

АНАЛИЗ КАЧЕСТВА СТЕРИЛИЗУЮЩИХ АГЕНТОВ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ОБЪЕКТЫ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ В УСЛОВИЯХ *INVITRO* НА ПРИМЕРЕ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ (*FRAGARIA* × *ANANASSA* (*WESTON*) *DUCHESNE*)¹

И. А. Навальнева, И. С. Буковцова

Лаборатория по клонированию декоративных деревьев, цветов и кустарников цеха по благоустройству и озеленению №1 УНИЦ «Агротехнопарк», Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородская государственная сельскохозяйственная академия имени В.Я. Горина», г. Белгород, Россия, irinanavalneva@rambler.ru, sevatari@rambler.ru

ВВЕДЕНИЕ

Клональным микроразмножением называют неполовое размножение растений с помощью метода культуры тканей, позволяющее получать растения идентичные исходному. В основе получения таких растений лежит способность соматических клеток растений полностью реализовывать свой потенциал развития, т.е. свойство тотипотентности. Метод клонального микроразмножения получает все более широкое распространение во всем мире. В большинстве стран эта технология приобрела коммерческий характер [1].

У земляники материал для введения в культуру *invitro* обычно берут только в конце сентября. Апексы у земляники берут от растущего «уса» [3].

У испытуемых сортов после отделения от материнского растения оставляют отрезки стебля длиной 1 см, которые очищают от чешуек и в таком виде подвергают стерилизации. Стерилизацию проводят различными дезинфицирующими агентами (табл. 1) с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде [1, 3].

Таблица 1

Стерилизация исходного растительного материала

Дезинфицирующий агент	Концентрация, %	Эксплант	Время обработки, мин
Хлорамин	1-6	Пыльники, молодые зародыши	1-3
		Сухие семена	20-30
Гипохлорит натрия	2-3	Изолированные зародыши	10-15
	3-5	Сухие семена	60
Гипохлорит кальция	5-7	Почки, завязи, цветки, семена, побеги	5-8
Белизна	25	Почки, завязи, цветки, семена, побеги	5

В связи с тем, что глубина проникновения заражения в апекс чаще всего неизвестна, используют для посадки не чистую меристему, а более крупные части апекса. Поэтому экспланты земляники достигают длины 1,5 мм. При введении используют безгормональную среду Мурасиге-Скуга (MS) [1, 4].

¹ Работа выполнена в рамках договора № 1-04 от 10 мая 2012 «Получение оздоровленного посадочного материала в условиях *invitro* на примере земляники садовой», заключенного между департаментом АПК Белгородской области и исполнительной дирекции ОГУ «Фонд УНАК».

Цель нашей работы произвести сравнительную оценку качества стерилизующих агентов и их влияние на объекты микроразмножение в условиях *invitro* на примере земляники садовой.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являются стерильные верхушечные столоны (усы) *Fragaria × ananassa* (Weston) Duchesne. Были отобраны наиболее востребованные сорта земляники: «ЗенгаЗенгана», «Лорд», «Гигантелла».

Исследования по культивированию в условиях *invitro* проводили в соответствии с методическими указаниями по культуре ткани и органов в селекции растений [1, 3, 4]. Обработка экспериментальных данных выполнена на основе методов математической статистики по методикам, опубликованным Доспеховым [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенными исследованиями выявлено, что успех введения в культуру тканей определяется эффективностью стерилизации. Как показал сравнительный анализ действия различных стерилизующих агентов, использование хлорсодержащих веществ обеспечивало достаточную стерильность материала.

Среди изученных агентов пергидроль 10-12 % обладал наименьшим стерилизующим эффектом, в основном грибная инфицированность эксплантов составляла 92 % (рис. 1-3, табл. 2).



Рис 1 – сорт «ЗенгаЗенгана»

Рис 2 – сорт «Гигантелла»

Рис 3 – сорт «Лорд»

Таблица 2

Влияние различных стерилизующих агентов на обеззараживание материала в условиях *invitro*

Стерилизующий агент	Концентрация, %	Время обработки, мин	Количество введенных эксплантов, шт.	Наличие инфекции, %	Неинфицированные растения	Развитие регенерантов в баллах
					%	
Пергидроль	10-12	10-15	50	92	8	2
	20		50	40	60	4
Дезэфект	≈30	5	50	85	15	3
		15	50	60	40	3
		30	50	35	65	5
		60	50	70*	30	2
хлоргексидин	0,1	15-20	50	10	90	5

* - поражение дезинфицирующим агентом слишком большое

Количество стерильных проростков не превышало 8 %. После обработки эксплантов земляники пергидролем с концентрацией 10-12% растения формировались недоразвитыми и уродливыми. Их длина составляла 1-3 мм. Листочки на проростках были скручены и имели светло-зеленый окраску. Корешок растения имел длину 1-2 мм. Оценка состояния проростка по 5 балльной шкале составляла 2 балла. Растения обладали низкой жизнеспособностью, через 10 дней культивирования проростки загнивали и не могли использоваться для дальнейшей работы.

Применение раствора пергидроля с концентрацией примерно 20% обеспечивало больший стерилизующий эффект материала – 60 %. Аномалий в развитии проростков после обработки эксплантов 20%-ым раствором пергидроля не наблюдалось. При этом растения имели хорошо развитую корневую систему с многочисленными боковыми корешками. Длина главного корня составляла 7-8 мм. Утолщенный стебель имел длину 5-6 мм. Проросток был насыщенно зеленого цвета. Оценка состояния проростков – 4 баллов.

30%-ый раствор дезэфекта с различным временем экспозиции имел неодинаковый стерилизующий эффект на экспланты. Так было установлено, что наибольшее инфицирование получили пассажи, время обработки которых не превышало 5 мин – 85%. При этом развивающиеся проростки уродливы, листочки не цельные, длина корешков 3-4 мм. Несколько лучше обстоят дела для эксплантов, обрабатывание которых продолжалось 15 мин – 60%, проростки также не жизни способны. После воздействия дезэфекта в течение 60 мин экспланты имели обширные площади повреждения. Даже тщательное удаление поврежденных участков не позволило окончательно от них избавиться и большинство пассажей после посадки на питательную среду очень быстро погибли. Растеньица так же как и в случае с пергидролем не могли использоваться для дальнейшей работы. Наилучшим результат показала стерилизация объектов в течение 30 минут – 35%. При этом растения имели хорошо развитую корневую систему с многочисленными боковыми корешками. Длина главного корня составляла 5-6 мм. Утолщенный стебель имел длину 3-4 мм. Проросток имел насыщенную зеленую окраску. Оценка состояния проростков – 5 баллов

Высокий стерилизующий эффект наблюдался так же после обработки материала 0,1%-ым раствором хлоргексидина – 90 %. При его применении общая зараженность растений составляла 10 %. Использование раствора оказывало положительное действие на жизнеспособность проростков. Так, после двух месяцев культивирования растения выглядели сильными. Длина корешка от 2 до 5 см. Стебелек проростка имел ярко-зеленую окраску, длина составила примерно 0,5-3 см (рис. 4-6). Оценка состояния проростков – 5 балла.

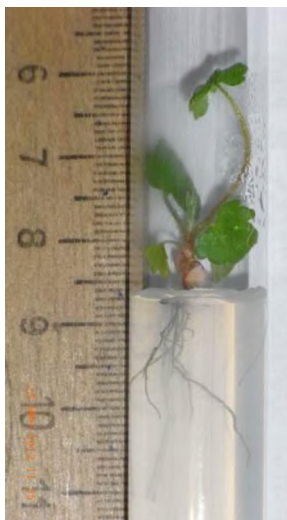


Рис 4 – сорт «ЗенгаЗенгана»
через 2 месяца после
введения в культуру



Рис 5 – сорт «Гигантелла»
через 2 месяца после
введения в культуру



Рис 6 – сорт «Лорд»
через 2 месяца после
введения в культуру

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, оптимальным стерилизующим агентом для обеспечения стерильности и сохранения высокой жизнеспособности вводимого материала в наших исследованиях был раствор хлоргексидина в концентрации 0,1 %.

Литература

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *invitro* и биотехнологии на их основе: учеб. Пособие. – М.: ФБК-ПРЕСС, 199. – 160 с.
2. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). — 5-е изд., доп. и перераб.—М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.
3. Инновационные технологии возделывания земляники садовой: науч.-практ. изд. – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2010. – 88 с.
4. Калинин Ф.Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.