

УДК 581.14.6:634.738

Е. Н. КУТАС, М. В. ГАРАНИНОВА

**ВЛИЯНИЕ СТЕРИЛИЗУЮЩИХ СОЕДИНЕНИЙ
НА ВЫХОД ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ ЭКСПЛАНТОВ РОДОДЕНДРОНОВ
(RHODODENDRON L.)
ПРИ ВВЕДЕНИИ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO***

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, e-mail: E. Kutas@cbg.org.by

(Поступила в редакцию 9.10.2014)

Введение. Процесс клонального микроразмножения начинается с изолирования экспланта, его стерилизации и посадки на питательную среду. Одна из основополагающих ролей в этом процессе отводится подбору стерилизующих соединений, эффективности их концентраций и продолжительности времени обработки с целью освобождения материала от инфекции и получения высокого выхода жизнеспособных эксплантов.

Анализ литературных данных и собственных исследований, касающихся стерилизации растительного материала при введении его в культуру *in vitro*, показал, что для стерилизации используют различные стерилизующие соединения с разной концентрацией и временем экспозиции.

А. Casas и J. Lasa [1] испытывали 5 составов стерилизующих соединений для эксплантов сахарной свеклы. Наиболее полную стерилизацию эксплантов обеспечила процедура стерилизации, включающая обработку хлоридом ртути в концентрации 1 % в течение 1 мин. По данным Г. А. Кудиной и Н. Ф. Довбыш [2], для стерилизации латеральных почек декоративных сортов розы гибридной целесообразно использовать 70 %-ный раствор этилового спирта в течение 2 мин в сочетании с 10 %-ным раствором перекиси водорода в течение 15 мин. Для стерилизации протокормов орхидей, по результатам исследований V. Raskauskas и др. [3], лучшим является следующий состав: 70 %-ный раствор этилового спирта (время действия 2 мин) + 0,1 %-ный раствор диацита (время действия 5 мин) + 10 %-ный раствор хлорамина (время действия 10 мин). Согласно результатам исследований А. N. Sudhadevi и К. Nataraja [4], для стерилизации эксплантов *Dalbergia latifolia* Roxb. следует использовать хлорид ртути. На основании экспериментальных исследований О. К. Тварткиладзе и А. В. Мезенцев [5] пришли к выводу, что оптимальными стерилизующими соединениями для эксплантов чая следует считать водный раствор, содержащий 1,2–2 % перекиси водорода и 50–60 % этилового спирта на первом этапе стерилизации в течение 10–15 с; на втором этапе стерилизации – 0,05–0,20 %-ный водный раствор диацита в течение 5–10 мин. G. Balakrishnamurthy и S. Rangasamy [6] флоральные апексы банана стерилизовали 70 %-ным раствором этилового спирта в течение 30 с, затем 0,1 %-ным раствором сулемы в течение 5 мин с последующим промыванием их в стерильной воде.

Стерилизующие соединения по степени их дезинфицирующего действия условно можно разделить на несколько групп:

1. Соединения, обладающие сильным дезинфицирующим действием.
2. Соединения, обладающие средним дезинфицирующим действием.
3. Соединения, обладающие слабым дезинфицирующим действием.

К первой группе принадлежат соединения, содержащие ртуть (сулема, диацид, азотнокислая ртуть), азотнокислое серебро. Ко второй группе относятся гипохлориды натрия, калия, хлорамин, хлорная известь, т. е. соединения, содержащие в своем составе активный хлор. К третьей группе принадлежат перекись водорода и перманганат калия с присущими им окислительными свойствами.

Наименее выраженным токсическим действием обладают хлорамин и перекись водорода в силу их быстрого разложения. Они применяются для стерилизации нежных, легко повреждаемых тканей.

Соединения, содержащие ртуть, используют в случае неэффективного действия растворов, содержащих хлор.

Хлорактивные соединения (*хлорная известь, хлорамин*) – традиционные средства стерилизации. Механизм уничтожения микроорганизмов свободным хлором окончательно не выяснен. К числу вероятных путей воздействия хлора относят подавление некоторых важнейших ферментных реакций в микробной клетке, денатурацию белков и нуклеиновых кислот [7]. Кислородсодержащие препараты, в частности *перекись водорода*, являются сильными окислителями, основой действия которых служит образование свободных радикалов, повреждающих липиды клеточной мембраны, ДНК и другие важные компоненты микробной клетки.

Несмотря на синтез многими микроорганизмами каталазы, которая защищает клетки от воздействия перекиси водорода путем разложения ее на воду и кислород, используемые при стерилизации концентрации H_2O_2 позволяют в большинстве случаев преодолеть данный механизм резистентности [8]. Однако в высоких ее концентрациях на фоне таких положительных качеств, как широкий спектр активности, включающий споры бактерий, способность растворять многие биологические соединения, отсутствие запаха, быстрое разложение во внешней среде на нетоксичные продукты, выражены отрицательные качества – высокая тканевая токсичность, проявляющаяся в разрушении имеющихся в растении пигментов, что приводит к обесцвечиванию тканей. Поэтому использовать ее нужно с осторожностью.

Из группы спиртов для дезинфекции наиболее широко применяют *этиловый и изопропиловый спирты*. Механизм их действия заключается в денатурации микробных белков [9].

Соединения, содержащие ртуть, серебро, используются в случае неэффективного действия растворов, содержащих хлор.

Серебро связывается с азотистыми основаниями дезоксирибонуклеиновой кислоты, вследствие чего нарушается стабильность ДНК и, соответственно, жизнеспособность бактерий, грибов и вирусов. Кроме того, быстрое проникновение ионов серебра в клетку, в цитоплазматическую мембрану, нарушение функции клеточной оболочки (бактериостатический эффект) и блокада множества бактериальных ферментов (бактериолитический эффект) приводят к неминуемой гибели микроорганизмов [10].

Необходимо отметить, что для каждого вида растения оптимальный режим стерилизации, способствующий высокому выходу жизнеспособных эксплантов, определяется экспериментальным путем. Так, для сахарной свеклы, по данным Ж. В. Ахмедовой [11], из испытанных концентраций различных стерилизующих соединений (нитрат серебра, хлорамин, перекись водорода) только 0,1 %-ный раствор нитрата серебра обеспечил высокий выход жизнеспособных эксплантов (80–100 %). Аналогичные исследования были проведены для черной смородины [12], аконита [13], гибридов тополя [14], георгина [15], ячменя [16] и других растений [17–19].

Следует акцентировать внимание на проведенных японскими учеными [20] исследованиях по изучению влияния различных стерилизующих соединений и их концентраций на стерилизацию семян моркови. На наш взгляд, достаточно интересным оказался тот факт, что использование ими гипохлорида 5 %-ного калия, 6 %-ного кальция, 10 %-ного натрия в дальнейшем стимулировало дифференциацию соматических зародышей моркови.

К сожалению, в доступной нам литературе не обнаружено сведений об исследованиях, касающихся влияния стерилизующих соединений на выход жизнеспособных эксплантов у интродуцированных видов рододендронов.

Цель работы – определить оптимальное стерилизующее соединение для эксплантов рододендронов, вводимых в культуру *in vitro*.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили 12 интродуцированных видов рододендронов: кэтевбинский – *Rhododendron catawbiense* Michaux, понтийский – *Rhododendron ponticum* L., Смирнова – *Rhododendron smirnowii* Trautv., японский – *Rhododendron japonicum* (A. Gray) Suring, короткоплодный – *Rhododendron brachycarpum* D. Don (syn. *Azalea brachycarpa* D. Don), Кочи – *Rhododendron kotschyi* Simonk, кровавокрасный – *Rhododendron haemaleum* Balf. f. & Forrest, малый – *Rhododendron minus* Michaux, разноцветный – *Rhododendron discolor* Franch., розовый – *Rhododendron roseum* (Loisel.) Rehd., форчуна – *Rhododendron fortunei* Lindl., Шлиппенбаха – *Rhododendron schlippenbachii* Maxim.

В качестве стерилизующих соединений для 12 интродуцированных видов рододендронов испытывали 0,1 %-ные растворы диацита, сулемы и азотнокислого серебра в сочетании с обработкой 70-градусным этанолом. Время экспозиции для этанола составило 5 с, для диацита и сулемы – 8 мин, для азотнокислого серебра – 5 мин. Принимая во внимание, что вводили в стерильную культуру виды, а не сорта рододендронов, в качестве эксплантов использовали не только почки, но и семена (см. таблицу). Для 4 видов рододендронов (японского, кэтевбинского, Смирнова и понтийского) эксплантами служили верхушечные и боковые почки молодых побегов; для 8 видов (форчуна, малого, Кочи, Шлиппенбаха, разноцветного, короткоплодного, розового, кровавокрасного) – семена.

Жизнеспособность эксплантов интродуцированных видов рододендронов в зависимости от типа стерилизующих соединений и времени их воздействия

| Вид | Эксплант | 0,1 %-ное азотнокислое серебро (5 мин) | | | 0,1 %-ный диацит (8 мин) | | | 0,1 %-ная сулема (8 мин) | | |
|---------------------------------|----------|---|------|--------|-----------------------------|------|--------|-----------------------------|-----|--------|
| | | И | О | Ж | И | О | Ж | И | О | Ж |
| <i>Rhododendron catawbiense</i> | Почки | 0/0 | 3/15 | 17/85 | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 |
| <i>Rh. ponticum</i> | Почки | 0/0 | 2/10 | 18/90 | 0/0 | 3/15 | 17/85 | 0/0 | 0/0 | 20/100 |
| <i>Rh. smirnowii</i> | Почки | 0/0 | 1/5 | 19/95 | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 |
| <i>Rh. japonicum</i> | Почки | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 |
| <i>Rh. brachycarpum</i> | Семена | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 |
| <i>Rh. kotschyi</i> | Семена | 0/0 | 4/20 | 16/80 | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 |
| <i>Rh. haemaleum</i> | Семена | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 |
| <i>Rh. minus</i> | Семена | 0/0 | 3/15 | 17/85 | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 |
| <i>Rh. discolor</i> | Семена | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 |
| <i>Rh. roseum</i> | Семена | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 |
| <i>Rh. fortunei</i> | Семена | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 |
| <i>Rh. schlippenbachii</i> | Семена | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 | 0/0 | 0/0 | 20/100 |

П р и м е ч а н и е. Расчет производили исходя из 20 эксплантов для каждого вида. Через косую черту приведено абсолютное (шт.) и относительное (%) количество эксплантов. И – инфицированные экспланты, О – окисленные, Ж – жизнеспособные.

После стерилизации материал промывали в трех сменах стерильной бидистиллированной воды по 15 мин в каждой, затем высаживали на агаризованную среду Андерсена. Пробирки с высаженными эксплантами помещали на стеллажи, где температура воздуха составляла 24 °С, освещенность – 4000 лк, относительная влажность воздуха – 70 %, фотопериод – 16 ч. Учет инфицированных, окисленных и жизнеспособных эксплантов проводили ежедневно в течение 2 недель (данные приведены в таблице).

Результаты и их обсуждение. Представленные в таблице данные свидетельствуют о высоком выходе (100 %) жизнеспособных семян у исследованных видов рододендронов независимо от типа стерилизующего соединения. Исключение составили два вида: малый (85 %) и Кочи (80 %) из-за небольших размеров семян (0,4×0,1 мм).

Выход жизнеспособных почек зависел как от типа стерилизующего соединения, так и от видовой принадлежности растения. Самый высокий выход жизнеспособных почек отмечен у рододендрона японского. Несколько ниже этот показатель у рододендрона кэтевбинского (85 %), понтийского (90 %) и Смирнова (95 %). Это связано с принадлежностью рододендрона японского к листопадным кустарникам, а остальных – к вечнозеленым. Почки листопадного рододендрона японского менее инфицированы, так как они были вычленены из побегов, выгнанных в условиях помещения. К сожалению, побеги вечнозеленых рододендронов не поддаются выгонке в этих условиях, поэтому их почки изначально инфицированы сильнее. Эти факты свидетельствуют о том, что при введении интродуцированных видов рододендронов в стерильную культуру в качестве эксплантов целесообразно использовать семена для вечнозеленых рододендронов, для листопадных – семена и почки.

На основании анализа результатов экспериментальных исследований, полученных по изучению влияния стерилизующих соединений на выход жизнеспособных эксплантов у интродуцированных видов рододендронов, можно констатировать, что выход жизнеспособных эксплантов зависит как от типа стерилизующего соединения, так и от видовой принадлежности растения, а также от типа экспланта.

Закключение. Оптимальным стерилизующим соединением для семян 8 интродуцированных видов рододендронов следует считать 0,1 %-ный раствор азотнокислого серебра при экспозиции 5 мин, для почек – 0,1 %-ный раствор сулемы и диацита при экспозиции 8 мин.

Литература

1. *Cacas A., Lasa J.* // Estacion Exp. de Aula Dei. 1986. Vol. 18, N 1. P. 51–56.
2. *Кудина Г. А., Добыши Н. Ф.* // Тез. докл. респ. науч. конф., посвящ. 25-летию Донецкого бот. сада АН УССР, Донецк, сент., 1990 г. Киев, 1990. С. 193–194.
3. *Raskauskas V., Kazlauskienė R., Gudaviciene N., Sirvydyte D.* // Науч. тр. вузов Литовской ССР. Сер. биол. наук. 1989. Vol. 27. P. 36–42.
4. *Sudhadevi A. N., Nataraja K.* // Ind. J. of Forestry. 1987. Vol. 10, N 1. P. 1–6.
5. Способ размножения чая *in vitro*: а. с. 1311673 СССР, МКИ А01Н3/ОД / О. К. Тварткиладзе, А. В. Мезенцев. – № 3868024/30–15 // Бюл. изобрет. 1987. № 19. С. 15.
6. *Balakrishnamurthy G., Rangasamy S.* // Curr. Sci. (India). 1988. Vol. 57, N 5. P. 270–272.
7. *Dychdala G. R.* // Disinfection, sterilization and preservation / S. S. Block (eds.). 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983. P. 157–182.
8. *Turner F. J.* // Disinfection, sterilization and preservation / S. S. Block (eds.). 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983. P. 240–250.
9. *Larson E. L.* // Disinfection, sterilization and preservation / S. S. Block (eds.). 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. P. 191–203.
10. *Кульский Л. А.* Серебряная вода, ее свойства и применение. Киев: Изд-во АН УССР, 1955. – 230 с.
11. *Ахмедова Ж. В.* // Проблемы теоретической и прикладной генетики в Казахстане: материалы респ. конф. Алма-Ата, 18–22 ноября 1999 г. Алма-Ата, 1999. С. 117–118.
12. *Апрощенко Г. П., Гусева М. А., Черепанова Г. Г.* // Материалы конф. молодых ученых и студентов / Ленинград. с.-х. ин-т. Л., 1990. С. 43–44.
13. *Лукичева И. А., Мигринова И. Г.* // Вестн. Башкир. ун-та. 2001. № 2. С. 94–95.
14. *Мельничук М. Д., Пинчук А. П., Маурер В. М.* // Биотехнология. 2004. Т. 5, № 1. С. 25–30.
15. *Шумихин С. А.* // Вестн. Пермск. ун-та. 2004. № 2. С. 61–63.
16. *Рокитянская Л. С.* // Биология – наука XXI века. Пушино, 2005. – 190 с.
17. *Мохаммед А. И., Бутенко Р. Г.* // Физиол. раст. 1998. Т. 45, № 5. С. 738–740.
18. *De Lange J., Willers P., Magda Nel.* // The J. of Horticult. Sci. and Biotechnol. 1987. Vol. 62, N 2. P. 249–252.
19. *Гончарук Е. Ф., Калашикова Е. А.* // Изв. Тимирязев. с.-х. акад. 1998. № 4. С. 125–129.
20. *Kiyosue T., Kamada H., Harada H.* // Plant Tissue Culture Lett. 1989. Vol. 6, N 3. P. 138–143.

E. N. KUTAS, M. V. GARANINOVA

**INFLUENCE OF STERILIZING COMPOUNDS ON THE YIELD OF VIABLE EXPLANTS RHODODENDRON
(RHODODENDRON L.)**

Summary

The effect of sterilizing compounds on the viability of explants rhododendrons introduced into culture *in vitro*. It was shown that the yield of viable explants depends on the type of sterilant compound and from species belonging plant and the type of explant. Optimal sterilizing compound for 8 seeds introduced species rhododendrons should be considered as 0.1 % solution of silver nitrate with an exposure of 5 minutes, to the kidneys – 0.1 % solution of mercuric chloride and the diacid by exposure to 8 minutes.