

УДК: 631.535.5

**Мустафина Феруза Усмановна,**  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник,  
**Жамалова Дилафруз Нигматилла кизи,**  
младший научный сотрудник,  
**Курбаниязова Гульсауир Таинберген кизи,**  
младший научный сотрудник,  
**Турдиев Достон Эргаш угли,**  
младший научный сотрудник,  
**Жураева Ханифа Кобил кизи,**  
младший научный сотрудник,

**Mustafina Feruza Usmanovna,**  
candidate of Biological Sciences,  
senior fellow,  
**Jamalova Dilafruz Ne'matilla kizi,**  
junior scientific fellow  
**Kurbaniyazova Gulsauir Tainbergen kizi,**  
junior scientific fellow  
**Turdiev Doston Ergash ugli,**  
junior scientific fellow  
**Juraeva Khanifa Kobil kizi,**  
junior scientific fellow

*Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан  
Institute of Botany of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan*

## ПРОБЛЕМЫ ПРИ МИКРОКЛОНИРОВАНИИ РАСТЕНИЙ И ПУТИ ИХ ПРЕОДОЛЕНИЯ

**Аннотация.** В данной статье представлена информация по микроклональному размножению двух видов рода *Ferula* L.: *Ferula tadshikorum* Pimenov и *Ferula sumbul* (Kauffm.) Hook.f. (Apiaceae Lindl.), и двух видов рода *Ungernia* Bunge: *Ungernia sewertzowii* (Regel) B.Fedtsch. и *Ungernia victoris* Vved. Ex Artjush (Amaryllidaceae J.St.-Hil.), а также о проблемах, возникающих при микроклональном размножении и, в частности, при размножении этих четырех ценных медицинских видов.

**Ключевые слова:** микроклонирование, лекарственные растения, сохранение.

## ӨСҮМДҮКТӨРДҮН МИКРОКЛОНДОШТОРУУДАГЫ КӨЙГӨЙЛӨР ЖАНА АЛАРДЫ ЧЕЧҮҮ ЖОЛДОРУ

**Аннотация:** Бул макалада *Ferula* L. тукумунун эки түрүнүн: *Ferula tadshikorum* Pimenov жана *Ferula sumbul* (Kauffm.) Hook.f. (Apiaceae Lindl.) жана *Ungernia* Bunge тукумунун эки түрүнүн: *Ungernia sewertzowii* (Regel) B.Fedtsch., *Ungernia victoris* Vved. Ex Artjush (Amaryllidaceae J.St.-Hil.) микроклоналдык көбөйүүсү боюнча маалымат берилген,

ошондой эле микрочлоналдык көбөйтүүдөгү жана анын ичиндеги 4 баалуу медициналык түрлөрдүн көйгөйлөрү каралган.

**Негизги сөздөр:** микрочлонодоштуруу, дары өсүмдүктөр, сактоо.

## THE ISSUES OF MICROCLONAL PROPOGATION AND THE WAYS OF THEIR OVER OVERCOME

**Abstract.** The information on microclonal propogation of two species of *Ferula* L.: *Ferula tadshikorum* Pimenov and *Ferula sumbul* (Kauffm.) Hook.f. (Apiaceae Lindl.), and two species of *Ungernia* Bunge: *Ungernia sewertzowii* (Regel) B.Fedtsch. and *Ungernia victoris* Vved. Ex Artjush (Amaryllidaceae J.St.-Hil.), and about the issues which arise in microclonal propogation, and particularly in microclonal propogation of these four valuabla medicinal plant species.

**Key words:** microclonal propogation, medical plants, conservation.

В последние годы биотехнология растений в целом и микрочлонирувание в частности сделали огромные шаги в развитии и внесли большой вклад в программы по сохранению ценных генетических ресурсов растений, направленные на воспроизведение редких и исчезающих видов растений [1]. Ряд международных документов ориентировано на сохранение генетических ресурсов растений: «Конвенция о биологическом разнообразии» (1995, 2006), «Глобальная стратегия сохранения растений» (Global strategy ..., 2002), «Международная программа ботанических садов по охране растений» (2000), «Стратегия ботанических садов России по сохранению биоразнообразия растений» (2003).

Сохранение редких видов в естественных условиях обитания *in situ* является эффективным методом, однако существенным дополнением к нему является сохранение генетических ресурсов в условиях *ex situ*. Основными методами сохранения генетических ресурсов *ex situ* являются сохранение растений в коллекциях ботанических садов, хранение зародышевой плазмы (germplasm) в банке семян. Однако многие редкие виды растений характеризуются низкой всхожестью. В ботанических садах коллекции редких видов могут поражаться насекомыми и болезнями.

В последние годы успешное применение методов биотехнологии, включающее

микрочлональное размножение и другие методы *in vitro*, позволили регенерировать целые растения из соматических клеток. Использование методов культуры ткани является оптимальным решением задач по микроразмножению видов с затрудненным размножением в условиях *ex situ* и *in situ* или представленных единичным экземпляром. Работы могут проводиться круглогодично, для их проведения не требуются большие площади. Важно, что при размножении растений в пробирках не возникает угрозы их повторного заражения вирусными и другими болезнями. В целом применение технологии клонального размножения растений *in vitro* экономически значительно более выгодно по сравнению с традиционными технологиями вегетативного размножения и дает возможность получать семенной материал более высокого качества, при этом регенерированные растения характеризуются значительным сокращением ювенильного периода развития.

Регенерация растений может быть осуществлена несколькими путями: (1) через активацию уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля) и (2) через индукцию возникновения почек или эмбриоидов *de novo*, которая включает: а) образование адвентивных почек непосредственно тканями экспланта; б) дифференциацию адвентивных почек в первичной и пересадочной

кallусной ткани; в) индукцию прямого или непрямого соматического эмбриогенеза (Катаева, Бутенко, 1983).

В Институте ботаники Академии наук Республики Узбекистан выполняется проект А-ФА-2021-146 «Создание технологии организации и размножения лекарственных растений методом *in vitro*» (2021–2024 гг.), в рамках которого разрабатываются протоколы микрклонального размножения для четырех ценных медицинских видов растений:

Разработка протокола микрклонального размножения видов в условиях *in vitro* является результатом данного проекта, что позволит обеспечить фармацевтические компании необходимым сырьем и, тем самым, снизить антропогенный прессинг на природные популяции, восстановить популяции, находящиеся на грани исчезновения.

Выполнение проекта осуществлялось по следующим этапам: 1. Отбор экспланта, стерилизация и введение в культуру. 2. Подбор компонентов питательной среды. 3. Укоренение и адаптация растений к почвенным условиям. На каждом этапе возникали трудности, для преодоления которых проводились исследования и изучение опубликованных статей.

Методы микрклонального размножения, несомненно, имеют много преимуществ. Однако есть существенные недостатки: (1) осуществление микрклонального размножения требует больших затрат ручного труда; (2) требуется дорогое оборудование для того, чтобы свести к минимуму потери регенерантов на основных этапах размножения.

### **1. Отбор экспланта, стерилизации и введение в культуру.**

Отбор экспланта и введение в культуру является одним из наиболее трудоемких и затратных этапов всего процесса. Успешность введения в культуру того или иного типа экспланта зависит от множества факторов, среди которых физиологическое состояние источника экспланта, возраст и условия произрастания растения, онтогене-

тический статус растения являются одними из наиболее важных. В качестве экспланта могут быть использованы верхушечные или боковые почки, листья, черешки, пыльники и т.д. Для однодольных видов растений при микрклональном размножении используются чешуи луковиц, донца луковиц или корни. Водный потенциал питательных сред примерно в 10 раз ниже, чем водный потенциал нормально увлажненной почвы [5]. В такой питательной среде возможно выращивание растений в условиях *in vitro*, однако, такая среда может быть причиной стекловидности, которая связана с нарушением водного потенциала клеток экспланта, что, в свою очередь, связано с нарушениями транспирации. В научной литературе имеются сведения о воздействии на стекловидные растения темнотой, абсцизовой кислотой, антитранспирантами, манитолом, высокими концентрациями  $\text{CO}_2$ , то есть факторами, которые закрывают устьица у нормальных растений [5]. Однако попытки эти были безуспешными. Помимо стекловидности наибольший ущерб наносят некроз, нефункциональные устьица, неработающая корневая система. Причиной некроза часто называют недостаток кальция [6]. Экспланты ряда видов на этапе введения в культуру выделяют много фенолов; в процессе их выделения и окисления верхний слой среды загрязняется продуктами окисления. С целью удаления фенолов и продуктов их окисления, в питательную среду добавляется активированный уголь. В публикации Деменко (2005) описан эксперимент по посадке эксплантов верхушкой на питательную среду с целью предотвращения выделения фенолов в питательную среду. Пробирки ставились таким образом, чтобы сохранить полярность. Автор рекомендовал использование данной методики с целью снижения количества пересадок.

Для *Ferula sumbul* наблюдалось образование микропобегов на эксплантах, полученных из частей стебля с узлом. В качестве эксплантов были использованы части проросшего семени, а именно, котиледон, гипо-

котиль и корешки. Кроме того, использованы сегменты стебля с одним узлом, черешки листьев, кусочки листьев.

С целью обеспечения постоянного наличия эксплантов видов *Ferula*, в лаборатории организовано проращивание семян по следующей схеме: (1) Зрелые, здоровые семена, без следов поедания насекомыми, тщательно промывались дистиллированной водой. (2) Семена замачивались в дистиллированной воде на 1 час. На данном этапе хорошие результаты были получены при добавлении в среду гибберелиновой кислоты в концентрации 0,7 мг/л. (3) С целью стерилизации, семена замачивались в 70% этаноле. (4) Далее семена помещались в 6% раствор гипохлорита натрия на 20 минут. (5) Семена промывались дистиллированной водой три раза. При этом каждый раз семена оставались в дистиллированной воде на 10 минут. (6) Семена высаживались на агаризированную среду Мурасиге и Скуга (25%) и помещались в холодильник при +5°C на один месяц. (7) Семена переносились на агаризированную питательную среду Мурасиге и Скуга (50%) и размещались на стеллажах в культуральной комнате при 24±1°C. Основная проблема, с которой пришлось столкнуться при введении в культуру эксплантов видов рода *Ferula*, была высокая загрязненность материала. С целью преодоления данной проблемы, стерилизацию рекомендуется проводить в 6% гипохлорите натрия не менее 30 минут.

Для видов рода *Ungernia* в качестве эксплантов использованы чешую луковиц, донце лука, а также корни. Стерилизация также проводилась по той же схеме, что и для семян ферулы. Раствор гипохлорита натрия при стерилизации донце луковиц и корней также использовался 6%ым, при стерилизации чешуй – 4%. Основная проблема, с которой пришлось столкнуться при введении в культуру эксплантов видов рода *Ungernia*, была стекловидность, образование которой наблюдалось на эксплантах, полученных из тонких чешуй луковиц.

Успешное начало микроклонального размножения зависит от того, насколько условия *in vitro* приближены к состоянию целостного растения. Негативные последствия отделения эксплантов можно уменьшить, изменив методику стерилизации. Например, при введении в культуру *in vitro* видов ириса в питательные среды был добавлен антибиотик левомецитин в количестве 100 мг/л с целью борьбы с наличием в питательной среде бактериальной микрофлоры. Препарат тербинафин в концентрации 250 мг/л оказался эффективным в борьбе с грибковым поражением (Тихомирова, 2011). Из стерилизующих средств в большинстве экспериментов используются 96% и 70% растворы этилового спирта, 0,1% раствор сулемы, 0,5%, 1% и 6% раствор сульфохлорантина, 3% раствор пероксида водорода, 0,5 мг/л хлоргексидин. В наших экспериментах на видах рода *Ferula* и *Ungernia* хорошие результаты были получены при использовании 70% этанола с последующей обработкой 4% или 6% гипохлорита натрия.

## 2. Подбор компонентов питательной среды.

В большинстве публикаций авторы используют уже опубликованные питательные среды Мурасиге и Скуга, Уайта, Гамборга. Однако, для каждого вида компоненты питательной среды и их концентрации подбираются индивидуально на основе экспериментов.

Большинство процессов роста и развития растений и его частей могут нормально осуществляться только при участии физиологически активных веществ. Микроклональное размножение растений в условиях *in vitro* невозможно без добавления ауксинов и цитокининов. Для получения желаемого роста на этапе введения в культуру, т. е. удлинения экспланта, необходимо стимулировать к росту растяжением субапикальную меристему. В субапикальной меристеме вторичная меристема представлена прокамбием, его превращение в камбий контролируется гормонами. Только после этого в растущем экспланте создается функ-



циональная сосудисто-проводящая система, обеспечивающая его рост в длину.

В наших экспериментах использована стандартная среда Мурасиге и Скуга (Мурасиге и Скуга, 1962). В питательные среды вводили следующие фитогормоны: (1) цитокининового типа действия – 6 бензиламинопуриин (БАП) (Sigma, США) и кинетин (Sigma, США); (2) ауксинового действия –  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту (НУК) (Sigma, США), 3-индолилуксусную кислоту (ИУК) (Sigma, США) и 2,4-Дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) (Sigma, США). В работе были протестированы 78 комбинаций концентраций фитогормонов: БАП и ИУК, БАП и НУК, БАП и 2,4-Д, Кин и ИУК, Кин и НУК, БАП и 2,4-Д в концентрациях 0,5; 1,0; 2,0 мг/л. Кроме того, проанализирована научная литература и уточнены наиболее оптимальные концентрации фитогормонов в питательной среде для представителей видов родов *Ferula* и *Ungernia*. В результате проведенных работ установлено, что для *F. sumbul* оптимальной комбинацией оказались БАП 0,5 мг/л + Кин 0,5 мг/л, что способствовало развитию органогенеза после первого субкультивирования. Для видов рода *Ungernia* оптимальными оказались концентрации фитогормонов 2,4-Д 0,5 мг/л+Кин 0,5 мг/л, в питательной среде, на которых наблюдалось развитие каллуса после второго субкультивирования.

### 3. Укоренение и адаптация растений к почвенным условиям.

Один из ответственных этапов адаптации растений зависит от вида растений, времени пересадки. Большинство видов растений, особенно, древесные необходимо готовить еще на стадии *in vitro*. Для этого предлагают открывать сосуды на несколько часов. Одной из проблем после пересадки растений в нестерильные условия является нефункционирование устьиц. Потеря воды пробирочными растениями происходит через устьица, которые не функционируют в течение 10–14 дней после пересадки [8]. Применение в питательной среде ингибиторов синтеза этилена (аминоизомаляевой кислоты, аминокпропана, аминэтоксиванил

глицина) частично улучшает качество растений и приживаемость в нестерильных условиях [9]. Большинство авторов рекомендуют поддерживать влажность воздуха в пределах 95–99%, постепенно снижая до 50–60%: Кроме того, в условиях *in vitro* растения способны в основном к гетеротрофному питанию. Поэтому на всех этапах микроклонального размножения добавляют углеводы. Установлено, что растения в условиях *in vitro* способны к фотосинтезу, однако эта способность не реализуется из-за низкой концентрации  $\text{CO}_2$  в сосудах и использования сахарозы. Рекомендуется растения перед посадкой в нестерильные условия две недели выращивать при освещении 10 000 люк [10]. Другая проблема, возникающая при пересадке растений в нестерильные условия – недостаточно функционирующая корневая система. Растения *in vitro* не имеют корневых волосков. Процесс корнеобразования зависит от концентрации ауксина и агара. Установлено, что для растений *in vitro* необходим субстрат с объемом пор не менее 25% [11].

**Заключение.** Для видов *F. tadshikorum* и *F. sumbul* наиболее оптимальным является размножение из проросших семян. Данное направление работ требует дальнейшего проведения экспериментов. На данном этапе необходимо отметить концентрацию фитогормонов БАП 0,5 мг/л + Кин 0,5 мг/л в питательной среде Мурасиге и Скуга, при котором наблюдалось формирование микропобегов после первого субкультивирования.

Для видов *U. sewertzowii* и *U. victoris* наиболее оптимальным является размножение из чешуй луковиц. Необходимо отметить, что концентрация фитогормонов 2,4-Д 0,5 мг/л+Кин 0,5 мг/л в питательной среде Мурасиге и Скуга позволила наблюдать каллусообразование после второго субкультивирования.

Работы по адаптации растений *F. tadshikorum*, *F. sumbul*, *U. sewertzowii* и *U. victoris* еще требуют проведения экспериментальных работ, однако необходимо отметить, что данный этап является наиболее важным в микроклонировании растений в условиях *in vitro*.

## Литература

1. Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального сибирского ботанического сада. Вестник ВОГиС, 2008, 12(4). 564–572.
2. Конвенция о биологическом разнообразии. Рио-де-Жанейро, 1992 г.
3. Международная программа ботанических садов по охране растений. М.: Междунар. совет ботан. садов по охране растений. Botanic Gardens Conserv. Intern. 2000. – 57 с.
4. Стратегия ботанических садов России по сохранению биологического разнообразия растений. М.: Красная Звезда, 2003. – 32 с.
5. Деменко В.И. Проблемы и возможности микроклонального размножения садовых растений. Введение в культуру. Известия ТСХА, 2005, №2. 1–11 с.
6. *Voxus Ph.* et al. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Berlin (West), 1977.
7. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology of plants, 1962, 15(3), 473-497 p.
8. Деменко В.И., Лебедев В.А. Адаптация растений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям. Известия ТСХА, 2011, № 1,1–11 с.
9. *Bengtson C.* Water stress, transpiration, kinetin and ABA. Physiology of Plants, 1979, Vol. 45, 183–188.
10. *Gront B. W.W.* Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro* and the stresses of transplantins. Acta Horticulture, 1988, Vol. 230, 129-135 p.
11. *Kim K. Wetal.* Effect of ABA and agar in preventing verticillium of carnation plantlets cultured *in vitro*. Journal of Korean Society for Horticulture Sciences, 1988. Vol. 29. 1(3), 208–215 p.