

Рахымгожин М.Б. 

КазНУ имени аль-Фараби проспект Аль-Фараби, Қазақстан

*e-mail: madik53@gmail.com

СРАВНЕНИЕ ДЕЗИНФЕКЦИОННЫХ СРЕДСТВ, В СТЕРИЛИЗАЦИЯ КОЛОСЬЕВ ПШЕНИЦЫ ДЛЯ ИНКУБАЦИИ ПЫЛЬНИКОВ

Аннотация

В статье сравниваются различные методы стерилизации колосьев пшеницы перед инкубацией пыльников, что является важной процедурой в гаплоидной технологии. В ходе исследования оценивались различные сорта яровой твердой пшеницы — Сеймур 17, Гардейформ 254, Наурыз-6, Серке, Наурыз и Милана — а также эффективность трех дезинфицирующих средств: дехлора, гипохлорита натрия и спирта (70%). Результаты показали, что дехлор и гипохлорит натрия продемонстрировали самый высокий уровень эффективности в снижении заражения колосков до 10-20%, тогда как алкоголь (70%) продемонстрировал умеренную эффективность. Следовательно, рекомендуется использовать дехлор или гипохлорит натрия для стерилизации початков пшеницы, чтобы повысить успех андрогенеза и обеспечить жизнеспособность микроспор.

Ключевые слова: инкубация, методы стерилизации, твердая пшеница, микроспоры гаплоидная технология.

Рахымгожин М.Б. 

Әл-Фараби атындағы ҚазҰУ, Алматы қ., Қазақстан

*e-mail: madik53@gmail.com

БИДАЙ МАСАҚТАРЫН ИНКУБАЦИЯЛАУ ҮШІН ТОЗАҢҚАПТАРДЫ ЗАРАРСЫЗДАНДЫРУ ӘДІСТЕРІН САЛЫСТЫРУ

Аңдатпа

Мақалада бидай масақтарын тозаңқап инкубациясына дайындау үшін әртүрлі зарарсыздандыру әдістері салыстырылады, бұл гаплоидты технологиядағы маңызды процедура болып табылады. Зерттеу барысында жаздық қатты бидайдың әртүрлі сорттары — Сеймур 17, Гардеформ 254, Наурыз-6, Серке, Наурыз және Милана — сондай-ақ үш дезинфекциялау құралдарының тиімділігі: дехлор, натрий гипохлориті және спирт (70%) бағаланды. Нәтижелер көрсеткендей, дехлор және натрий гипохлориті масақтардың ластану деңгейін 10-20% дейін тиімді төмендетті, ал спирт (70%) орташа тиімді болды. Сондықтан, андрогенездің сәттілігін арттыру және микроспоралардың өміршеңдігін қамтамасыз ету үшін бидай масақтарын зарарсыздандыруда дехлор немесе натрий гипохлоритін қолдану ұсынылады.

Түйін сөздер: инкубация, зарарсыздандыру әдістері, қатты бидай, микроспоралар, гаплоидты технология.

Rakhymgozhin M.B. 
Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
*e-mail: madik53@gmail.com

COMPARISON OF DISINFECTANTS IN THE STERILIZATION OF WHEAT SPIKES FOR ANTHER INCUBATION

Abstract

The article compares various methods of sterilizing wheat ears before anther incubation, which is an important procedure in haploid technology. The study evaluated different varieties of spring durum wheat — Seymour 17, Gardeyform 254, Nauryz-6, Serke, Nauryz, and Milana — as well as the effectiveness of three disinfectants: dechlor, sodium hypochlorite, and ethanol (70%). The results showed that dechlor and sodium hypochlorite demonstrated the highest efficiency in reducing contamination levels of the ears to 10-20%, while ethanol (70%) showed moderate efficiency. Therefore, it is recommended to use dechlor or sodium hypochlorite for sterilizing wheat ears to increase the success of androgenesis and ensure the viability of microspores.

Keywords: *incubation, sterilization methods, durum wheat, microspores, haploid technology.*

Введение. На сегодняшний день в мире уделяется огромное количество времени и средств на выращивание различных культурных растений. Фермерам нужны новые сорта культур для просеивания своих угодий, так как год за годом культурные растения становятся менее выносливыми различными факторам из-за вредителей и болезней, что вредит урожайности и полезности культур.

Селекционеры и биотехнологи всего мира разрабатывают все новые методы для создания новых сортов. Гаплоидная технология является одним из таких методов [1].

Применение гаплоидных технологий позволяет сократить время и ресурсы в процессе селекции, а также повысить точность отбора, уменьшая генетический фон нежелательных аллелей. Это позволяет выращивать сорта с улучшенными агрономическими свойствами, такими как повышенная урожайность, устойчивость к болезням и способность адаптироваться к изменяющимся климатическим условиям. Стерилизация исходного материала, особенно микроспоры початков растений, из которых выделяют микроспоры, имеет решающее значение для успеха гаплоидных технологий.

Подготовка початков — важнейший этап, эффективность всего процесса андрогенеза. Микроспоры стимулируются к переходу вместо гаметофитного пути развития в эмбриогенный путь развития путем проведения различных процедур, используемых в этом процессе. Производство гаплоидных и двойных гаплоидных растений улучшается благодаря предобработке, которая увеличивает количество микроспор, способных к эмбриогенезу.

Чтобы получить гаплоидные и двойные гаплоидные растения, стерилизация колосьев пшеницы является важным этапом процесса андрогенеза. Этот процесс жизненно важен для обеспечения стерильности и здоровья культур. Это может влиять на успешность последующего развития растений и их устойчивость к абиотическим стрессам.

Настоящая статья описывает различные способы и важность стерилизации для поддержания здоровья культур и обсуждает, как здоровые начальные условия могут помочь растениям адаптироваться к плохим условиям.

Данная статья поможет начинающим ученым в научных работах включающих предобработку растений.

На первом этапе (Stage I) культуры растительных тканей, экспланты, обработанные *ex vitro*, освобождаются от микробного загрязнения и переносятся в среду *in vitro* [2, 3]. Дезинфекция эксплантов является первым и самым сложным этапом создания асептической

культуры, и поэтому необходима для успешного культивирования любых растительных тканей. Во время дезинфекции должны быть удалены все микроорганизмы, такие как бактерии или грибы, загрязняющие экспланты извне и изнутри [4], без повреждения или гибели растительных тканей. Поскольку дезинфицирующие средства, применяемые для обеззараживания поверхности эксплантов, могут быть токсичны для растительных тканей [2], необходимо соблюдать баланс между уровнем загрязнения и выживаемостью эксплантов при использовании дезинфицирующих агентов. Стадия I считается завершенной, если экспланты способны выживать и расти в среде *in vitro* без микробной контаминации.

Дезинфекция растительного материала для культуры *in vitro* обычно проводится в три этапа [5]: (1) первоначальное промывание и дезинфекция; (2) дополнительные этапы дезинфекции после ополаскивания; (3) окончательное ополаскивание. В данном обзоре рассмотрены все известные процедуры дезинфекции, применявшиеся для обработки и создания культур *in vitro* различных типов эксплантов антуриума. Эти экспланты затем используются для чистых и прикладных целей в культуре тканей и микроразмножении [6,7].

До вступления в первое митотическое деление одноядерная микроспора является наиболее подходящей стадией для культуры изолированных микроспор. Это деление совпадает когда второй лист находится почти по середине колоса (Рисунок 1).

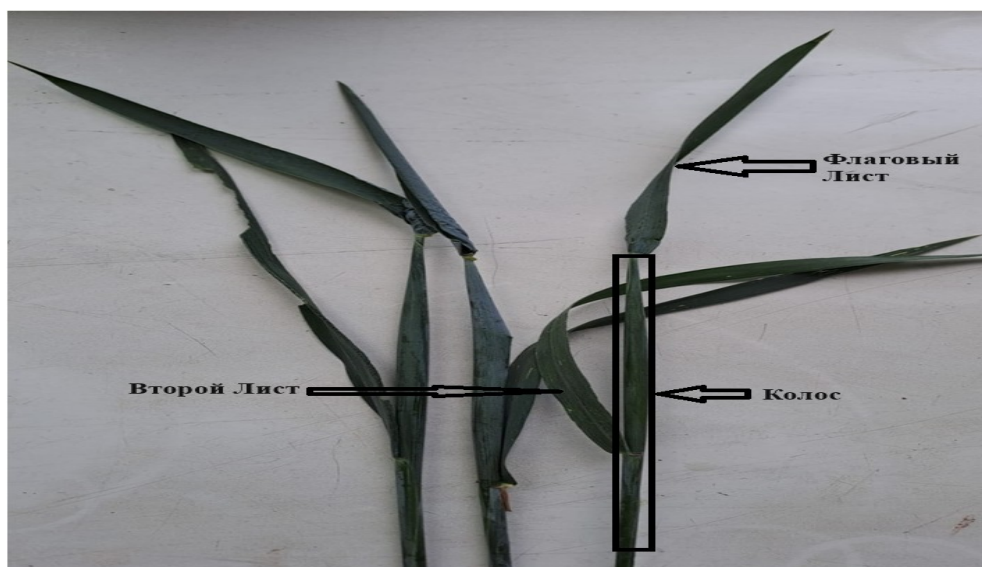


Рисунок 1. Фрагмент первое митотическое деление одноядерная микроспора

Материалы и методы. Колосье подвергаются холодной обработке при температуре 1-5°C. Холодная предварительная обработка колосье при низких температурах (1-5 °C) используется для стимуляции эмбриогенеза у различных растений, таких как соя, рис, кукуруза и пшеница. Перед культивированием микроспор или эмбриона колосье выдерживаются в холодной камере или холодильнике в течение определенного периода времени. Это связано с тем, что холодная предобработка колосье увеличивает частоту и качество эмбрионального развития, что приводит к повышению урожайности.

Однако оптимальное время холодной обработки и оптимальная температура могут различаться в зависимости от вида и сорта культуры. Некоторые исследования показывают, что более длительная предварительная обработка холодом может привести к негативному влиянию на качество и выживаемость эмбрионов, поэтому необходимо оптимизировать условия для каждого случая. Холодную обработку початков проводили при температуре +2-4°C в течение 20-25 дней. [8]

После холодной обработки производится стерилизация колосьев, не правильная стерилизация может и не оставить шансов в дальнейших стадиях культивирования, так как может убить жизнеспособность растений.

Стерилизация колосьев пшеницы перед инкубацией пыльников имеет решающее значение для предотвращения микробной контаминации, которая может негативно повлиять на эффективность андрогенеза. Рассмотрим основные методы стерилизации, используемые в лабораторной практике, такие как применение гипохлорита натрия, Спирта (70%) а и де-хлора, а также оценим, как они влияют на стерильность и жизнеспособность колосьев и пыльников. Жизнеспособность пыльников была оценена визуально с использованием компьютерного микроскопа.

Виды стерилизации:

1. Гидрохлорида натрия (гипохлорит натрия) натрия (NaClO)

Раствор гипохлорита натрия обычно используется в концентрации от 1% до 5% для обработки колосьев. Колосья погружают в раствор на период от 5 до 10 минут.

2. Спирта (70%) (этанол)

Колосья быстро погружают в Спирта (70%) овой раствор на 1-2 минуты, после чего их тщательно промывают стерильной дистиллированной водой.

3. Де-хлор (деклоринатор)

Де-хлор, обычно содержащий соединения для нейтрализации хлора, добавляется в воду, используемую для последующего ополаскивания колосьев после обработки хлорсодержащими растворами. Сравнение дезинфицирующих средств представлено ниже (Таблицы 1-7).

Таблица 1. Стерилизационные агенты

№	Стерилизатор	Концентрация, %	Время
1	Де-хлор	0,04 %	5 мин
2	гипохлорита натрия	1 %	10 мин
3	Спирта	70 %	20 мин

Микроспоры культивировались в питательной среде – Murashige & Skoog[9,10], 1962. 5-10 яйцеклеток добавляли в каждую чашку Петри.

Результаты и обсуждение. В качестве объектов исследования использовались сорта яровой твердой пшеницы: Сеймур 17, Гардейформ 254, Наурыз-6, Серке, Наурыз, Милана.

После предварительной обработки колосков растений мы дезинфицируем микроспоры, используя различные растворы, такие как дехлор, гипохлорит натрия (NaClO) и Спирта (70%).

Таблица 2. Влияние дезинфицирующих средств на количество жизнеспособных семян пшеницы сорта Сеймур 17.

Дезинфицирующие средства	Количество посаженных	Количество зараженных	Процент зараженных
Контроль	10	10	100%
Дехлор	10	1	10%
NaClO 5%	10	1	10%
Спирта (70%)	10	4	40%

Контрольная группа была наиболее зараженной, с 100% зараженностью, что означает, что в условиях без дезинфицирующих средств колосья растения не были защищены.

Дехлор (тиосульфат натрия) и гипохлорит натрия показали значительное снижение зараженности до 10%. Это свидетельствует о их высокой эффективности в уничтожении патогенной флоры на колосьях пшеницы. Эти средства могут быть использованы для стерилизации в ситуациях, когда необходимо снизить риск заражения культур. Спирта (70%) оказался умеренно эффективным, что снизило долю зараженных семян до 40%. Это означает, что спирт менее эффективен по сравнению с дехлором и NaClO в этой концентрации, но он все же способен оказать защитное действие.

Таблица 3. Влияние дезинфицирующих средств на количество жизнеспособных семян пшеницы сорта Наурыз 6.

Дезинфицирующие средства	Количество посаженных	Количество зараженных	Процент зараженных
Контроль	10	10	100%
Дехлор	10	2	20%
NaClO 5%	10	2	20%
Спирта (70%)	10	6	60%

Контрольная группа была наиболее зараженной, с 100% зараженностью, что означает, что в условиях без дезинфицирующих средств колосья не были защищены.

Дехлор и гипохлорит натрия показали значительное снижение зараженности до 20%. Это свидетельствует о их высокой эффективности в уничтожении патогенной флоры на колосьях пшеницы. Эти средства могут быть использованы для стерилизации в ситуациях, когда необходимо снизить риск заражения культур. Спирта (70%) а оказался умеренно эффективным, что снизило долю зараженных семян до 60%. Это означает, что спирт менее эффективен по сравнению с дехлором и NaClO в этой концентрации, но он все же способен оказать защитное действие.

Таблица 4. Влияние дезинфицирующих средств на количество жизнеспособных семян пшеницы сорта Наурыз 2.

Дезинфицирующие средства	Количество посаженных	Количество зараженных	Процент зараженных
Контроль	10	10	100%
Дехлор	10	1	10%
NaClO 5%	10	1	10%
Спирта (70%)	10	4	40%

Контрольная группа была наиболее зараженной, с 100% зараженностью, что означает, что в условиях без дезинфицирующих средств колосья не были защищены.

Дехлор и гипохлорит натрия показали значительное снижение зараженности до 10%. Это свидетельствует о их высокой эффективности в уничтожении патогенной флоры на колосьях пшеницы. Эти средства могут быть использованы для стерилизации в ситуациях, когда необходимо снизить риск заражения культур. Спирта (70%) а оказался умеренно эффективным, что снизило долю зараженных семян до 40%. Это означает, что спирт менее эффективен по сравнению с дехлором и NaClO в этой концентрации, но он все же способен оказать защитное действие.

Таблица 5. Влияние дезинфицирующих средств на количество жизнеспособных семян пшеницы сорта Милана.

Дезинфицирующие средства	Количество посаженных	Количество зараженных	Процент зараженных
Контроль	10	10	100%
Дехлор	10	1	10%
NaClO 5%	10	1	10%
Спирта (70%)	10	5	50%

Контрольная группа была наиболее зараженной, с 100% зараженностью, что означает, что в условиях без дезинфицирующих средств колосья не были защищены.

Дехлор и гипохлорит натрия показали значительное снижение зараженности до 10%. Это свидетельствует о их высокой эффективности в уничтожении патогенной флоры на колосьях пшеницы. Эти средства могут быть использованы для стерилизации в ситуациях, когда необходимо снизить риск заражения культур. Спирта (70%) а оказался умеренно эффективным, что снизило долю зараженных семян до 50%. Это означает, что спирт менее эффективен по сравнению с дехлором и NaClO в этой концентрации, но он все же способен оказать защитное действие.

Таблица 6. Влияние дезинфицирующих средств на количество жизнеспособных семян пшеницы сорта Гардейформ 254.

Дезинфицирующие средства	Количество посаженных	Количество зараженных	Процент зараженных
Контроль	10	10	100%
Дехлор	10	3	20%
NaClO 5%	10	1	10%
Спирта (70%)	10	6	60%

Контрольная группа была наиболее зараженной, с 100% зараженностью, что означает, что в условиях без дезинфицирующих средств колосья не были защищены.

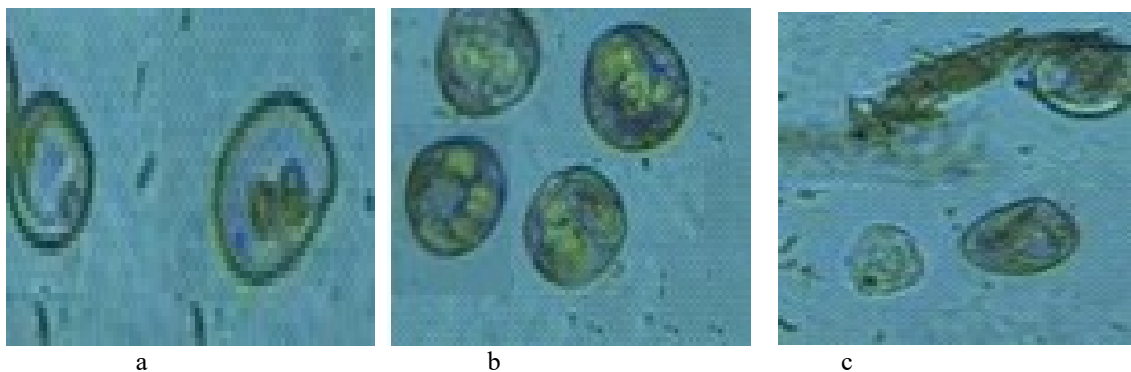
Дехлор и гипохлорит натрия показали значительное снижение зараженности от 20% до 10%. Это свидетельствует о их высокой эффективности в уничтожении патогенной флоры на колосьях пшеницы. Эти средства могут быть использованы для стерилизации в ситуациях, когда необходимо снизить риск заражения культур. Спирта (70%) а оказался умеренно эффективным, что снизило долю зараженных семян до 60%. Это означает, что спирт менее эффективен по сравнению с дехлором и NaClO в этой концентрации, но он все же способен оказать защитное действие.

Таблица 7. Влияние дезинфицирующих средств на количество жизнеспособных семян пшеницы сорта Серке.

Дезинфицирующие средства	Количество посаженных	Количество зараженных	Процент зараженных
Контроль	10	10	100%
Дехлор	10	2	20%
NaClO 5%	10	1	10%
Спирта (70%)	10	4	40%

Контрольная группа была наиболее зараженной, с 100% зараженностью, что означает, что в условиях без дезинфицирующих средств колосья не были защищены.

Дехлор и гипохлорит натрия показали значительное снижение зараженности от 20% до 10%. Это свидетельствует о их высокой эффективности в уничтожении патогенной флоры на колосьях пшеницы. Эти средства могут быть использованы для стерилизации в ситуациях, когда необходимо снизить риск заражения культур. Спирта (70%) а оказался умеренно эффективным, что снизило долю зараженных семян до 40%. Это означает, что спирт менее эффективен по сравнению с дехлором и NaClO в этой концентрации, но он все же способен оказать защитное действие.



Микроспоры после выделения и очистки на 100 и 40 мкм; разделение на жизнеспособных и нежизнеспособных микроспоры;

a, b – эмбрионные микроспоры; разные стадии развития микроспоры

c – не жизнеспособные микроспоры

Рисунок 3 – Фотографии микроспор пшеницы с микроскопа MeijiTechno серии MT4000, увеличение 100x и 40x

При визуальном осмотре микроспор под микроскопом было выявлено что среди образцов обработанными де-хлором более жизнеспособными чем 2 двух других способах стерилизации.

Обсуждение. Обсуждение эффективности данных методов дезинфекции подчеркивает, что де-хлор и гипохлорит натрия могут считаться наиболее эффективными средствами защиты колосков яровой твердой пшеницы от патогенной флоры. Эти средства снижают уровень заражения до приемлемого диапазона (10-20%), что делает их предпочтительными для использования. Спирт, хотя и демонстрирует умеренный защитный эффект (снижение заражения до 40%), все же менее эффективен по сравнению с двумя другими средствами, но может использоваться как дополнительное средство дезинфекции.

Также стоит отметить, что при микроскопическом анализе микроспор было обнаружено, что среди образцов, обработанных де-хлором, сохранилось больше жизнеспособных микроспор по сравнению с обработкой гипохлоритом натрия и спиртом. Это свидетельствует о том, что де-хлор не только эффективно борется с патогенами, но и способствует сохранению жизнеспособности микроспор.

Таким образом, можно сделать вывод, что де-хлор является оптимальным выбором для стерилизации пшеницы, обеспечивая как защиту от патогенной флоры, так и сохранение жизнеспособности культурных микроспор.

Выводы. В данном исследовании проверялась эффективность дезинфекции, оценивали путем обработки колосков различных сортов яровой твердой пшеницы: Гардейформ 254, Наурыз-6, Серке, Наурыз и Милана. Использовали растворы дехлора, гипохлорита натрия (NaClO) и спирта (70%), а контролем служили необработанные колоски.

Во всех сортах контрольная группа показало 100% зараженность.

Однако при обработке Де-хлором и гипохлоритом натрия заражение снижается до 10-20%, что является весьма эффективным. В случае со спиртом (70%) уровень заражения снизился до 40 %, что свидетельствует об умеренной защите.

Контрольную группу каждого вид пшеницы 100% зараженность, что означает, что без дезинфицирующих средств не было достигнуто никакого защитного эффекта.

Примечательно, что де-хлор и гипохлорит натрия были признаны высокоэффективными продуктами, поскольку им удалось снизить уровень заражения вредителями до диапазона 10-20% для всех сортов. Они являются наиболее эффективным средством защиты колосков яровой твердой пшеницы от патогенной флоры. Спирт в концентрации 70% оказался умеренно эффективным, снижая уровень заражения до 40 % для всех сортов. Однако он менее эффективен, чем де-хлор и NaClO, но все же способен оказывать защитное действие.

Из этого следует, что при обеззараживании колосков яровой твердой пшеницы в качестве основных средств лучше всего использовать де-хлор и гипохлорит натрия; алкоголь можно рассматривать как дополнительное средство с умеренной эффективностью. Но при визуальном осмотре микроспор под микроскопом, было выявлено что среди образцов обработанными де-хлором было более жизнеспособные микроспоры чем 2 двух других способах стерилизации.

Таким образом можно сказать что использование де-хлора в виде стерилизующего компонента для пшеницы является наиболее лучшим для защиты от патогенов и сохранению жизни способности микроспор.

Список использованной литературы:

1. Tadesse W., Inagaki M., Tawkaz S., Baum, M., Ginkel M. Van. Recent advances and application of doubled haploids in wheat breeding // *African Journal of Biotechnology*, - 2012. 11(89) . - P. 15484–15492.
2. George F. *Plant Propagation by Tissue Culture. Technology*, Exegetics Ltd., England. - 1993. -P. 121-145.
3. George F., Debergh P.C., *Micropropagation: uses and methods*. In: *Plant Propagation by Tissue Culture Vol. 1. The Background*. E.F. George, M.A. Hall and G.J. De Klerk (eds), Springer, Dordrecht, Netherlands. -2008.- P. 29-64.
4. Buckley P.M., Reed B.M. Antibiotic susceptibility of plant associated bacteria. *Hort. Sci.* 29,- 1994. 434-434
5. Pierik R.L. Sterilization of plant material. In: *In Vitro Culture of Higher Plants*. R.L.M. Pierik (ed.), Springer Science+Business Media, Dordrecht. -1997.- P. 89-94.
6. Teixeira D.A. SILVA J.A., Dobránszki J., Problems with traditional science publishing and finding a wider niche for post-publication peer review. *Accountability Res.: Policies Quality Assurance*, - 2015.-22(1). – P. 22-40.
7. Teixeira DA Silva J.A., Dobránszki J., Winarto b., Zeng s-J. *Anthurium in vitro: a review*. *Sci. Hortic.* - 2015.-№186. – P. 266-298.
8. Lantos C., Weyen J., Orsini J. M., Gnad H., Schlieter B., Lein V., Kontowski S., Jacobi A., Mihály R., Broughton S., Pauk J. Efficient application of in vitro anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes. *Plant Breeding*, - 2013. 132(2). – P. 149–154.
9. Murashige T., & Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, -1962. -15(3). – P. 473–497.
10. Weyen J. Barley and Wheat Doubled Haploids in Breeding.pdf. In A.Touraev, B.Forster, & S.Jain (Eds.), *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. - 2009. - P. 179–187. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_15

References:

1. Tadesse W., Inagaki M., Tawkaz S., Baum, M., Ginkel M. Van. Recent advances and application of doubled haploids in wheat breeding // *African Journal of Biotechnology*, - 2012. 11(89) . - P. 15484–15492.
2. George F. *Plant Propagation by Tissue Culture. Technology*, Exegetics Ltd., England. - 1993. -P. 121-145.
3. George F., Debergh P.C., *Micropropagation: uses and methods*. In: *Plant Propagation by Tissue Culture Vol. 1. The Background*. E.F. George, M.A. Hall and G.J. De Klerk (eds), Springer, Dordrecht, Netherlands. -2008.- P. 29-64.
4. Buckley P.M., Reed B.M. Antibiotic susceptibility of plant associated bacteria. *Hort. Sci.* 29,- 1994. 434-434
5. Pierik R.L. Sterilization of plant material. In: *In Vitro Culture of Higher Plants*. R.L.M. Pierik (ed.), Springer Science+Business Media, Dordrecht. -1997.- P. 89-94.
6. Teixeira D.A. SILVA J.A., Dobránszki J., Problems with traditional science publishing and finding a wider niche for post-publication peer review. *Accountability Res.: Policies Quality Assurance*, - 2015.-22(1). – P. 22-40.
7. Teixeira D.A. Silva J.A., Dobránszki J., Winarto b., Zeng s-J. *Anthurium in vitro: a review*. *Sci. Hortic.* - 2015.-№186. – P. 266-298.
8. Lantos C., Weyen J., Orsini J. M., Gnad H., Schlieter B., Lein V., Kontowski S., Jacobi A., Mihály R., Broughton S., Pauk J. Efficient application of in vitro anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes. *Plant Breeding*, - 2013. 132(2). – P. 149–154.
9. Murashige T., & Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, -1962. -15(3). – P. 473–497.
10. Weyen J. Barley and Wheat Doubled Haploids in Breeding.pdf. In A.Touraev, B.Forster, & S.Jain (Eds.), *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. - 2009. - P. 179–187. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_15