

## Эффективные способы стерилизации семян *Robinia pseudoacacia* L. для введения в культуру *in vitro*

Татьяна Васильевна Терещенко ✉, e-mail: tereschenko@vfanc.ru, м.н.с., ORCID 0000-0001-9116-6062; Ольга Олеговна Жолобова, к.б.н., в.н.с., ORCID 0000-0002-1594-4181, зав. лабораторией биотехнологий – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук» (ФНЦ агроэкологии РАН), e-mail: info@vfanc.ru, 400062, пр. Университетский, 97, г. Волгоград, Россия

*Робиния лжеакация* (*R. pseudoacacia* L.) широко используется в аридных районах и относится к почвоулучшающим древесным породам. Культивирование генотипов робинии из семян в условиях *in vitro* актуально при создании селективных систем, позволяющих искусственно моделировать стресс-факторы окружающей среды и ускоренно отбирать наиболее устойчивые к ним экземпляры. Для введения в культуру *in vitro* необходимо получить асептический материал. Для этого применяют различные стерилизующие агенты. В статье представлены результаты сравнительной оценки эффективности применения «Лизоформина 3000», нитрата серебра ( $AgNO_3$ ), перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) и «Белизны» для стерилизации семян *R. pseudoacacia* L. на этапе введения в культуру *in vitro*. В результате проведенного эксперимента было выявлено 5 из 27 примененных режимов стерилизации. На выявленных режимах наблюдались самые высокие показатели стерильных жизнеспособных эксплантов (от 85,0 до 90,0%), их всхожести (от 85,0 до 90,0%) и энергии прорастания (от 80,0 до 85,0%). При повышении концентрации раствора «Лизоформина 3000» и экспозиции значительно снижалась жизнеспособность, всхожесть и энергия прорастания семян, так как альдегиды, которые входят в состав данного стерилизующего агента, в высокой концентрации ингибируют ростовые процессы культивируемых эксплантов. Также наблюдалось изменение морфологии самих проростков. При повышении концентраций и экспозиции стерилизующих растворов серебра азотнокислого ( $AgNO_3$ ) и «Белизны» отмечались более низкие показатели жизнеспособных семян, их энергии прорастания и всхожести вследствие повреждающего действия стерилизующих веществ.

**Ключевые слова:** робиния лжеакация, культура *in vitro*, стерилизация эксплантов, стерилизующие агенты, микроклональное размножение.

Работа выполнена в рамках исполнения плана научно-исследовательской работы ФНЦ агроэкологии РАН «Повышение эффективности микроклонального размножения растений на искусственных питательных средах в условиях *in vitro* с последующей адаптацией к условиям произрастания» № 0508-2019-00.

Поступила в редакцию: 15.05.2022

Принята к печати: 03.06.2022

**Р**обиния лжеакация (*Robinia pseudoacacia* L.) – быстрорастущий лесообразующий вид рода *Robinia*, семейства *Fabaceae* (рисунок 3). Это светолюбивая, засухоустойчивая и солевыносливая культура, благоприятная для создания ажурных и ажурно-продуваемых полезащитных лесных полос [6]. Благодаря сильно развитой корневой системе, данная порода широко используется в аридных районах для закрепления песков, при облесении балок и оврагов и относится к почвоулучшающим древесным породам [1]. Также малая требовательность к плодородию почв сделали робинию лжеакцию очень популярной древесной породой в агролесомелиорации [6].

Использование семенного материала для размножения генотипов в культуре *in vitro* актуально при создании селективных систем, которые позволяют ускоренно отбирать формы, устойчивые к различным природным стресс-факторам, имитированным искусственно в условиях *in vitro* (например, засоление, засуха, повышенное содержание металлов в почве и т.д.).

Характеристика семян *R. pseudoacacia* L. (рисунок 4): длина около 5 мм, ширина 3 мм, толщина 1 – 2 мм, масса 1000 семян – 12,6 г, окраска бурая

или темно-коричневая, форма яйцевидная; гладкие, нередко пятнистые, матовые или блестящие, изогнутые с носиком [8].

Эффективность работы с растительными объектами в условиях *in vitro* во многом зависит от начального этапа их культивирования, который включает в себя подбор режима стерилизации. Для введения в культуру *in vitro* необходимо получить асептический материал, свободный от бактериальной и вирусной инфекции, так как в результате попадания микроорганизмов на питательную среду подавляется рост и развитие культивируемых растений. Для этого применяют обработку растительных эксплантов различными стерилизующими агентами [7]. Важно подобрать такой способ стерилизации, при котором будет достигаться высокий процент стерильных и жизнеспособных эксплантов.

На данный момент литературных данных по стерилизации и введению в культуру *in vitro* семян *R. pseudoacacia* не существует. В своей работе опирались на исследование о влиянии различных режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов *A.dasyanthu*, так как данная культура также является видом семейства *Fabaceae* [5]. По-

этому целью данного эксперимента является подбор и выявление наиболее эффективных режимов стерилизации для семян *R. pseudoacacia* L. на этапе введения в культуру *in vitro*.

**Материалы и методы.** Семенной материал *R. pseudoacacia* L. был собран в 2020 г. (рис.1). Эксперимент проводился с февраля по апрель 2022 г.



Рисунок 1. Сбор материала ценных генотипов для размножения

В целях улучшения всхожести семена робинии предварительно подвергали механической скарификации путем ошпаривания их кипятком [4].

В данном эксперименте в качестве основных стерилизующих агентов использовали растворы «Лизоформина 3000», «Белизны», пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) и нитрата серебра ( $AgNO_3$ ) [5,7]. Концентрации и экспозиция стерилизующих растворов подбирались экспериментально (таблица 1). Для предстерилизационной обработки применяли промывание семян в мыльном растворе в течение 10-20 минут с последующим их промыванием в проточной воде в течение часа [9]. На первом этапе непосредственно самой стерилизации использовали 70%-ный этиловый спирт в течение 1 минуты, после чего семена обрабатывали в основных стерилизующих растворах, концентрация и время экспозиции которых подбирались экспериментально и представлены в таблице 1. После основной стерилизации семена пятикратно промывали в стерильной дистиллированной воде, сажали в баночки с безгормональной питательной средой по прописи Мурасиге-Скуга и заматывали стерильной пленкой. Все манипуляции проводили в стерильных условиях ламинар-бокса (рисунок 2,3)[2, 3, 7, 9, 10].

Таблица 1 – Результаты режимов стерилизации семян *R. pseudoacacia* L.

№ режима стерилизации	Стерилизующий агент	Концентрация, %	Экспозиция, мин	Число стерильных жизнеспособных эксплантов, %
1	«Лизоформин 3000»	5	5	87,5
2			7	85,0
3			10	72,5
4	«Лизоформин 3000»	7	5	82,5
5			7	80,0
6			10	77,5
7	«Лизоформин 3000»	10	5	72,5
8			7	75,0
9			10	45,0
10	Перекись водорода ( $H_2O_2$ )	10	7	25,0
11			10	70,0
12			15	60,0
13	Перекись водорода ( $H_2O_2$ )	15	7	45,0
14			10	70,0
15			15	90,0
16	Серебро азотнокислое ( $AgNO_3$ )	0,1	7	90,0
17			10	70,0
18			15	85,0
19	Серебро азотнокислое ( $AgNO_3$ )	0,2	7	70,0
20			10	50,0
21			15	50,0
22	«Белизна»	20	5	80,0
23			7	80,0
24			10	65,0
25	«Белизна»	25	5	65,0
26			7	40,0
27			10	45,0

Баночки с семенами робинии культивировали на фитостеллаже при 16-ти часовом фотопериоде, освещенности 2-3 тыс. лк и температуре 22-24°C (рис.4). В течение эксперимента фиксировали процент стерильных и жизнеспособных семян, а также их энергию прорастания и всхожесть (ГОСТ 13056.6-97), в

результате чего выявляли наиболее эффективные режимы стерилизации (таблица 1 – 2). Приготовление и стерилизацию питательной среды проводили в соответствии со стандартными протоколами [2, 3, 7, 9, 10]. Полученные данные обрабатывали с использованием пакета программ Excel.

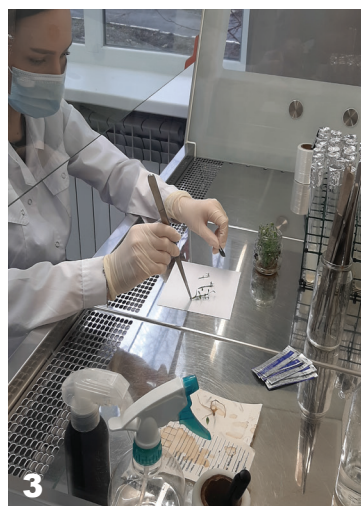


Рисунок 2, 3. Работа с растениями в стерильных условиях ламинар-бокса  
Рисунок 4. Культуральная комната лаборатории биотехнологий

**Результаты и обсуждение.** Для асептического культивирования в условиях *in vitro* семян *R. pseudoacacia* было применено и изучено 27 режи-

мов стерилизации. В результате анализа полученных данных (таблица 1 – 2, рисунок 5, 6) были выявлены наиболее эффективные.



Рисунок 5. Влияние разных концентраций «Лизоформина 3000» на развитие проростков *R. pseudoacacia* в условиях *in vitro* на 21-е сутки культивирования: а) 5%5 мин, 5%7 мин, 5%10 мин; б) 7%5 мин, 7%7 мин, 7%10 мин; в) 10%5 мин, 10%7 мин, 10%10 мин

По данным, представленным в таблице 1, можно сделать вывод об эффективности применения «Лизоформина 3000» в концентрациях 5-7% с экспозицией 5-7 минут, так как на данных режимах удалось получить от 80 до 87,5% стерильных жизнеспособных эксплантов.

Повышение экспозиции до 10 минут и концентрации до 10% значительно снижало жизнеспособность семян, так как альдегиды, входящие в состав данного стерилизующего агента, при высокой концентрации ингибируют



прорастание и дальнейшее развитие культивируемых эксплантов. Также наблюдалось изменение морфологии проростков (рисунок 1в). Использование раствора 15%-ной перекиси водорода в течение 15 минут позволяет получить 90% стерильных жизнеспособных семян. Применение раствора в меньших концентрациях было неэффективным, так как наблюдался высокий процент контаминации, что в свою очередь также ингибирует рост. Стерилизация 0,1%-ным раствором серебра азотнокислого ( $\text{AgNO}_3$ ) в течение 7 и 15 минут дает выход 85 и 90% стерильных жизнеспособных эксплантов соответственно. Увеличение концентрации раствора ( $\text{AgNO}_3$ ) до 0,2% существенно снижало жизнеспособность семян до 50%. Раствор 20%-ной «Белизны» с экспозицией 5-7 мин позволяет получить 80% стерильных и жизнеспособных эксплантов. Также повышение концентрации и экспозиции раствора «Белизны» угнетало процесс прорастания семян.

На рисунке 1 видно, что с увеличением концентрации стерилизующего агента «Лизоформин 3000» до 10% и экспозиции до 10 мин происходит ингибирование

развития проростков и нарушение их морфологии.

Исходя из результатов, приведенных в таблице 2, можно оценить влияние различных типов стерилизации на энергию прорастания и всхожесть семян *R. pseudoacacia* L. в культуре *in vitro*. Высокие показатели энергии прорастания (85,0%) и всхожести (90,0%) наблюдались при стерилизации 0,1%-ным раствором серебра азотнокислого в течение 7 минут (режим №16); 80,0% (энергия прорастания) и 90,0% (всхожесть) при обработке 15%-ной перекисью водорода в течение 15 минут (режим №15); 82,5% энергия и 87,5% всхожесть составили при обработке 5%-ным «Лизоформин 3000» 5 минут (режим №1); 65,0% энергия прорастания и 85,0% всхожесть при обработке 5%-ным «Лизоформин 3000» 7 минут (режим №2); также при стерилизации 0,1%-ным раствором серебра азотнокислого в течение 15 минут получили 75,0% энергии прорастания и 85,0% всхожести (режим №18). Повышение концентрации и экспозиции растворов «Лизоформин 3000», серебра азотнокислого, а также «Белизны» в основном снижало показатели всхожести и энергии прорастания.

Таблица 2 – Результаты влияния разных режимов стерилизации на показатели энергии прорастания и всхожести семян *R. pseudoacacia* L.

№ режима стерилизации	Стерилизующий агент	Концентрация, %	Экспозиция, мин	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
1	«Лизоформин 3000»	5	5	82,5	87,5
2			7	65,0	85,0
3			10	62,5	70,0
4	«Лизоформин 3000»	7	5	77,5	82,5
5			7	50,0	55,0
6			10	70,0	77,5
7	«Лизоформин 3000»	10	5	47,5	70,0
8			7	67,5	72,5
9			10	35,0	35,0
10	Перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	10	7	45,0	50,0
11			10	70,0	70,0
12			15	60,0	65,0
13	Перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	15	7	35,0	45,0
14			10	45,0	70,0
15			15	80,0	90,0
16	Серебро азотнокислое ( $\text{AgNO}_3$ )	0,1	7	85,0	90,0
17			10	60,0	70,0
18			15	75,0	85,0
19	Серебро азотнокислое ( $\text{AgNO}_3$ )	0,2	7	45,0	70,0
20			10	40,0	50,0
21			15	50,0	50,0
22	«Белизна»	20	5	72,5	77,5
23			7	45,0	45,0
24			10	50,0	55,0
25	«Белизна»	25	5	45,0	50,0
26			7	40,0	45,0
27			10	30,0	30,0

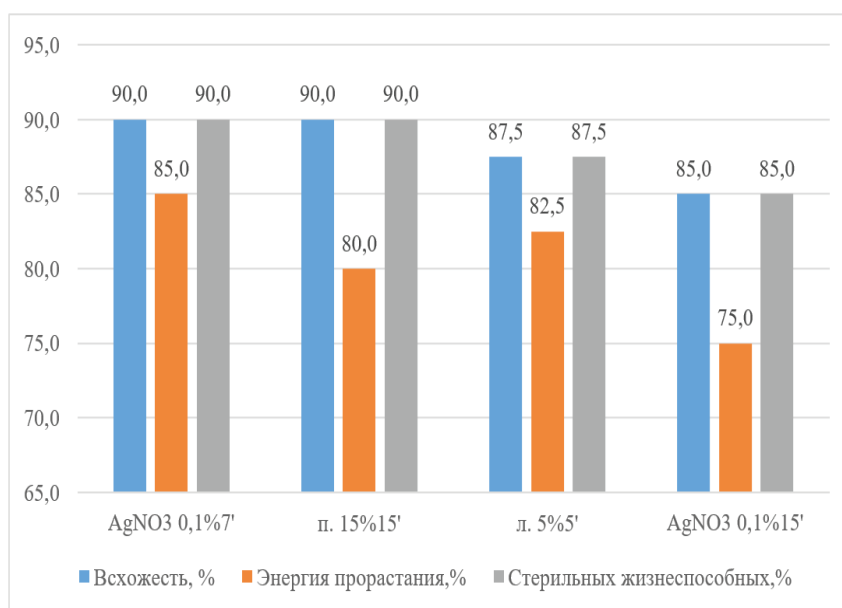


Рисунок 6 – Показатели наиболее эффективных режимов стерилизации семян *R. pseudoacacia* L.  
AgNO<sub>3</sub>\* – серебро азотнокислое;  
п.\* – перекись; л.\* – «Лизоформин 3000»

На рисунке 6 представлена гистограмма, на которой наглядно отражена зависимость показателей (числа стерильных жизнеспособных семян, их энергии прорастания и всхожести) от способа стерилизации.

**Заключение.** Таким образом в результате проведенного исследования было изучено 27 экспериментально подобранных режимов стерилизации и выявлено 5 наиболее эффективных и рекомендуемых при введении семян *R. pseudoacacia* в культуру *in vitro*: №1 (р-р лизоформина 5% 5 мин), №2 (р-р лизоформина 5% 7 мин), №15 (р-р перекиси водорода 15% 10 мин), №16 (р-р серебра азотнокислого 0,1% 7 мин), №18 (р-р серебра азотнокислого 0,1% 15 минут). На данных режимах наблюдался наиболее высокий процент каждого из анализируемых показателей. Таким образом, удалось получить до 85,0-90,0% стерильных жизнеспособных эксплантов из семян *R. pseudoacacia* в культуре *in vitro* с высокими процентами энергии прорастания (80,0-85,0%) и всхожести (85,0-90,0%).

#### Литература:

1. Бабошко О. И., Танюкевич В. В. Многофункциональная роль робиниевых защитных насаждений в степных ландшафтах // Научный журнал КубГАУ. №74(10). 2011.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учеб. пособие. / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1991. 160 с.

3. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука. 1964. 270 с.

4. ГОСТ 13056.6 -97 Семена деревьев и кустарников. Метод определения всхожести

5. Гуля Н.И., Маслова Е.В. Определение эффективного способа стерилизации растительных эксплантов редкого вида *Astragalus dasyanthus* Pall (fabaceae) во флоре белгородской области для введения его в культуру *in vitro* // Научные исследования: от теории к практике. 2015. Т.1. №4 (5) С. 17-19.

6. Седых С.А., Бабошко О.И. Использование робинии лжеакация в защитном лесоразведении Ростовской области // Международный студенческий научный вестник. 2015. № 2-3.

7. Тимофеева С.Н., Смолькина Ю.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Технологии микроразмножения *in vitro*: учеб.-метод. пособие. – Саратов, 2016. 38 с.

8. Шевченко Л. С., Авдеев В. И. Характеристика семян некоторых древесных видов-экзотов в условиях г. Оренбурга // Известия ОГАУ. 2007. №15-1.

9. Широков, А.И. Основы биотехнологии растений / А.И. Широков, Л.А. Крюков // Электронное учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. 49 с.

10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobaccotissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473-497.

DOI: 10.34736/FNC.2022.117.2.008.62-67

## Effective Methods of Sterilization of *Robinia Pseudoacacia* L. Seeds for Introduction Into Cultivation *In Vitro*

Tat'yana V. Tereshchenko ✉, junior researcher, tereshchenko@vfanc.ru, м.н.с., ORCID 0000-0001-9116-6062, Biotechnology Laboratory; Olga O. Zholobova, K.B.N., leader researcher, ORCID 0000-0002-1594-4181, head of the Biotechnology Laboratory – Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Centre of Agroecology, Complex Melioration and Protective Afforestation of the Russian Academy of Sciences» (FSC of Agroecology RAS), e-mail: info@vfanc.ru, 400062, Universitetskiy Prospekt, 97, Volgograd, Russia

*Robinia pseudoacacia* (*R. pseudoacacia* L.) is widely used in arid areas and belongs to soil-improving tree species. The cultivation of robinia genotypes from seeds under in vitro conditions is relevant when creating selective systems that allow artificially modeling environmental stress factors and accelerating the selection of the most resistant specimens to them. For introduction into culture in vitro, it is necessary to obtain aseptic material. To do this, various sterilizing agents are used. The article presents the results of a comparative evaluation of the effectiveness of the «Lysoformin 3000», silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and «Belizna» use for the sterilization of *R. pseudoacacia* L. seeds at the stage of introduction into culture in vitro. As a result of the experiment, 5 out of 27 applied sterilization modes were identified. The revealed modes showed the highest rates of sterile viable explants (from 85.0 to 90.0%), their germination (from 85.0 to 90.0%) and germination energy (from 80.0 to 85.0%). With an increase in the concentration of the Lysoformin 3000

solution and exposure, the viability, germination and germination energy of seeds significantly decreased, since the aldehydes that are part of this sterilizing agent inhibit the growth processes of cultivated explants in high concentrations. There was also a change in the morphology of the seedlings themselves. With increasing concentrations and exposure of sterilizing solutions of silver nitric acid ( $\text{AgNO}_3$ ) and «Belizna», lower indicators of viable seeds, their germination energy and germination due to the damaging effect of sterilizing substances were noted.

**Keywords:** robiniapseudoacacia, in vitro culture, sterilization of explants, sterilizing agents, microclonal reproduction

The study was carried out as part of the implementation of the research work plan of the FSC of agroecology of RAS «Improving the efficiency of microclonal reproduction of plants on artificial nutrient mediums under «in vitro» conditions with subsequent adaptation to growing conditions» № 0508-2019-00.

Received: 15.05.2022

Accepted: 03.06.2022

#### Translation of Russian References:

1. Baboshko O.I., Tanyukevich V.V. *Mnogofunkcional'naya rol' robinievyyh zashchitnyh nasazhdenij v stepnyh landshaftah* [Multifunctional role of robinium protective plantings in steppe landscapes]. *Nauchnyj zhurnal KubGAU* [Scientific Journal of KubSAU]. Novocherkassk. №74(10). 2011.

2. Butenko R.G. *Biologiya kletok vysshih rastenij in vitro i biotekhnologii na ih osnove* [Biology of higher plant cells in vitro and biotechnology based on them]: Textbook. Moscow. FBK-PRESS Publ. house. 1991. 160 p.

3. Butenko R.G. *Kul'tura izolirovannyh tkanej i fiziologiya morfogeneza rastenij* [Culture of isolated tissues and physiology of plant morphogenesis]. Moscow. «Nauka». Publ. house. 1964. 270 p.

4. GOST 13056.6-97 Seeds of trees and shrubs. Germination determination method.

5. Gulya N.I., Maslova E.V. *Opreделение эффективного способа стерилизации растительных эксплантов редкого вида Astragalus dasyanthus Pall (fabaceae) во флоре Белгородской области для введения его в культуру in vitro* [Determination of an effective method of the rare species *Astragalus dasyanthus* Pall (fabaceae) plant explants sterilization in the flora of the Belgorod region for its introduction into culture in vitro] *Nauchnye issledovaniya: ot teorii k praktike*

[Scientific research: from theory to practice]. 2015. Tome 1. №4(5). pp. 17-19.

6. Sedyh S.A., Baboshko O.I. *Ispol'zovanie robinii lzheakacii v zashchitnom lesorazvedenii Rostovskoj oblasti* [The use of *Robinia pseudoacacia* in protective afforestation of the Rostov region] *Mezhdunarodnyj studencheskij nauchnyj vestnik* [International Student Scientific Bulletin]. 2015. №2-3.

7. Timofeeva S.N., Smol'kina Yu.V., Apanasova N.V., Yudakova O.I. *Tekhnologii mikrorazmnozheniya in vitro* [Technologies of micro-reproduction in vitro]: educational and methodical manual. Saratov. 2016. 38 p.

8. Shevchenko L.S., Avdeev V.I. *Harakteristika semyan nekotoryh drevesnyh vidov-ekzotov v usloviyah g. Orenburga* [Characteristics of seeds of some tree species-exotics in the conditions of Orenburg]. *Izvestiya OGAU* [Proceedings of OSAU]. 2007. №15-1.

9. Shirokov A.I., Kryukov L.A. *Ocnovy biotekhnologii rastenij* [Fundamentals of plant biotechnology]. *Elektronnoe uchebno-metodicheskoe posobie* [Electronic educational and methodical manual]. *Nizhnij Novgorod: Nizhnij Novgorod State University*. Publ. house. 2012. 49 p.

10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobaccotissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15. pp. 473-497.

**Цитирование.** Терещенко Т.В., Жолобова О.О. Эффективные способы стерилизации семян *Robinia pseudoacacia* L. для введения в культуру in vitro // Научно-агрономический журнал. 2022. №2(117). С. 62-67. DOI: 10.34736/FNC.2022.117.2.008.62-67

**Авторский вклад.** Все авторы настоящего исследования принимали непосредственное участие в планировании, выполнении и анализе данного исследования, ознакомились и одобрили представленный окончательный вариант.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Citation.** Tereshchenko T.V., Zholobova O.O. Effective Methods of Sterilization of *Robinia Pseudoacacia* L. Seeds for Introduction Into Cultivation in Vitro. *Scientific Agronomy Journal*. 2022. 2(117). pp. 62-67. DOI: 10.34736/FNC.2022.117.2.008.62-67

**Author's contribution.** All authors of this research paper have directly participated in the planning, execution, or analysis of this study. All authors of this paper have read and approved the final version submitted.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.