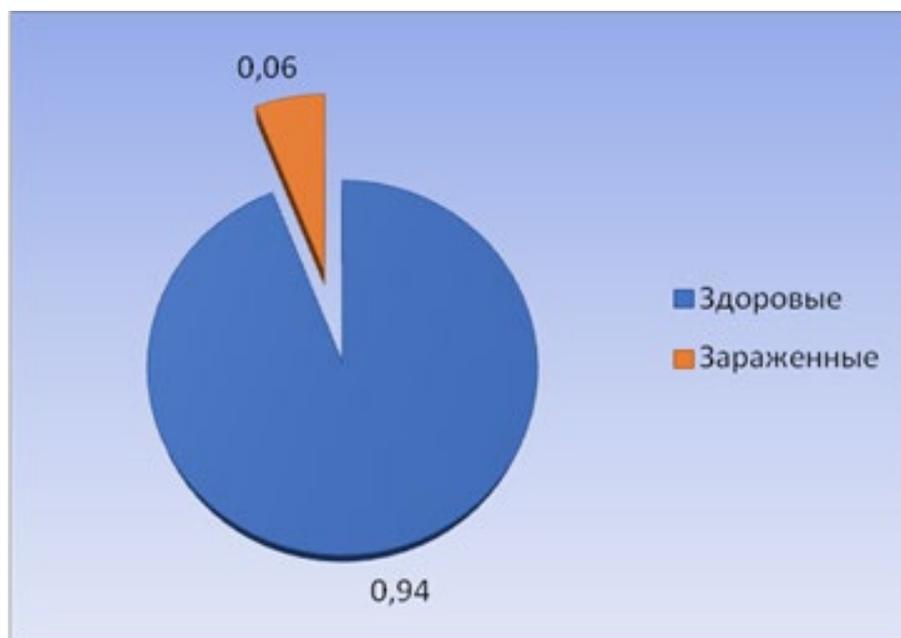
#### 4. Полученные результаты

В результате исследования было установлено, что при использовании стерилизующего агента разной концентрации и времени воздействия доля образцов сохранивших зеленую окраску составила 0,38 (рисунок 6).

Контаминация фрагментов листовых пластин отмечалась лишь в редких случаях использования пятидесяти процентного раствора стерилизующего агента при времени воздействия 13, 9 и 6 минут и составила 0,06 (рисунок 7).

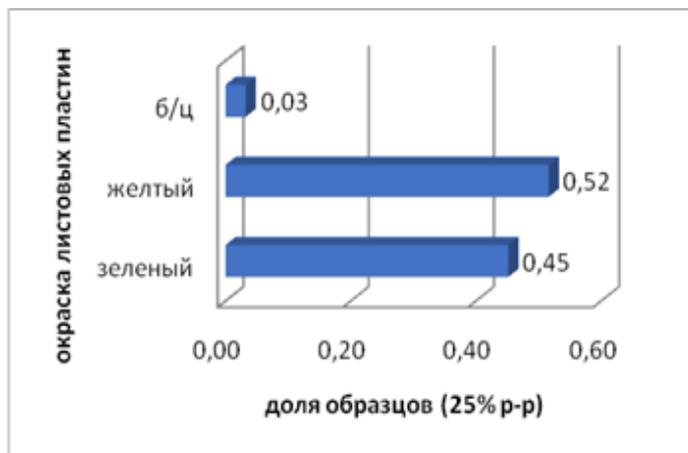


**Рисунок 6.** Доля фотосинтезирующих фрагментов листовых пластин.

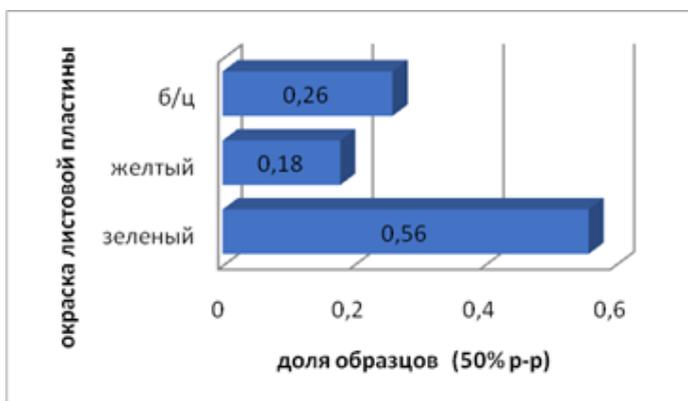


**Рисунок 7.** Доля контаминации образцов фрагментов листовых пластин (использование пятидесяти процентного стерилизующего агента).

При этом доля сохранивших зеленую окраску образцов для варианта стерилизации 1-5 минут при концентрации раствора в 25 % составила 0,45, что на 0,11 ниже, чем в аналогичных условиях при применении 50% раствора стерилизующего агента (рисунок 8, 9)



**Рисунок 8.** Доля жизнеспособных эксплантов при использовании 25% раствора агента в течении 1-5.



**Рисунок 9.** Доля жизнеспособных эксплантов при использовании 50% раствора агента в течении 1-5.

Выявлена статически значимая зависимость ( $p < 0.0001$ ) пожелтения листовой пластины от концентрации стерилизующего агента при использовании 50-ти процентного раствора коммерческого препарата «Белизна» (АО «Саянскхимпласт», Россия) в течении 10-15 минут, а также статически значимая зависимость ( $p < 0.0258$ ) пожелтения листовой пластины от концентрации стерилизующего агента при использовании 50-ти процентного раствора коммерческого препарата «Белизна» (АО «Саянскхимпласт», Россия) белизны в течении 1-5 минут

При использовании 25% раствора белизны была выявлена статически значимая зависимость ( $p < 0.0220$ ) пожелтения листовой пластины от концентрации стерилизующего агента. Также отмечено что стерилизация эксплантов в течение 1-5 минут с использованием 50 % раствора коммерческого препарата не дает статистически значимой зависимости ( $p < 0.0822$ ) обесцвечивания листовой пластины от концентрации стерилизующего агента. В то время как при аналогичных условиях.

## 5. Выводы

Таким образом, установлено, что концентрация стерилизующего агента не оказывает влияние на обесцвечивание листовой пластины, в то время как временной промежуток воздействия стерилизующего препарата статистически значимо оказывает влияние на изменение окраски листовой пластины. В рамках исследования можно утверждать, что наиболее оптимальные условия стерилизации — это воздействие 25-ти и 50-ти процентные растворы коммерческого препарата «Белизна» (АО «Саянскимпласт», Россия) в течении 1-5 минут.

## Список литературы

1. Калашникова Е.А. Культура тканей и клеток растений: учебник / Е.А. Калашникова, Р.Н. Киракосян. – Москва: КНОРУС, 2023. – 184 с
2. Калашникова Е.А. Основы биотехнологии: учеб, пособие / Е.А. Калашникова, М.Ю. Чередниченко, Р.Н. Киракосян. – Москва: КНОРУС, 2022. – 278 с.
3. Сельскохозяйственная биотехнология и биоинженерия: учебник / под ред. В.С. Шевелухи. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва: URSS, 2015. – 704 с.
4. Калашникова Е.А. Лабораторный практикум по биотехнологии растений: учеб, пособие / Е.А. Калашникова и др. – Москва: Русайнс, 2021. – 240 с.
5. Калашникова Е.А. Лабораторный практикум по культуре тканей и клеток растений / Е.А. Калашникова [и др.]. – Москва: Изд-во МСХА, 2017. – 146 с.