

УДК 631.526

4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений

# **СНИЖЕНИЕ КОНТАМИНАЦИИ ПЕРВИЧНЫХ ЭКСПЛАНТОВ ПРИ МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ ДИФФЕНБАХИИ ПЯТНИСТОЙ**

Александрова Анастасия Алексеевна  
Аспирант кафедры молекулярной селекции, клеточных технологий и семеноводства  
SPIN-code=8042-3221  
ORCID= 0009-0008-88026454  
ResearchID= LGY-2617-2024  
E-mail: [a.alexandrova@rgau-msha.ru](mailto:a.alexandrova@rgau-msha.ru)  
*ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49*

Цыпленкова Светлана Сергеевна  
Студент кафедры молекулярной селекции, клеточных технологий и семеноводства  
E-mail: [sv.tsypchenkova@yandex.ru](mailto:sv.tsypchenkova@yandex.ru)  
*ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49*

Эйдлин Яков Тарасович  
канд. с.-х. наук,  
ORCID= 0000-0003-0657-8797,  
РИНЦ SPIN-код =7774-7058,  
РИНЦ AuthorID =1118086, ассистент кафедры молекулярной селекции, клеточных технологий и семеноводства  
*ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49*

Осминина Екатерина Васильевна  
канд. с.-х. наук, Научный сотрудник Проектного центра агротехнологий  
РИНЦ AuthorID=1137230, ORCID=0000-0003-0603-6293,  
E-mail: [E.osminina@skoltech.ru](mailto:E.osminina@skoltech.ru)  
*Сколковский институт науки и технологий (125480, Российская Федерация, г. Москва, ул. Героев Панфиловцев, 22)*

Вишнякова Анастасия Васильевна  
канд. с.-х. наук, доцент кафедры молекулярной селекции, клеточных технологий и семеноводства  
ScopusID =57302370100, ResearcherID =AAX-8791-2021, ORCID =0000-0002-9160-1164, РИНЦ SPIN-код= 7025-5592, РИНЦ AuthorID= 795854  
E-mail: [a.vishnyakova@rgau-msha.ru](mailto:a.vishnyakova@rgau-msha.ru)

631.526

4.1.2 Plant breeding, seed production and biotechnology

# **REDUCTION OF CONTAMINATION OF PRIMARY EXPLANTS DURING MICROCLONAL PROPAGATION OF DIEFFENBACHIA SEGUINE**

Alexandrova Anastasia Alekseevna  
postgraduate student of Department of Molecular Breeding, Cell Technologies, and Seed Production  
RSCI SPIN-code=8042-3221  
ORCID= 0009-0008-88026454  
ResearchID= LGY-2617-2024  
E-mail: [a.alexandrova@rgau-msha.ru](mailto:a.alexandrova@rgau-msha.ru)  
*Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49, Timiryazevskaya, Moscow, 127550, Russia*

Tsyplenkova Svetlana Sergeevna  
Student of Department of Molecular Breeding, Cell Technologies, and Seed Production  
E-mail: [sv.tsypchenkova@yandex.ru](mailto:sv.tsypchenkova@yandex.ru)  
*Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49, Timiryazevskaya, Moscow, 127550, Russia*

Eidlin Yakov Tarasovich  
Cand.Agr.Sci.  
ORCID= 0000-0003-0657-8797,  
RSCI SPIN-code =7774-7058,  
RSCI AuthorID =1118086  
E-mail: [ya.eidlin@rgau-msha.ru](mailto:ya.eidlin@rgau-msha.ru)  
*Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49, Timiryazevskaya, Moscow, 127550, Russia*

Osminina Ekaterina Vasilevna  
Cand.Agr.Sci., Researcher at the Project Center for Agrotechnologies  
RSCI AuthorID=1137230, ORCID=0000-0003-0603-6293  
E-mail: [E.osminina@skoltech.ru](mailto:E.osminina@skoltech.ru)  
*Skolkovo Institute of Science and Technology (Skoltech), 22, Geroev Panfilovtsev, Moscow, 125480, Russia*

Vishnyakova Anastasia Vasilevna  
Cand.Agr.Sci., Associate Professor of Department of Molecular Breeding, Cell Technologies, and Seed Production  
ScopusID =57302370100, ResearcherID =AAX-8791-2021, ORCID =0000-0002-9160-1164, RSCI SPIN-code= 7025-5592, RSCI AuthorID= 795854

ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А.  
Тимирязева Адрес (127550, Российская  
Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская,  
49)

E-mail: a.vishnyakova@rgau-msha.ru  
Russian State Agrarian University –  
Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49,  
Timiryazevskaya, Moscow, 127550, Russia

Диффенбахия пятнистая очень ценится в комнатном за декоративность листьев, а также легкость при выращивании и благоприятное воздействие на воздух в помещении. Размножение диффенбахии черенкованием и отводками не позволяет получить высокий коэффициент размножения, при этом бактериальные и грибные инфекции передаются от маточных растений новым растениям. При микроклональном черенковании коэффициент размножения диффенбахии намного выше, чем при классическом черенковании. Так же размножение в условиях *in vitro* позволяет получить оздоровленный от грибных и бактериальных инфекций посадочный материал. В данном исследовании изучено влияние различных концентраций (2, 3,5, 5 %) гипохлорита натрия в нескольких экспозициях (5, 10, 15 минут), а также влияние предобработки 70 % этанолом и 1 % дезинфицирующим веществом «Биоцид-С» в течение 1 минуты на снижение контаминации эксплантов диффенбахии пятнистой при введении в культуру *in vitro*. Изучено влияние «Биоцида-С» при добавлении в питательную среду в концентрации 1 мл/л и 2 мл/л. Установлено, что сочетание предобработки эксплантов 1 % «Биоцид-С» в течение 1 минуты и поверхностной стерилизации 3,5 % гипохлоритом натрия с экспозицией 15 минут снижает степень контаминации на 75 % с сохранением их жизнеспособности

The variegated Dieffenbachia is highly valued as a houseplant for its decorative leaves, ease of cultivation, and positive effects on indoor air quality. Propagation by cuttings and offsets does not provide a high multiplication coefficient, and bacterial and fungal infections can be transmitted from the mother plants to new plants. Microclonal propagation, on the other hand, offers a much higher multiplication rate and allows for obtaining planting material that is free from fungal and bacterial infections. This study examined the influence of various concentrations (2%, 3.5%, 5%) of sodium hypochlorite (NaClO) with different exposure durations (5, 10, 15 minutes), as well as the effects of pre-treatments with 70% ethanol and the disinfectant "Biodicid-C" for 1 minute on reducing contamination of Dieffenbachia explants during *in vitro* culture. The impact of "Biodicid-C" added to the nutrient medium at concentrations of 1 ml/l and 2 ml/l was also studied. It was found that a combination of pre-treatment of explants with 1% "Biodicid-C" for 1 minute and surface sterilization with 3.5% sodium hypochlorite for 15 minutes reduces contamination levels by 75%, while maintaining their viability

Ключевые слова: ДИФФЕНБАХИЯ  
ПЯТНИСТАЯ, КУЛЬТУРА IN VITRO,  
DIEFFENBACHIA SEGUINE SCHOTT,  
МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ,  
КОНТАМИНАЦИЯ

Keywords: DIEFFENBACHIA PICTA, IN VITRO  
CULTURE, DIEFFENBACHIA SEGUINE  
SCHOTT, MICROCLONAL PROPAGATION,  
CONTAMINATION

<http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-214-002>

## Введение

Диффенбахия (*Dieffenbachia*) – декоративное многолетнее растение, родом из тропической Америки, относящееся к семейству Ароидных (*Araceae*). Оно ценится за эффектную вариегатную листву, устойчивость к условиям интерьера и легкость в выращивании [7]. Кроме того, Диффенбахия обладает способностью удалять летучие органические соединения из воздуха, тем самым улучшая его качество [2].

<http://ej.kubagro.ru/2025/10/pdf/02.pdf>

Культивирование диффенбахии как комнатного растения началось с 1864 г., однако, несмотря на столь долгую историю, она и сегодня остается одной из самых востребованных декоративных культур, стабильно входя в пятерку лидеров по объему продаж [7].

Размножение диффенбахии осуществляют укоренением стеблевых черенков и воздушными отводками, что обеспечивает невысокий коэффициент размножения и нередко сопровождаются передачей потомству грибных, бактериальных или вирусных заболеваний. В связи с этим все чаще используют микроклональное размножение в условиях *in vitro*, позволяющий за относительно короткое время получать большое количество оздоровленного и генетически однородного посадочного материала [1]. Кроме того, растения, полученные методом микроклонального размножения, как правило, достигают товарных размеров значительно раньше по сравнению с растениями, размноженными традиционными вегетативными способами [4].

Серьёзным препятствием микроклонального размножения диффенбахии является высокая степень загрязнения исходного материала микроорганизмами – уровень заражённости может достигать 80%, многие виды инфицированы эндогенными бактериями [3]. Постоянное многолетнее черенкование старых маточных растений Диффенбахии приводит к накоплению системных инфекций [6], о чем сообщает ряд исследователей [5, 7] и отмечает важность подбора оптимальных условий стерилизации (концентрацию стерилизующего агента и время его воздействия) эксплантов для эффективного подавления контаминации без повреждения тканей.

Цель представленной работы – исследование эффективности различных методов поверхностной стерилизации эксплантов Диффенбахии на этапе введения в культуру *in vitro* для контроля контаминации эксплантов.

## Материалы и методы

В качестве материала для исследований были использованы растения Диффенбахии пятнистой (*Dieffenbachia seguine*). Маточные растения содержали в условиях климатической комнаты при температуре +22°C и фотопериоде 18 часов – день, 6 часов – ночь. Растения выращивали в специализированном грунте для Ароидных (*Araceae*) на основе смеси верхового и низинного торфов, агроперлита, речного песка и известняковой муки, с содержанием азота, фосфора и калия не менее 250 мг/л. Полив производили по мере просыхания грунта, не реже одного раза в неделю. Корневые подкормки комплексным органоминеральным удобрением (Добрая Сила, Россия) проводили с интервалом 14 дней.

В качестве эксплантов использовали боковые почки. Стебли растений тщательно промывали несколько минут под проточной водой с использованием мыла, после промывания вырезали экспланты и проводили поверхностную стерилизацию 2 % гипохлоритом натрия (NaOCl) в течение 10 минут с добавлением 2-х капель Tween-20. После следовала трехкратная промывка эксплантов в стерильной воде в течение 1, 5 и 10 минут. Перед пересадкой на питательную среду обновляли срез. Экспланты по одной почке размещали в стеклянные пробирки и закрывали фольгированной крышкой дополнительно обматывая эластичной пленкой.

В качестве питательной среды использовали среду Мурасиге-Скуга (MS), дополненную сахарозой и агар-агаром в концентрациях 30 г/л и 7 г/л соответственно, для стимуляции пролиферации побегов среду дополняли 1,5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) и 0,1 мг/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК). Показатель pH среды доводили до  $5,7 \pm 0,01$ , добавляли агар-агар, нагревали при постоянном помешивании до растворения агар-агара, после чего разливали по стеклянным пробиркам диаметром 30 мм и автоклавировали 15 минут при 120°C.

Культивировали экспланты в климатической комнате при температуре  $+22\pm 2^{\circ}\text{C}$  и 18 часовом фотопериоде. Пересадку на свежую питательную среду проводили каждые 14 дней. Укоренение побегов происходило на той же питательной среде, что и регенерация побегов. Укоренённые побеги извлекали из культурального сосуда, тщательно промывали от остатков питательной среды под водопроводной водой. Растения высаживали в контейнеры объёмом 500 мл, заполненные наполовину грунтом (верховой торф – 60%, переходный торф – 35%, вермикулит – 5%, азот/фосфор/калий не менее 170/180/250 мг/л) и закрывали крышкой, через неделю постепенно начинали приоткрывали крышку.

Для снижения степени контаминации изучали различные варианты стерилизации (Рисунок 1). Изучали влияние 2, 3,5, 5 % концентраций NaOCl с экспозициями 5, 10 и 15 минут (Рисунок 1 схема А). Так же изучали влияние предобработки 70 % этанолом и дезинфицирующим веществом «Биоцид-С» (СОФЭКС-Силикон), с экспозицией 1 минута. Предобработку проводили перед поверхностной стерилизацией, срезанные почки погружали в 70 % этанол (Рисунок 1 схема Б) или в 1 % Биоцид-С (Рисунок 1 схема В) на 1 минуту, далее отмывали от стерилизующих веществ и проводили основную поверхностную стерилизацию NaOCl в концентрациях 2, 3,5, 5 % в течении 5, 10 и 15 минут. В качестве контрольного варианта использовали вариант стерилизации 2 % гипохлоритом натрия (NaOCl) в течение 10 минут без предобработок стерилизующими веществами.

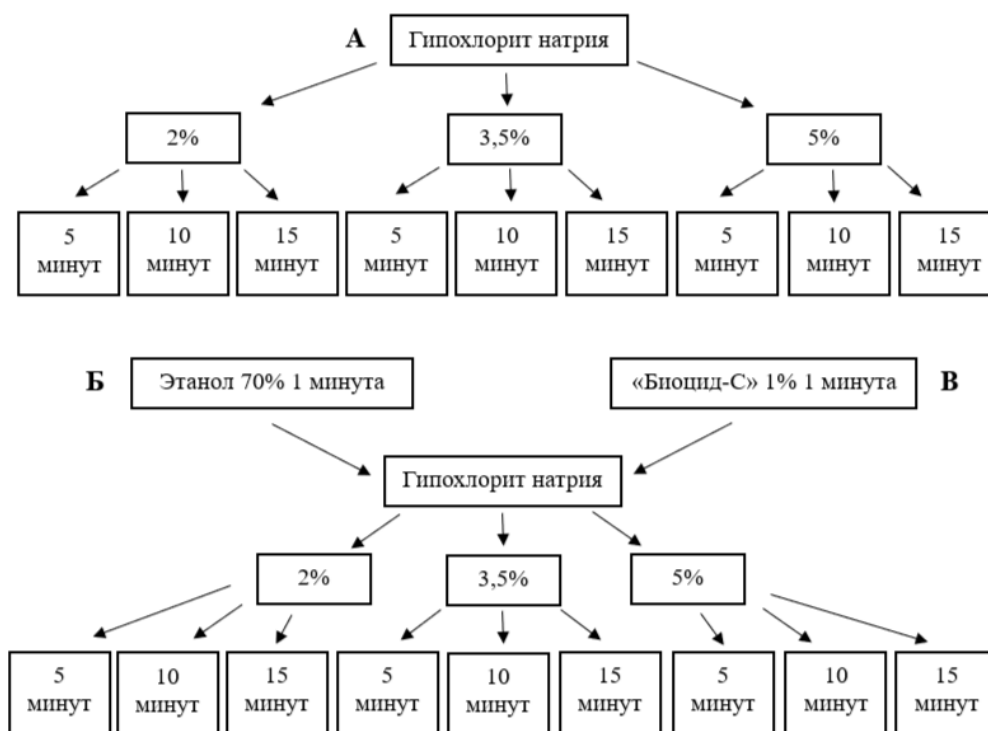


Рисунок 1. Схема опытов по изучению факторов, снижающих степень контаминации эксплантов дифференциации

Кроме того, изучали влияние «Биоцида-С» на снижение контаминации эксплантов при добавлении в среду для культивирования. После автоклавирования питательную среду охлаждали до 60°C, в условиях ламинарного бокса добавляли стерилизованный фильтрацией (0,22 мкм) 100% «Биоцид-С» в концентрации 1 мл/л и 2 мл/л. Поверхностную стерилизацию в данном эксперименте проводили 2 % гипохлоритом натрия с добавлением Tween-20 в течение 10 минут. В качестве контроля использовали питательную среду без добавления «Биоцида-С».

Все эксперименты были заложены в не менее, чем 5-ти кратной повторности. Статистический анализ данных проводили при помощи критерия Манна-Уитни на 5%-ном уровне значимости ( $P < 0,05$ ) с использованием программного пакета R Studio.

## Результаты

После введения в культуру через 1-2 недели производили учеты количества эксплантов с контаминацией и некротизированных эксплантов. Степень контаминации рассчитывали, как отношение числа эксплантов контаминированных к общему числу введенных в культуру. Степень некротизации рассчитывали как отношение некротизированных эксплантов к общему числу введенных в культуру. Наблюдали появление грибной и бактериальной инфекции.

В таблице 1 показано влияние различных концентраций и экспозиций гипохлорита натрия на снижение контаминации эксплантов.

Таблица 1. Влияние повышения концентрации и экспозиции гипохлорита натрия на степень контаминации эксплантов дифференциации

| Стерилизующее вещ-во                           | Гипохлорит натрия 2% |              |             | Гипохлорит натрия 3,5 % |             |             | Гипохлорит натрия 5 % |             |             |
|--|----------------------|--------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------|-----------------------|-------------|-------------|
|  | 5                    | 10           | 15          | 5                       | 10          | 15          | 5                     | 10          | 15          |
| Экспозиция, мин                                | 5                    | 10           | 15          | 5                       | 10          | 15          | 5                     | 10          | 15          |
| Кол-во введенных в культуру эксплантов, шт (%) | 12                   | 12           | 13          | 5                       | 5           | 5           | 10                    | 10          | 10          |
| Кол-во контаминированных эксплантов, шт. (%)   | 12 a<br>(100)        | 11 a<br>(92) | 8 a<br>(62) | 5 a<br>(100)            | 4 a<br>(80) | 4 a<br>(80) | 5 b<br>(50)           | 5 b<br>(50) | 4 b<br>(40) |
| Кол-во некротизированных эксплантов, шт (%)    | 0                    | 0            | 1<br>(8)    | 0                       | 0           | 0           | 0                     | 0           | 3<br>(30)   |

*Примечание - Значения в строке, отмеченные одинаковыми строчными буквами (a, b), согласно U-критерию Манна-Уитни не имеют существенного различия на 5 %-ном уровне значимости ( $P \leq 0.05$ )*

При стерилизации 2 % гипохлоритом натрия в течение 5 минут и 3,5 % гипохлоритом натрия в течение 5 минут контаминация составила 100 %. Самую низкую степень контаминации наблюдали при стерилизации 5 % гипохлоритом натрия с экспозицией 15 минут (40 %), однако степень некротизации эксплантов в данном варианте обработки является самой высокой и составляет 30 %. Несмотря на почти полное отсутствие некротизированных эксплантов, степень контаминации при обработке 2 % и 3,5 % гипохлоритом натрия с экспозицией 10 и 15 минут оказалось достаточно высокой (62-92 %). Существенное влияние на снижение



контаминации эксплантов наблюдалось при обработке 5 % гипохлоритом натрия в течение 5 и 10 минут, в этих вариантах опыта степень контаминации снизилась на 42 % по сравнению с контрольным вариантом, а некротизированные экспланты отсутствовали.

В таблице 2 показано влияние предобработки 70 % этанолом с последующей поверхностной стерилизацией гипохлоритом натрия на степень контаминации эксплантов. В качестве контрольного варианта использовали поверхностную стерилизацию 2 % гипохлоритом натрия в течение 10 минут.

Таблица 2. Влияние предобработки 70 % этанолом на степень контаминации эксплантов Диффенбахии

| Вариант опыта                                   | Этанол 70 %, 1 мин    |             |             |                       |             |             |                       |             |             | Контроль              |
|---|-----------------------|-------------|-------------|-----------------------|-------------|-------------|-----------------------|-------------|-------------|-----------------------|
|   | Гипохлорит натрия 2 % |             |             | Гипохлорит натрия 2 % |             |             | Гипохлорит натрия 5 % |             |             | Гипохлорит натрия 2 % |
| Экспозиция, мин                                 | 5                     | 10          | 15          | 5                     | 10          | 15          | 5                     | 10          | 15          | 10                    |
| Кол-во введенных в культуру эксплантов, шт. (%) | 6                     | 5           | 5           | 6                     | 6           | 6           | 7                     | 7           | 7           | 12                    |
| Кол-во контаминированных эксплантов, шт. (%)    | 3 a<br>(50)           | 2 b<br>(40) | 3 a<br>(60) | 2 b<br>(33)           | 2 b<br>(33) | 1 b<br>(17) | 3 b<br>(43)           | 2 b<br>(29) | 4 b<br>(57) | 11 a<br>(92)          |
| Кол-во некротизированных эксплантов, шт. (%)    | 0                     | 0           | 0           | 0                     | 4<br>(67)   | 5<br>(83)   | 0                     | 4<br>(57)   | 1<br>(14)   | 0                     |

*Примечание - Значения в строке, отмеченные одинаковыми строчными буквами (a, b), согласно U-критерию Манна-Уитни не имеют существенного различия на 5 %-ном уровне значимости ( $P \leq 0.05$ )*

Отмечали существенные различия между контрольным вариантом опыта и вариантом с сочетанием предобработки 70 % этанолом и стерилизацией 2 % гипохлоритом натрия с экспозицией 10 минут, а также 3,5 % и 5 % гипохлоритом натрия во всех экспозициях. Самую низкую степень контаминации (17 %) наблюдали при обработке 3,5 % гипохлоритом натрия в течение 15 минут, однако при данной стерилизации



эксплантов зафиксировали очень высокую степень некротизации (83 %) (Рисунок 1). Аналогичную ситуацию наблюдали при обработке 3,5 % гипохлоритом натрия в течение 10 минут (Рисунок 1). Обработка в течение одной минуты 70 % этанолом и 5 минут 3,5 % гипохлоритом натрия оказалась наиболее эффективной, степень контаминации при данной обработке составила 33%, а некротизированные экспланты отсутствовали.

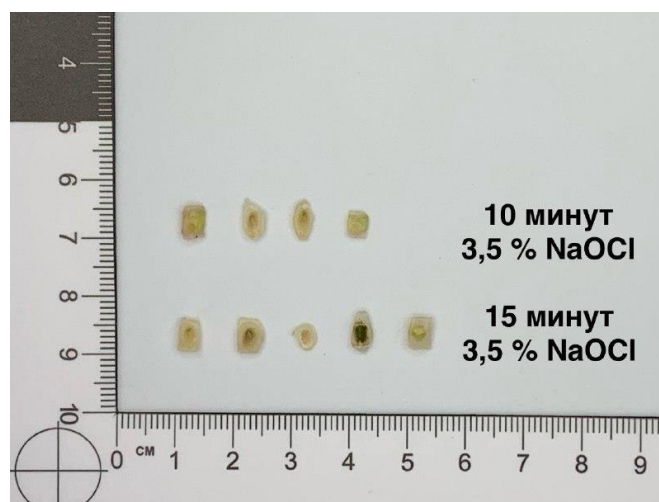


Рисунок 1. Некротизированные экспланты диффенбахии после предобработки 70 % этанолом с экспозицией 1 мин. и последующей стерилизацией 3,5 % гипохлоритом натрия в течение 10 и 15 минут

В таблице 3 представлены результаты предобработки 1% «Биоцид-С» с последующей поверхностной стерилизацией гипохлоритом натрия на уровень контаминации эксплантов.

Таблица 3. Влияние предобработки 1 % «Биоцидом-С» на степень контаминации эксплантов Диффенбахии

| Вариант опыта                                  | «Биоцид-С» 1 %, 1 мин |              |             |                         |           |           |                       |             |            | Контроль              |
|--|-----------------------|--------------|-------------|-------------------------|-----------|-----------|-----------------------|-------------|------------|-----------------------|
|  | Гипохлорит натрия 2 % |              |             | Гипохлорит натрия 3,5 % |           |           | Гипохлорит натрия 5 % |             |            | Гипохлорит натрия 2 % |
| Экспозиция, мин                                | 5                     | 10           | 15          | 5                       | 10        | 15        | 5                     | 10          | 15         | 10                    |
| Кол-во введенных в культуру эксплантов, шт (%) | 6                     | 12           | 7           | 6                       | 6         | 6         | 6                     | 6           | 6          | 12                    |
| Кол-во контаминированных эксплантов, шт. (%)   | 4<br>(67)             | 11 a<br>(92) | 2 b<br>(29) | 3<br>(50)               | 2<br>(33) | 1<br>(17) | 2 b<br>(33)           | 3 a<br>(50) | 0 b<br>(0) | 11 a<br>(92)          |
| Кол-во некротизированных эксплантов, шт (%)    | 0                     | 0            | 0           | 0                       | 1<br>(17) | 0         | 1<br>(17)             | 3<br>(50)   | 5<br>(83)  | 0                     |

*Примечание - Значения в строке, отмеченные одинаковыми строчными буквами (a, b), согласно U-критерию Манна-Уитни не имеют существенного различия на 5 %-ном уровне значимости ( $P \leq 0.05$ )*

По сравнению с контрольным вариантом опыта наблюдали достоверно низкую степень контаминации при предобработке эксплантов 1 % «Биоцид-С» и последующей поверхностной стерилизацией 2 % NaOCl с экспозициями 10 и 15 минут, а также в концентрации 5 % с экспозицией 5 и 15 минут. При сочетании предобработки 1 % «Биоцид-С» и поверхностной стерилизацией 2 % NaOCl с экспозициями 10 и 15 минут отмечали низкую степень некротизации. В вариантах опыта предобработки 1 % «Биоцид-С» и стерилизацией 5 % гипохлорит натрия 10 и 15 минут, степень некротизации составила 50 % и 83 % соответственно. Самую высокую степень контаминации наблюдали в варианте опыта с предобработкой 1 % «Биоцид-С» в течение 1 минуты и поверхностной стерилизацией 2 % гипохлоритом натрия в течение 10 минут (Рисунок 2). Наиболее эффективным вариантом стерилизации стала обработка 1 минута 1% «Биоцид-С» и 15 минут 3,5% гипохлорит натрия, контаминация по сравнению с контрольным вариантом опыта снизилась на 75 % (с 92 % до 17 %). Вторым по эффективности стал вариант обработки 1 минута 1%

«Биоцид-С» и 15 минут 2 % гипохлорит натрия, в нём контаминация составила 29 %, что на 63 % ниже контроля.

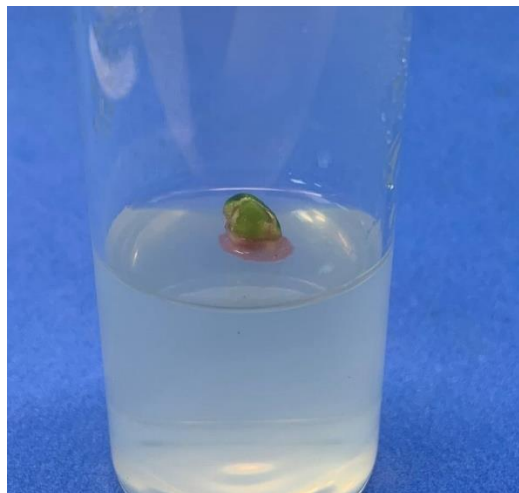


Рисунок 2. Бактериальная контаминация экспланта при обработке 2% гипохлоритом натрия в течение 10 минут с предобработкой 1% «Биоцид-С» в течение 1 минуты

В таблице 4 представлены результаты эксперимента по добавлению 100 % «Биоцид-С» в питательную среду с обработкой эксплантов 2 % гипохлоритом натрия в течение 10 минут на их контаминацию и сравнение этих результатов с обработкой 1 минута 1 % «Биоцид-С» + 10 минут 2 % гипохлорит натрия (контроль).

Таблица 4. Влияние добавления 100 % «Биоцида-С» в питательную среду совместно с поверхностной стерилизацией 2 % гипохлоритом натрия в течение 10 минут на степень контаминации эксплантов Диффенбахии

| Вариант опыта                                  | Среда без «Биоцида-С» (Контроль) | Концентрация «Биоцида-С» в питательной среде, мл/л |             |
|--|----------------------------------|--|-------------|
|  |                                  | 1  | 2           |
| Кол-во введенных в культуру эксплантов, шт (%) | 11                               | 5  | 6           |
| Кол-во контаминированных эксплантов, шт. (%)   | 5 а<br>(45)                      | 4 а<br>(80)  | 1 а<br>(17) |
| Кол-во некротизированных эксплантов, шт (%)    | 1<br>(9)                         | 1<br>(20)  | 5<br>(83)   |

*Примечание - Значения в строке, отмеченные одинаковыми строчными буквами (a, b), согласно U-критерию Манна-Уитни не имеют существенного различия на 5 %-ном уровне значимости ( $P \leq 0.05$ )*

При добавлении 1 мл/л «Биоцид-С» в питательную среду и обработке 10 минут 2 % гипохлорит натрия степень контаминации была выше контрольного варианта на 35 % (Рисунок 3), процент некротизированных эксплантов также оказался выше контроля. С повышением концентрации «Биоцида-С» до 2 мл/л контаминация снизилась до 17 % (что на 28 % ниже контрольного варианта), однако экспланты, которые не подверглись контаминации, оказались некротизированы. Статистически достоверных различий между опытными вариантами и контрольным вариантом не обнаружено.

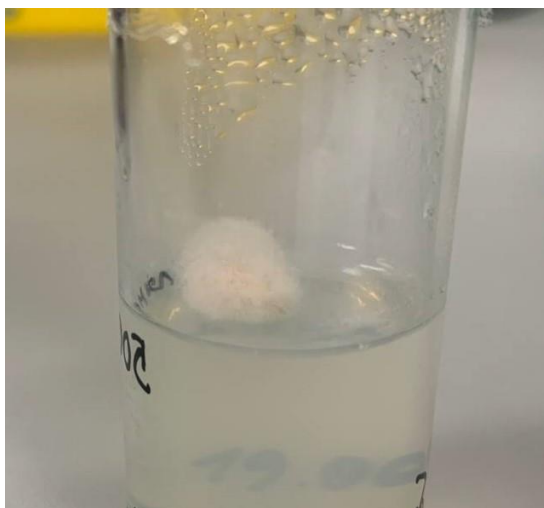


Рисунок 3. Эксплант диффенбахии, поврежденный грибной инфекцией, в опыте с добавлением 1 мл/л «Биоцида-С» в питательную среду

Жизнеспособные экспланты продолжали культивировать на питательной среде для пролиферации побегов, полученные в результате побеги укореняли на этой же питательной среде, а после укоренения растения адаптировали к условиям внешней среды.



Рисунок 4. Стадии развития Диффенбахии *in vitro*: А – экспланты (почки) спустя 3 недели после введения в культуру, Б – сформировавшиеся побеги, В – укоренённый побег

### Обсуждения

Наиболее часто используемыми веществами для стерилизации эксплантов Диффенбахии являются хлорид ртути ( $\text{HgCl}_2$ ) и водные растворы соединений на основе хлора (гипохлорит натрия ( $\text{NaOCl}$ ) и кальция ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ), целый ряд авторов проводят поверхностную стерилизацию с использованием этих веществ [1, 6, 8, 10]. Так, Sierra в своем исследовании использовал поверхностную стерилизацию 2% гипохлоритом кальция в течение 15, 20 и 25 минут, уровень контаминации спустя 7 дней составил 40, 30, 30 % соответственно [9]. Xiuli Shen и другие в своем исследовании использовали стерилизацию 1,2 % гипохлоритом натрия в течение 10 минут на шейкере, чего было достаточно для получения необходимого количества асептической культуры [8]. В ходе нашего исследования использование только гипохлорита натрия в концентрациях 2, 3,5 и 5 % и экспозициях 5, 10 и 15 минут привело в среднем к контаминации 50 % эксплантов. Обработка в течение 15 минут 5% гипохлоритом натрия показала наилучший результат по снижению

контаминации, однако наряду с этим наблюдалась достаточно высокая смертность эксплантов.

Некоторые исследователи для получения низких значений степени контаминации проводят двуступенчатую поверхностную стерилизацию с предобработкой 70% этанолом: например, El-Mahrouk проводил предобработку 70% этанолом в течение 2-х минут [6], а Hassan в течение 30 секунд [1]. В своем исследовании мы также проводили стерилизацию гипохлоритом натрия вместе с предобработкой 70% этанолом. Благодаря предобработке этанолом средний процент контаминации снизился на 33% по сравнению с обработкой только гипохлоритом натрия. Стерилизация 70% этанолом в течение 1 минуты, а затем 3,5% гипохлоритом натрия в течение 15 минут позволила достичь наименьшей контаминации, однако стерильные экспланты оказались нежизнеспособны, поэтому наиболее оптимальной была стерилизация 3,5% гипохлоритом натрия в течение 5 минут с предобработкой 70% этанолом в течение 1 минуты.

Помимо стерилизации гипохлоритом натрия с предобработкой 70% этанолом мы также проводили стерилизацию гипохлоритом натрия с предобработкой 1% «Биоцидом-С». При сочетании предобработки с поверхностной стерилизацией 15 минут 5% гипохлоритом натрия удалось достигнуть отсутствия контаминации, но степень некротизации составила 83 %. Оптимальным вариантом в опыте с предобработкой 1% «Биоцидом-С» стало сочетание с поверхностной стерилизацией 3,5 % NaOCl в течение 15 минут. Степень контаминации снизилась на 75 %, а некротизированных эксплантов не наблюдали. Добавление «Биоцид-С» в питательную среду в концентрации 1 мл/л оказалось неэффективно из-за высокого уровня контаминации (80%), а при увеличении концентрации до 2 мл/л одновременно с уменьшением процента контаминации до 17% происходило увеличение смертности эксплантов до 83%.

## Выводы

В ходе исследований по снижению контаминации у эксплантов диффенбахии пятнистой изучили влияние гипохлорита натрия в различных концентрациях и экспозициях, а также сочетание влияние предобработок эксплантов 70 % этанолом и 1 % «Биоцид-С» в течение 1 минуты на снижение контаминации эксплантов при введении в культуру *in vitro*.

Было установлено, что одноступенчатая поверхностная стерилизация гипохлоритом натрия неэффективна для решения проблемы с контаминацией эксплантов диффенбахии. Как оптимальный протокол для введения в культуру *in vitro* трудностерилизуемых эксплантов диффенбахии пятнистой рекомендован комбинированный метод, включающий предобработку 1% «Биоцид-С» (1 мин) с последующей поверхностной стерилизацией 3,5% NaOCl (15 мин), так как он обеспечивает высокий противомикробный эффект без потери жизнеспособности культуры.

## Список литературы

1. Abdallah, S. A. S., Hassan, H. M. S. In vitro micro-propagation of cordyline and dieffenbachia plants / S. A. S. Abdallah, H. M. S. Hassan // Hortscience Journal of Suez Canal University. – 2015. – V. 4. – № 1. – P. 17-24.
2. Banerjee, A. et al. Diseases of Dieffenbachia spp. Caused Fungi, Bacteria, Viruses and Nematodes: A Review / A. Banerjee, M. Katakam, B. Panja, J. Saha, P. S. Nath // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2017. – V. 6. – № 11. – P. 549-557.
3. Brunner, I. et al. Isolation and characterization of bacterial contaminants from Dieffenbachia amoena Bull, Anthurium andreanum Linden and Spathiphyllum p. Schott cultured in vitro / I. Brunner, A. Echegaray, A. Rubluo // Scientia Horticulturae. – 1995. – V. 62. – № 1-2. – P. 103-111.
4. Chen, J, Henny, R. J. Ornamental foliage plants: improvement through biotechnology / J. Chen, R. J. Henny // Recent advances in plant biotechnology and its applications. IK International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi. – 2008. – P. 140-156.
5. El-Hassani, A. et al. Usage of Plant Growth Regulators on Dieffenbachia spp. ornamental plant in vitro micropropagation / A. El-Hassani, B. E. Ak, H. Ekinici // 5 th International Conference on Engineering and Applied Natural Sciences. – 2024.
6. El-Mahrouk, M. E. et al. Micropropagation of Dieffenbachia plants from a single stem-nodes / M. E. El-Mahrouk, M. A. El-Tarawy, F. A. Menesi, A. I. Metwally // International Journal of Botany. – 2006. – V. 2. – № 3. – P. 324-328.



7. Elsheikh, A. M. et al. In vitro micropropagation of the ornamental plant dieffenbachia – a review / A. M. Elsheikh, H. M. Daffalla, M. M. Khalfala // Universal Journal of Plant Science. – 2013. – V. 1. – № 3. – P. 91-99.
8. Shen, X. et al. Indirect shoot organogenesis from leaves of Dieffenbachia cv. Camouflage / X. Shen, J. Chen, M. E. Kane // Plant cell Tiss Organ Cult. – 2007. – V. 89. – № 2. – P. 83-90.
9. Sierra, Y. M. et al. Micropropagation of Dieffenbachia picta / Y. M. Sierra, R. T. Sanchez, M. D. Gradaille, O. C. Laffite, L. Napoles // Biotechnologia vegetal. – 2001. – V. 1 – № 1. – P. 49-55.
10. Voyiatzi, C., Voyiatzis, D. G. In vitro shoot proliferation rate of Dieffenbachia exotica cultivar ‘Marianna’ as affected by cytokinins, the number of recultures and the temperature / C. Voyiatzi, D. G. Voyiatzis // Scientia Horticulturae. – 1989. – V. 40. – № 2. – P. 163-169.