

Масленников Андрей Викторович

канд. биол. наук, доцент, профессор
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

Масленникова Людмила Анатольевна

канд. биол. наук, доцент, профессор
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

Торутанов Павел Сергеевич

младший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

Черныш Ольга Михайловна

магистрант
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»
г. Ульяновск, Ульяновская область

DOI 10.31483/r-139099

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ МИКРОКЛОНИРОВАНИЯ РЕДКОГО
И ОХРАНЯЕМОГО ВИДА ЯСМЕННОКА ШЕРОХОВАТОГО
(*ASPERULA EXASPERATA* V. KRECH. EX KLOK.)**

Аннотация: в статье рассматриваются подходы к разработке методики микрклонального размножения редкого и охраняемого вида ясменника шероховатого (*Asperula exasperata* V. Krecz. ex Klok.) in vitro. Работа по отпра-

ботке методики получения каллусной культуры ясменника начата в 2024 году. В 2024 и 2025 годах из семенных и побеговых эксплантов *Asperula exasperata* V. Krecz. ex Klok. были получены каллусные культуры.

Ключевые слова: ясменник шероховатый, микрорепродукция, *in vitro*, фитогормоны, биотехнологические методы, каллус, среда Мурасиге-Скуга.

Ясменник шероховатый (*Asperula exasperata* V. Krecz. ex Klok.) – редкий эндемичный вид, который находится на северной границе своего ареала и охраняется ряде регионов Среднего Поволжья [4, с. 205].

При введении в культуру растений для сохранения большинства редких и охраняемых видов, относящихся к узколокальным эндемикам и реликтам, часто возникают проблемы с низкой приживаемостью проростков и молодых растений, плохой всхожестью семян, а также высокой зараженностью бактериями, вирусами и грибковыми заболеваниями [1, с. 28]. Поэтому для редких и исчезающих видов необходимо разрабатывать методы их быстрого воспроизводства, чтобы вернуть их в естественные экосистемы и успешно использовать для введения в культуру [2, с. 24].

В этом отношении метод клонального микроразмножения обладает рядом преимуществ по сравнению с традиционными методами размножения [3, с. 69].

При микрорепродукции ясменника шероховатого использовались общепринятые методы клонального размножения растений и универсальная твердая агаризованная питательная среда Мурасиге-Скуга, которая благодаря высокому содержанию неорганического азота – одного из ключевых питательных элементов для растений способствует хорошему развитию побеговых эксплантов [5, с. 27]. Азот в этой среде представлен в нитратной и аммонийной формах в оптимальном соотношении: $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ – 1:3, что способствует увеличению коэффициента размножения на 30% [6, с. 45].

Для отработки протокола микрорепродукции *in vitro* редкого и уязвимого вида ясменника шероховатого были высажены семенные и побеговые экспланты в условиях климатической камеры при температуре +26°C и

универсальном 16-часовом световом фотопериоде: 16 часов световой день + 8 часов ночь.

В качестве стерилизующего агента был использован гипохлорид натрия (6%), который затем смывался с эксплантов тремя порциями дистилитрованной стерилизованной воды. После стерилизации экспланты были высажены на твердую агаризованную среду Murashige-Skuga в стерильных условиях ламинар-бокса.

Посев ясменника шероховатого производился несколько раз в разные сроки и сезоны. Наилучшая выживаемость наблюдалась у пассажа, который высаживался осенью (см. таблицу 1). Первые признаки прорастания семян и адаптации побегов наблюдались через 3 недели.

Таблица 1

Прорастаемость семян ясменника шероховатого на среде Мурасиге-Скуга
и их общая всхожесть

Дата высадки семян	Общее число высаженных семян шт.	Число не проросших семян шт.	Число набухших и наклюнувшихся семян, не образовавших проростки шт.	Число проросших семян, образовавших полноценные проростки шт.	Общая всхожесть (%)
20.06.2024	16	13	1	2	12,5
09.10.2024	12	10	0	2	16,7

Результаты исследования показали, что общая всхожесть семян, высаженных на твердой агаризованной питательной безгормональной среде Мурасига-Скуга в разные сроки не очень высока и изменяется от 12,5 до 16,7% а в среднем составляет 14,6%, что показывает возможность, но сложность выращивания и размножения этого редкого и ценного лекарственного вида в условиях *in vitro* при использовании семенных эксплантов.

Высадка побеговых эксплантов *in vitro* показала, что общая приживаемость побеговых эксплантов, высаженных на твердой агаризованной питательной полной гормональной среде Мурасига-Скуга в разные сроки достаточно высока и изменяется от 80,0 до 86,7%, а в среднем достигает 83,4%, что показывает хо-

рошую возможность выращивания и размножения этого редкого и охраняемого вида в условиях *in vitro* при использовании побеговых эксплантов (табл. 2).

Таким образом, культивирование побеговых эксплантов ясменника шероховатого собранных из природных популяций показало, что на бедных меловых субстратах практически все растения этого вида обладают повышенной приживаемостью и побеговые экспланты, высаженные на питательную среду хорошо приживаются (приживаемость в среднем 83,4%) и легко образуют новые побеги, на которых могут закладываться прямо в условиях *in vitro* генеративные органы (бутоны и цветки).

Таблица 2

Приживаемость побеговых эксплантов ясменника шероховатого
на среде Мурасиге-Скуга

Дата высадки побеговых эксплантов	Общее число высаженных побеговых эксплантов шт.	Число не прижившихся побеговых эксплантов шт.	Число погибших побеговых эксплантов шт.	Число прижившихся побеговых эксплантов, образовавших полноценные растения шт.	Общая приживаемость (%)
20.06.2024	15	1	2	12	80,0
09.10.2024	15	1	1	13	86,7

Культивирование побеговых эксплантов ясменника шероховатого на среде Мурасиге-Скуга также показало, что образование каллусной ткани практически не происходит. Лишь небольшие полумикроскопические участки каллусной ткани размером до 0,2–0,3 мм образуются в местах отхождения придаточных корней от формирующегося нового растения. Однако такая каллусная ткань не разрастается, и на экспланте сразу начинаются процессы морфогенеза, в результате чего формируется новое растение с характерными для ясменника органами (рис. 1).



Рис. 1. А – активный рост экспланта, появление новых побегов и цветов (16 сутки культивирования); Б – общий вид; В – формирование каллуса (пятая неделя культивирования)

В заключение следует отметить, что разработка и оптимизация протокола микрклонального размножения *in vitro* редкого и охраняемого вида *Aspegula exaspegata* V. Krecz. ex Klok выявила, что для этого вида характерна твёрдосемянность и длительные сроки прорастания. Семена ясменника шероховатого, высаженные на твердую агаризованную питательную среду Мурасиге-Скуга (MS), прорастают только через 4 недели и их всхожесть невысока (в среднем 14,6%), что свидетельствует о сложности успешного выращивания и размножения этого редкого и охраняемого вида в условиях *in vitro* из семенных эксплантов.

Сравнение данных посадки семенных и побеговых эксплантов в разные сроки, показывает, что побеговые экспланты, взятые от взрослых растений ясменника более пригодны для микрклонального размножения, чем семена, так как приживаемость побеговых эксплантов и получение от них новых растений составляет в среднем 83,4%, то есть почти в шесть раз выше, чем получение молодых растений из семенных эксплантов.

При выращивании ясменника шероховатого *in vitro* выяснено, что на питательной среде при типичной концентрации фитогормонов ауксинов и цитокининов в обычной концентрации (ИУК – 0,5 мг/л и кинетин – 1 мг/л) образование полноценного пригодного для микрклонального размножения каллуса практически не

происходит, а идет прямой органогенез, при котором развитие корней и почек происходит из клеток экспланта, что может объясняться с одной стороны, меньшей активностью меристем у данного вида и невозможностью образования каллусов, а с другой стороны, возможной необходимостью подбора других, отличных от применяемых в опыте концентраций фитогормонов, индуцирующих каллусогенез.

Таким образом, данные подтверждают возможность эффективного размножения этого вида в условиях *in vitro*, что может способствовать его сохранению и восстановлению в естественных экосистемах.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
2. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений / Т.И. Дитченко. – Минск: БГУ, 2007. – 102 с. EDN TKVDIB
3. Егорова Т.А. Основы биотехнологии: учеб. пособие для вузов по спец. «Биология» / Т.А. Егорова, С.М. Клунова. – М.: Академия, 2003. – 207 с. EDN QNDNQX
4. Красная книга Ульяновской области / под науч. ред. Е.А. Артемьевой, А.В. Масленникова, М.В. Корепова; Правительство Ульяновской области. – М.: Буки Веди, 2015. – 550 с.
5. Сельскохозяйственная биотехнология / под ред. В.С. Шевелухи. – М., 2003. – 416 с.
6. Тимофеева О.А. Клональное микроразмножение растений / О.А. Тимофеева, Ю.Ю. Невмержицкая. – Казань: Казанский университет, 2012. – 56 с.