

УДК 581.16 2.633.88
AGRIS F40

https://doi.org/10.33619/2414-2948/82/11

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ *Lagochilus inebrians* Bunge В УСЛОВИЯХ *in vitro*

©Султонова К. Р., Самаркандский государственный университет
ветеринарной медицины, животноводства и биотехнологии,
г. Самарканд, Узбекистан, kumushsultonova90@gmail.com

©Кушиев Х. Х., д-р биол. наук, Гулистанский государственный университет,
г. Гулистан, Узбекистан, kushiev@mail.ru

Lagochilus inebrians Bunge MICROCLONAL PROPAGATION UNDER *in vitro* CONDITIONS

©Sultonova K., Samarkand State University of Veterinary Medicine, Animal Husbandry and
Biotechnology, Samarkand, Uzbekistan, kumushsultonova90@gmail.com

©Kushiev Kh., Dr. habil., Gulistan State University, Gulistan, Uzbekistan, kushiev@mail.ru

Аннотация. В статье приведены результаты введения в культуру *in vitro* и микроклонального размножения *Lagochilus inebrians* Bunge, произрастающего на территории Центральной Азии. В качестве материала исследований были использованы растения *Lagochilus inebrians*, выращенные из семенных материалов в лабораторных условиях. Для получения асептических культур *Lagochilus inebrians* необходимо использовать многоэтапные протоколы стерилизации с применением различных типов антисептиков. Установлено, что оптимальным эксплантом для культивирования является апексы генеративного побега. В присутствии высоких концентраций экзогенных цитокининов происходит индукция адвентивных побегов.

Abstract. The article presents the results of the introduction into culture *in vitro* and microclonal reproduction of *Lagochilus inebrians* Bunge growing in the territory of Central Asia. Plants of *Lagochilus inebrians* grown from seed materials in laboratory conditions were used as research material. To obtain aseptic cultures of *Lagochilus inebrians*, it is necessary to use multi-stage sterilization protocols using various types of antiseptics. It has been established that the optimal explant for cultivation is the apex of the generative shoot. In the presence of high concentrations of exogenous cytokinins, adventitious shoots are induced.

Ключевые слова: *Lagochilus inebrians*, культура *in vitro*, эксплант, адвентивный органогенез, микроклональное размножение.

Keywords: *Lagochilus inebrians*, *in vitro* culture, explants, adventive organogenesis, microclonal reproduction.

В настоящее время проблема сохранения биологического разнообразия имеет глобальный характер и отражена в международных и национальных стратегических документах, которые являются законодательной основой для устойчивого использования биоресурсов [1–3]. Важнейшей частью биоразнообразия являются растения — незаменимый источник жизненно важных для человека природных веществ и материалов.

Возобновление природных популяций растений предполагает выращивание ценных видов в экспериментальных условиях. Микроразмножение считается одним из наиболее коммерчески и экономически важных подходов [4–8]. Современные методы особенно подходят для видов, которые трудно возобновимы в естественных условиях [9, 10].

На сегодняшний день культивирование *in vitro* и микроразмножение исчезающих видов ценных растений является одним из альтернативных источников получения лекарственного сырья, при этом способствует сохранению природных популяций и является актуальным направлением современной биотехнологии.

Технологии микроразмножения позволяют ускорить размножение редких и исчезающих видов растений, нуждающихся в охране, и рассчитаны на получение дополнительного источника сырья в виде каллусных тканей, а также растений-регенерантов для плантационного выращивания сырья ресурсных лекарственных растений. Растения, полученные методом микроразмножения, позволят решить проблемы здоровья нации, сохранят растительный мир планеты [10]. С использованием метода культивирования тканей и органов растений в настоящее время создан ряд клеточных технологий, позволяющих получать ценные вторичные продукты метаболизма растений [3].

Одним из таких растений является зайцегуб опьяняющий (*Lagochilus inebrians* Bunge) — полукустарничек высотой от 20 до 60 см. На территории Узбекистана обитает в предгорных равнинах и низких предгорьях, останцах, на каменистых обнажениях, галечниках и выносах рек, по лессовым холмам, щебнистым склонам, в эфемероидно-разнотравном, эремурсово-полынном, гармалово-разнотравном, разнотравно-полынном, янтаково-разнотравном и других растительных сообществах. Вне Узбекистана встречается в Таджикистане и Туркмении [11, 12]. Наиболее плотные заросли *L. inebrians* в пределах Узбекистана встречаются в предгорьях и горах в пределах Самаркандской, Джизакской, Невоинской и Сурхандарьинской областей [13].

Lagochilus inebrians является одним из ценных лекарственных растений, содержащих различные биологически активные компоненты. Поэтому в народной медицине Узбекистана, Туркмении, Казахстана лагохилус используют как кровоостанавливающее, успокаивающее средство [14, 15].

Целью исследования является разработка способа ускоренного размножения *Lagochilus inebrians* методом культуры тканей *in vitro*, применение которого позволит сохранить данный вид, провести интродукцию и предотвратить исчезновение генетических ресурсов этого реликтового растения.

Разведение *Lagochilus inebrians* Bunge, биоэкологическая характеристика и химический состав рассматривали А. И. Введенский, Т. И. Цукерваник, М. И. Икрамов и др. [11–13].

Материал и методы исследования

Семена *Lagochilus inebrians* были высажены в условия теплицы для получения донорных растений. Для введения в культуру *in vitro* использовали экспланты вегетативных побегов с верхушечной почкой и генеративных побегов с соцветиями. Введение первичных эксплантов проводили в весенний период с горшечного растения и летний период с полевых растений на этапе их вегетации-цветения.

В экспериментах применяли общепринятую методику культивирования изолированных эксплантов растений на питательной среде в условиях *in vitro* [16, 17]. Для культивирования использовали основную среду Мурасиге и Скута (МС) с внесением стимуляторов роста: ауксинов; 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4 Д), индолилмасляная кислота (ИМК), индолилуксусная кислота (ИУК); цитокинина-6-бензиламинопурин (БАП).

Для стерилизации исходные побеги в условиях ламинарного бокса стерилизовали 70% этиловым спиртом, затем 0,2% раствором AgNO_3 . После стерилизации в асептических условиях каждый побег делили на узловые сегменты длиной 1,5 см и высаживали на питательную среду.

Высаженный на питательную среду материал переносили в условия световой комнаты, где поддерживали 16-часовой фотопериод, освещенность 3000 Лк, 60% влажности и температуру 24–26 °С. Ежедневно визуально оценивали жизнеспособность, рост и развитие эксплантов. Пассирование материала на снежную питательную среду проводили через каждый месяц культивирования. Коэффициент размножения (Кг) определяли, как общее количество образующихся побегов в варианте, деленное на число первичных эксплантов или пассированных микропобегов.

Результаты и их обсуждение

Выявлено, что экспланты вегетативных побегов с верхушечной почкой не обладают регенерационной способностью в условиях *in vitro*. При их культивировании на индуцирующей среде с БАП происходила витрификация верхушки побега и листьев, дальнейшего роста и пролиферации дополнительных почек не наблюдалось (Рисунок а).

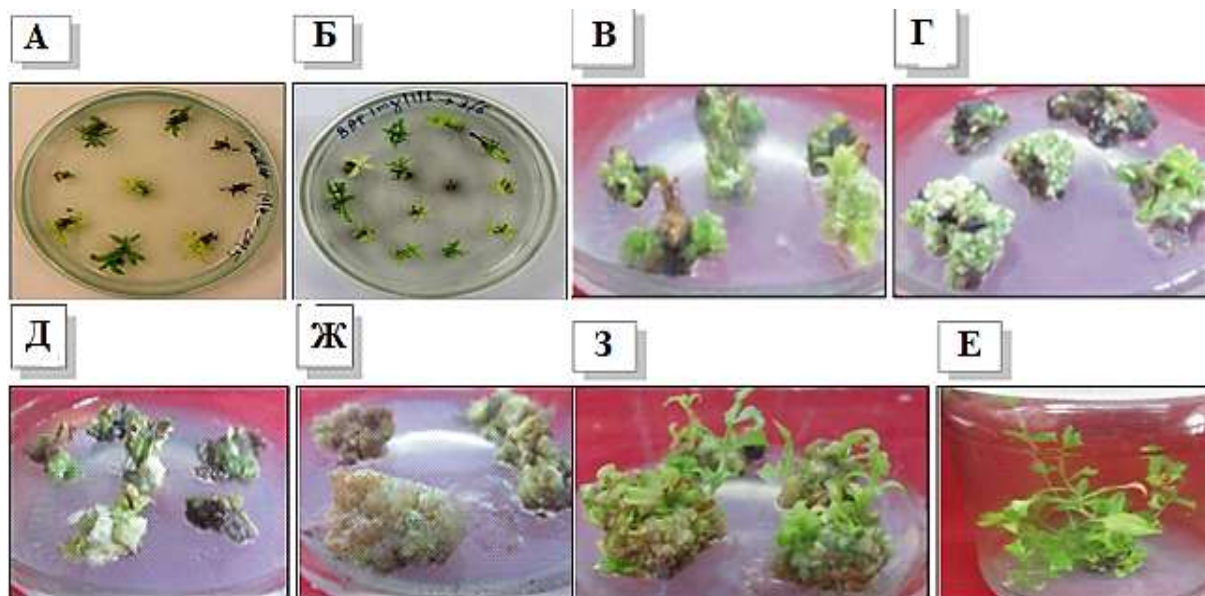


Рисунок. Микроклональное размножение *Lagochilus inebrians* в условиях *in vitro*: а — верхушка вегетативного побега, б — каллус на эксплантах, в — развитие пазушных побегов в пазухах прилистников на генеративных побегах; г — регенерация кустистых побегов на эксплантах генеративных побегов; д — конгломерат побегов на 55 день на первичной среде; ж — развитые побеги, з — этап укоренения побегов; е — отделенные кустики

При культивировании эксплантов генеративных органов на индуцирующей питательной среде отмечалась ответная морфогенетическая реакция эксплантов. Выявлено существенное влияние гормонального состава питательной среды на реализацию регенерационного потенциала эксплантов. Среда МС с 1 мг/л 2,4 Д вызывала образование неморфогенного каллуса на поверхности эксплантов, который некротизировался в ходе пассирования (Рисунок б). Тогда как культивирование на среде с внесением БАП в сочетании с ауксинами приводило к закладке дополнительных почек в пазухах прилистников (Рисунок в).

Приживаемость сегментов генеративных побегов была высока (58%), но морфогенетическая реакция отмечалась только у 26% введенных эксплантов через неделю культивирования на среде с 4 мг/л БАП + 0,25 мг/л ИМК. В пазухах прилистников отмечалось появление кустистых образований (Рисунок г), которые увеличивались в размерах и без пассирования достигали через 3 месяца высоты 3 см (Рисунок д).

При отделении вновь образованных кустистых побегов (Рисунок е) и их пассировании на свежие среды с пониженным уровнем БАП до 1 мг/л можно было отделить побеги в количестве 3–5 и разделить оставшийся плотный конгломерат на отдельные кусты для следующей пересадки (Рисунок ж).

За 4 пассажа (введение — III пассаж) от одного исходного экспланта было получено в зависимости от гормонального состава среды от 13 до 21 побегов (Таблица).

Таблица

РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ ПОБЕГОВ *Lagochilus inebrians*

МС среда: гормональный состав	Количество побегов по этапам пассирования, шт.				Kr, Коэффициент размножения	Процесс укоренения после пассирования на среду, %		
	0	I	II	III		I	II	IV
4 БАП + 0,2 ИМК	1	3	5,0	21	5	7,5	26	100
1,5 БАП + 0,1 ИУК	1	3	2,5	13	3			

Из Таблицы видно, что дополнительное внесение в питательную среду цитокинина БАП и ауксина ИМК или ИУК стимулирует закладку почек и развитие из них адвентивных побегов, которые при дальнейшем трехкратном пассировании также продуцируют новые побеги, т. е. происходит процесс клонирования исходного растительного материала. Этап собственно размножения можно многократно повторять, чтобы увеличить коэффициент тиражирования и получить клоновый растительный материал, генетически не отличающийся от первоначального донорного растения.

Для получения полноценных растений-регенерантов полученные побеги пересаживали на среду для укоренения с половинной концентрацией макро- и микросолей ½ МС с внесением ауксина. Формирование корней у асептических побегов отмечали через неделю выращивания на среде ½ з — этап укоренения побегов с внесением 0,5 мг/л ИМК. В ходе дальнейшего месячного культивирования ризогенез отмечали у всех пассированных побегов (Рисунок з).

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлен оптимальный для регенерации *in vitro* эксплант генеративного побега, при культивировании которого на среде с БАП и ИМК/ИУК достигается прямая регенерация путем закладки дополнительных почек в пазухах прилистников.

Последовательное пассирование позволяет провести микроразмножение исходной культуры и получить растения-регенеранты *Lagochilus inebrians* для перевода в почвенный субстрат и адаптации к условиям *ex vitro*.

Разработанный способ микроклонального размножения предназначен для сохранения, массового воспроизводства и хозяйственного использования генетических ресурсов дикорастущей культуры в суровых почвенно-климатических условиях.

Заключение

Установлено, что пролиферация каллусной ткани *Lagochilus inebrians* в условиях *in vitro* оптимально осуществляется в комбинации БАП (1 мг/л) + НУК (1 мг/л) в питательной среде МС. В варианте комбинации БАП (2 мг/л) + НУК (0,1 мг/л) + ГКЗ (0,5 мг/л) отмечена относительно высокая интенсивность корнеобразования. В процессе микроклонирования отмечено, что интенсивность регенерации выше на питательной среде WPM, чем на питательной среде МС в присутствии комбинации кинетин (2,3–18,4 мкМ) + 1-нафталинуксусная кислота (0,54 мкМ). Для интродукции *Lagochilus inebrians* разработаны способы размножения растений методом *in vitro*.

Список литературы:

1. Convention on Biological Diversity. United Nations, 1992. 30 p.
2. Национальная стратегия и План действий по сохранению и сбалансированному использованию биологического разнообразия в Республике Казахстан. Кокчетав, 1999.
3. Рябушкина Н. А., Абугалиева С. И., Турусбеков Е. К. Проблемы изучения и сохранения биоразнообразия флоры Казахстана // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. 2015. №3.
4. Chawla H. S. Introduction to plant biotechnology. New Delhi, 2002. P. 39.
5. Kaur R., Gautam H., Sharma D. R. A low cost strategy for micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) cv. Chandler // VII International Symposium on Temperate Zone Fruits in the Tropics and Subtropics-Part Two 696. 2003. P. 129-133.
6. Mohan R., Chui E. A., Biasi L. A., Soccol C. R. Alternative invitro propagation: use of sugarcane bagasse as a low cost support material during rooting stage of strawberry cv. Dover // Brazilian Archives of Biology and Technology. 2005. V. 48. P. 37-42. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000400005>
7. Jiménez-Bermudez S., Redondo-Nevado J., Muñoz-Blanco J., Caballero J. L., López-Aranda J. M., Valpuesta V., Mercado J. A. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene // Plant physiology. 2002. V. 128. №2. P. 751-759. <https://doi.org/10.1104/pp.010671>
8. Saikat G., Nirmal M., Das P. K. Field performance and molecular evaluation of micropropagated strawberry // Recent Research in Science and Technology. 2010. V. 2. №5. P. 12-16.
9. Reed B. M., Sarasan V., Kane M., Bunn E., Pence V. C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools // In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. 2011. V. 47. №1. P. 1-4. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9337-0>
10. Tripathi L., Tripathi J. N. Role of biotechnology in medicinal plants // Tropical journal of pharmaceutical research. 2003. V. 2. №2. P. 243-253. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v2i2.14607>
11. Введенский А. И. Род *Lagochilus* Bunge - Заячья губа // Флора Узбекистана. 1961. Т. 5. С. 364-373.
12. Цукерваник Т. И. Род *Lagochilus* Bunge // Определитель растений Средней Азии. Критический конспект флоры. Т. 9. Ташкент, 1987. С. 119-133.
13. Икрамов М. И. Род Лагохилус Средней Азии. Ташкент, 1976. 184 с.
14. Иващенко А. А., Котухов Ю. А. О редких видах лекарственных растений Западно-Алтайского заповедника // Ботаническое ресурсосведение: достижения и перспективы развития. 2000. С. 27-28.
15. Котухов Ю. А., Иващенко А. А., Лайман Дж. Флора сосудистых растений Западно-Алтайского заповедника. Алматы: Tethys, 2002. 108 с.

16. Haijun L., Bin G., Qiong Y., Yujun L., Chunchao L. Tissue cultures of four *Rhodiola* species // *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*. 2006. V. 26. №10. P. 2023-2027.
17. Tasheva K., Kosturkova G. Bulgarian golden root in vitro cultures for micropropagation and reintroduction // *Central European Journal of Biology*. 2010. V. 5. №6. P. 853-863. <https://doi.org/10.2478/s11535-010-0092-3>

References:

1. Convention on Biological Diversity (1992). United Nations.
2. Natsional'naya strategiya i Plan deistvii po sokhraneniyu i sbalansirovannomu ispol'zovaniyu biologicheskogo raznoobraziya v Respublike Kazakhstan (1999). Kokchetav. (in Russian).
3. Ryabushkina, N. A., Abugalieva, C. I., & Turuspekov, E. K. (2015). Problemy izucheniya i sokhraneniya bioraznoobraziya flory Kazakhstana. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, (3). (in Russian).
4. Chawla, H. S. (2002). Introduction to plant biotechnology. *New Delhi*, 39.
5. Kaur, R., Gautam, H., & Sharma, D. R. (2003, October). A low cost strategy for micropropagation of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cv. Chandler. In *VII International Symposium on Temperate Zone Fruits in the Tropics and Subtropics-Part Two* 696 (pp. 129-133).
6. Mohan, R., Chui, E. A., Biasi, L. A., & Soccol, C. R. (2005). Alternative invitro propagation: use of sugarcane bagasse as a low cost support material during rooting stage of strawberry cv. Dover. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 37-42. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000400005>
7. Jiménez-Bermudez, S., Redondo-Nevado, J., Munoz-Blanco, J., Caballero, J. L., López-Aranda, J. M., Valpuesta, V., ... & Mercado, J. A. (2002). Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant physiology*, 128(2), 751-759. <https://doi.org/10.1104/pp.010671>
8. Saikat, G., Nirmal, M., & Das, P. K. (2010). Field performance and molecular evaluation of micropropagated strawberry. *Recent Research in Science and Technology*, 2(5), 12-16.
9. Reed, B. M., Sarasan, V., Kane, M., Bunn, E., & Pence, V. C. (2011). Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(1), 1-4. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9337-0>
10. Tripathi, L., & Tripathi, J. N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 2(2), 243-253. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v2i2.14607>
11. Vvedenckii, A. I. (1961). Rod *Lagochilus* Bunge - Zayach'ya guba. In *Flora Uzbekistana*, 5, 364-373.
12. Tsukervanik, T. I. (1987). Rod *Lagochilus* Bunge. In *Opredelitel' rastenii Srednei Azii. Kriticheskii konspekt flory*, 9, Tashkent, 119-133.
13. Ikramov, M. I. (1976). Rod *Lagochilus* Srednei Azii. Tashkent.
14. Ivashchenko, A. A., & Kotukhov, Yu. A. (2000). O redkikh vidakh lekarstvennykh rastenii Zapadno-Altayskogo zapovednika. In *Botanicheskoe resursovedenie: dostizheniya i perspektivy razvitiya*, 27-28.
15. Kotukhov, Yu. A., Ivashchenko, A. A., & Laiman, Dzh. (2002). Flora sosudistyykh rastenii Zapadno-Altayskogo zapovednika. *Almaty*.
16. Haijun L., Bin G., Qiong Y., Yujun L., & Chunchao L. (2006). Tissue cultures of four *Rhodiola* species. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 26(10), 2023-2027.

17. Tasheva, K., & Kosturkova, G. (2010). Bulgarian golden root in vitro cultures for micropropagation and reintroduction. *Central European Journal of Biology*, 5(6), 853-863. <https://doi.org/10.2478/s11535-010-0092-3>

Работа поступила
в редакцию 15.08.2022 г.

Принята к публикации
19.08.2022 г.

Ссылка для цитирования:

Султонова К. Р., Кушиев Х. Х. Микроклональное размножение *Lagochilus inebrians* Bunge в условиях *in vitro* // Бюллетень науки и практики. 2022. Т. 8. №9. С. 79-85. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/82/11>

Cite as (APA):

Sultonova, K., & Kushiev, Kh. (2022). *Lagochilus inebrians* Bunge Microclonal Propagation Under *in vitro* Conditions. *Bulletin of Science and Practice*, 8(9), 79-85. (in Russian). <https://doi.org/10.33619/2414-2948/82/11>