

УДК 601/602

Жураева Ханифабону Кобул кизи,*младший научный сотрудник,***Жамалова Дилафруз Ньематилла кизи,***базовый докторант,**младший научный сотрудник,***Курбаниязова Гульсауир Танирберген кизи,***базовый докторант,**младший научный сотрудник,***Есемуратова Хажихан Жумабай кизи,***младший научный сотрудник,**Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан***Исканов Нурбек Кизил угли,***младший научный сотрудник,***Мустафина Феруза Усмановна,***кандидат биологических наук,**старший научный сотрудник, заведующая лабораторией**Ботанический сад имени Ф.Н. Русанова**Института ботаники Академии наук Республики Узбекистан***Juraeva Hanifabonu Kobul kizi,***junior scientific fellow,***Jamalova Dilafruz Ne'matilla kizi,***basic doctoral student,**junior scientific fellow,***Kurbaniyazova Gulsauir Tanirbergen kizi,***basic doctoral student,**junior scientific fellow,***Esemuratova Hajixan Jumabay kizi,***junior scientific fellow,**Institute of Botany Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan***Iskanov Nurbek Kizil ogli,***junior scientific fellow,***Mustafina Feruza Usmanovna,***candidate of Sciences, senior scientific fellow,**chief of laboratory**Botanical Garden named after F.N. Rusanov**Of the Institute of Botany Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan*

ОПТИМИЗАЦИЯ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПРИ ВВЕДЕНИИ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* РЕДКИХ ВИДОВ КАК УСЛОВИЕ СОХРАНЕНИЯ РЕДКИХ ВИДОВ

СЕЙРЕК КЕЗДЕШҮҮЧҮ ТҮРЛӨРДҮН *IN VITRO* КУЛЬТУРАСЫН КИРГИЗҮҮДӨ СТЕРИЛИЗАЦИЯНЫ ОПТИМАЛДАШТЫРУУ СЕЙРЕК КЕЗДЕШҮҮЧҮ ТҮРЛӨРДҮ САКТОО ШАРТЫ КАТАРЫ

OPTIMIZATION OF STERILIZATION WHEN INTRODUCING RARE SPECIES INTO CULTURE *IN VITRO* AS A CONDITION FOR RARE SPECIES CONSERVATION

Аннотация. В данной статье представлены результаты исследований по оптимизации условий стерилизации некоторых ценных медицинских видов растений рода *Ungernia* Bunge (*Amaryllidaceae* J.St.-Hil.): *U. sewertzowii* (Regel) B.Fedtsch. и *U. victoris* Vved. ex Artjush., образцы коллекции ботанического сада имени Ф.Н. Русанова АН РУз - *Corylus avellana* L. (*Betulaceae* Gray) и *Acer platanoides* L. Crimson King (*Acearceae* Juss.). Установлено, что наиболее оптимальным протоколом стерилизации эксплантов данных видов включает использование стерилизующего средства «Доместос», 70% этанола и 4-6% раствора натрия гипохлорида.

Ключевые слова: *in vitro* микроклонирование, стерилизация, сохранение.

Аннотация. Макалада *Ungernia* Bunge (*Amaryllidaceae* J.St.-Hil.): *U. sewertzowii* (Regel) B.Fedtsch. жана *U. victoris* Vved. Ex Artjush. тукумунун өсүмдүктөрүнүн айрым баалуу медициналык түрлөрүнүн стерилизация шарттарын изилдөө боюнча натыйжалары жана Өзбекстан илимдер академиясынын Ф.Н.Русанов атындагы ботаникалык бактын коллекциясындагы үлгүлөр - *Corylus avellana* L. (*Betulaceae* Gray) и *Acer platanoides* L. Crimson King (*Acearceae* Juss.) берилген.

Белгиленген түрлөрдүн экспланттарынын стерилизациясы үчүн оптималдуу протокол катары «Доместос», 70% этанол жана 4-6% натрия гипохлориддин эритмеси пайдаланылаары аныкталган.

Негизги сөздөр: *in vitro*, микроклондоо, стерилизациялоо, сактоо.

Abstract. The results of research on optimization of sterilization conditions for some valuable medicinal plant species of the genus *Ungernia* Bunge (*Amaryllidaceae* J.St.-Hil.): *U. sewertzowii* (Regel) B. Fedtsch. and *U. victoris* Vved. ex Artjush., samples from the collection of the Botanical Garden named after F.N. Rusanov of the AScRUz – *Corylus avellana* L. (*Betulaceae* Gray) and *Acer platanoides* L. Crimson King (*Acearceae* Juss.) are presented in this article. It has been found that the most optimal sterilization protocol for explants of these species includes the use of the “Domestos” sterilizing agent, 70% ethanol and 4-6% sodium hypochlorite solution.

Key words: *in vitro*, microcloning, sterilization, conservation.

Сохранение биоразнообразия растений является одной из важных задач ботанических садов. В ряде законодательных документов, принятых в последние годы, отражена концепция сохранения растительного биоразнообразия Международная программа ботанических садов по охране растений» (2000) и т.д. для обеспечения биобезопасности и процветания будущих поколений: «Конвенция о биологическом разнообразии» (1995, 2006), «Глобальная стратегия сохранения растений» (Globalstrategy ..., 2002).

Из более 4,3 тысячи видов растений флоры Узбекистана, 750 считаются лекарственными, 112 видов зарегистрированы

для применения в научной медицине, из которых 70 видов активно используются в фармацевтической промышленности [4]. В Республике Узбекистан принят ряд постановлений, направленных на охрану биоразнообразия растений, рациональное использование природных ресурсов, поддержку сооружения плантаций по выращиванию лекарственных растений и их переработке.

Биотехнология растений дает возможность сохранения редких видов растений, многие из которых находятся на грани исчезновения. Программы по созданию и сохранению коллекций культуры клеток и тканей выполняются во многих ботанических садах. В ряде стран сформированы и эффективно функционируют *in vitro* коллекции клеток, органов и растений, созданы криобанки, где в жидком азоте хранятся образцы растительного материала, принадлежащего к разным систематическим группам [5]. Многие коллекционные образцы, сохраняемые как национальное достояние, относятся к разряду редких и исчезающих растений, охраняемых законом. В США (штат Орегон, Корваллис) функционирует National Clonal Germplasm Repository USDA [6], где хранятся 500 000 образцов хозяйственно-ценных, а также редких и исчезающих растений, охватывающих 10 000 видов. В Германии поддерживается более 700 образцов различных линий культур клеток, принадлежащих к 80 различным семействам растений, причем большинство этих культур синтезируют фармакологически важные вторичные метаболиты [7]. Подобные коллекции существуют во Франции, Италии, Испании, Бельгии, Польше, Румынии, Японии, Индии, ряде других стран. Российская коллекция культур клеток создана в 1978 г. и в настоящее время включает 9 разделов, в том числе 2 специализированные коллекции клеток высших растений и генетически трансформированных корней растений ИФР РАН, которые насчитывают около 100 различных штаммов и линий культур клеток [8]. В 2005 г. Центральный ботанический сад НАН Беларуси получил свидетельство

на коллекцию асептических культур хозяйственно-полезных растений. Постоянно пополняясь, эта коллекция сегодня содержит 241 наименование растений: 32 вида и более 200 культиваров из 11 семейств. При этом более 65 % таксонов в ее составе относятся к фиторесурсным видам [5].

В данной статье представлены результаты исследований по разработке протоколов микрочлонирувания ценных лекарственных растений флоры Республики Узбекистан, а также образцов коллекции ботанического сада имени Ф.Н. Русанова.

Материал. Исследования проводились на двух видах рода *Ungernia* Bunge (*Amaryllidaceae* J.St.-Hil.): *U. sewertzowii* (Regel) B.Fedtsch. и *U. Victoris* Vved. ex Artjush., образцы коллекции ботанического сада имени Ф.Н. Русанова АН РУз - *Corylus avellana* L. (*Betulaceae* Gray) и *Ace rplatanoides* L. Crimson King (*Acearceae* Juss.).

Статистический анализ результатов проводили с использованием алгоритмов стандартного отклонения (SD) и расчета коэффициента Стьюдента программы Excel.

Методы. В ходе проведения работ придерживались классических методов введения в культуру *in vitro* растений [9, 10, 11]. В качестве эксплантов в наших исследованиях использованы части проросших семян (гипокотиль, котилидон и корешки), стебли с боковыми и верхушечными почками, а также луковичы. Для каждого вида эксплантов подбирались стерилизующие агенты: гипохлорид натрия, пероксид водорода, серная кислота, стерилизующее жидкое мыло “Доместос” и т.д.

Процедура стерилизации объектов включала в себя следующие этапы: свежесобраный материал тщательно промывался проточной водой, затем размещался в растворе стерилизующего мыла “Доместос” (20%), материал промывался дистиллированной водой, размещался на 90 секунд в 70% раствор этанола, затем в раствор гипохлорида натрия различной концентрации

Для соблюдения условий асептики при выполнении работ по культивированию

объектов исследований *in vitro* стерилизации должны подвергаться операционная комната, в которой производят изоляцию и посадку культур, одежда и руки работающего персонала, посуда, используемая для культивирования объектов, все необходимые инструменты и материалы, питательные среды, объекты исследований.

Основным условием успешного получения и выращивания культуры в условиях *in vitro* является стерилизация растительных объектов, которая заключается в уничтожении грибных и бактериальных спор на внешней поверхности без повреждения внутренних тканей. Для этого используют различные стерилизующие агенты. Вид стерилизующего вещества, его концентрация и время действия, зависящие от особенностей тканей исходных растений, необходимо подобрать таким образом, чтобы убить микроорганизмы и не повредить ткани экспланта.

Еще одним важным условием является то, что стерилизующее вещество должно легко удаляться из ткани промывкой дистиллированной водой или разлагаться. Иначе происходит отравление тканей, что негативно влияет на дальнейший рост культуры. Чаще всего для поверхностной стерилизации растительных тканей используют соединения, содержащие активный хлор (гипохлорит натрия, гипохлорит кальция, хлорамин), ртутные препараты (сулема, диацид) и окислители (перекись водорода, перманганат калия), этиловый спирт, реже концентрированную серную кислоту, препараты азотнокислого серебра и антибиотики. Эффективность стерилизации повышается при добавлении на 1 л стерилизующего агента 5-6 капель Твин-80 или Твин-20[12].

В наших экспериментах в были использованы семь типов стерилизующих сред (Таблица 1).

Таблица 1.

Типы стерилизующих сред, использованных для стерилизации *Ungernia sewertzowii*, *U. Victoris*, *Corylus avellana* и *Acer platanoides* L. Crimson King (*Acearceae* Juss.).

Стерил. среда	Стерил. мыло «Доместос»	этанол	Гипохлорид натрия	Пероксид водорода	Серная кислота
1	20% - 20 мин	70% - 90 сек	4% 20 мин	6% 2 сек	
2	20% - 20 мин		4% 20 мин	6% 2 сек	
3	20% - 20 мин	70% - 90 сек		6% 2 сек	
4	20% - 20 мин	70% - 90 сек	6% 20 мин	6% 2 сек	
5	20% - 20 мин	70% - 90 сек	10% 20 мин	6% 2 сек	
6	20% - 20 мин	70% - 90 сек	15% 20 мин	6% 2 сек	
7	20% - 20 мин	70% - 90 сек			15% 20 мин

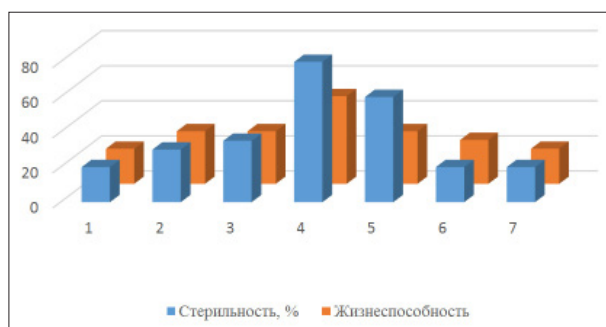


Рис. 1 Жизнеспособность и стерильность эксплантов, полученных из луковиц *Ungernia sewertzowii* и *Ungernia victoris*



Рис. 2. Стерильность и жизнеспособность эксплантов *Corylus avellana* L. (*Betulaceae* Gray) при различных способах стерилизации

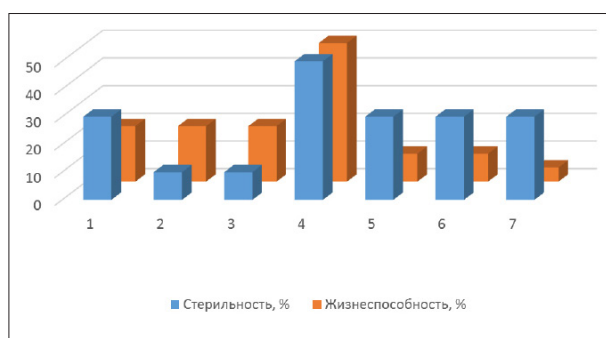


Рис. 3. Стерильность и жизнеспособность эксплантов *Acer platanoides* L. Crimson King (*Acearceae* Juss.) при различных способах стерилизации

Результаты исследований показали, жизнеспособность эксплантов, полученных из луковиц *Ungernia sewertzowii* и *Ungernia victoris* достигала 60% при использовании 6% раствора гипохлорида натрия и заметно

снижалась с увеличением его концентрации (рис. 1). При использовании высоких концентраций гипохлорида натрия при стерилизации стеблей с боковыми почками у *Corylus avellana* и *Acer platanoides* в дальнейшем наблюдался некроз тканей (рис. 2, 3). В связи с этим, оптимальной концентрацией раствора гипохлорида натрия, при которой жизнеспособность эксплантов *Corylus avellana* достигала 60% и эксплантов *Acer platanoides* – 50%, составила 6%. Важное значение имеет обработка эксплантов 70% этанолом. Установлено, что наиболее оптимальным протоколом для стерилизации объектов исследований явился следующий: промывание проточной водой, 20% стерилизующее мыло «Доместос» – 20 минут, этанол – 90 секунд, 6% гипохлорид натрия – 20 минут с последующим промыванием экспланта. Также

Благодарности

В данной статье представлены результаты исследований проекта А-ФА-2021-146 «Создание технологии организации и размножения лекарственных растений методом *in vitro*» Института ботаники Академии наук Республики Узбекистан, а также бюджетной программы Ботанического сада имени Ф.Н. Русанова Института ботаники Академии наук Республики Узбекистан: «Разработка научных основ устойчивого воспроизводства ценных образцов коллекции ботанического сада в культуре *in vitro*».

Литература

1. Конвенция о биологическом разнообразии, 1995, 2006.
2. Глобальная стратегия сохранения растений (Global strategy ..., 2002).
3. Международная программа ботанических садов по охране растений, 2000.
4. <https://lex.uz/ru/docs>
5. Решетников В.Н., Спиридович Е.В., Носов А.М. Биотехнология растений и перспективы ее развития. // Физиология растений и генетика. №46(1), 2014 - С 1-18.
6. <https://www.ars.usda.gov/pacific-west-area/corvallis-or/national-clonal-germplasm-repository>

7. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Catalogue (dsmz.de)
8. <http://www.sevin.ru/collections/cell-colls/rccsr.html>
9. *Бутенко Р.Г.* Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. - 160 с.
10. *Бутенко Р.Г.* Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / М.: Наука, 1971. - 342 с.
11. *Бутенко Р.Г.* Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
12. *Рубцов С.Л., Милехин А.В., Шевченко С.Н., Бакунов А.Л., Дмитриева Н.Н.* Методика микроклонального размножения и производство оздоровленных миниклубней в оригинальном семеноводстве картофеля в условиях высокой инфекционной нагрузки Самарской области. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. т. 19, № 2(4), 2017. - С. 650-658.