



УДК: 631.523.5:581.6

Хулкар ХАЛБЕКОВА,

Д.б.н., института Биоорганической химии им. академика А.С. Садыкова, АНРУз

E-mail: xalbekova.x@mail.ru

На основе рецензии А.Г.Шеримбетова, д.б.н., профессор ИГ и ЭБР АНРУз

REGENERATION CAPACITY OF *SALSOLA RICHTERI* DURING *IN VITRO* CULTURE INITIATION

Annotation

This study evaluates the regeneration capacity of the halophytic species *S. richteri* during its introduction into *in vitro* culture. The work presents results on seed sterilization, germination, callus induction, and morphogenesis on various nutrient media supplemented with plant growth regulators.

Key words: *in vitro* culture, regeneration capacity, plant growth regulators, morphogenesis, halophytes.

SALSOLA RICHTERI TURINING *IN VITRO* SHAROITIDAGI REGENERATSIYA QOBILIYATI

Annotatsiya

Ushbu tadqiqot *Salsola richteri* turining *in vitro* sharoitida regeneratsiya qobiliyatini baholashga bag'ishlangan. Ushbu tadqiqotda urug'lik materialini sterilizatsiya qilish, uning unib chiqishi, kallus induksiyasi va morfogenez jarayonlari fitogormonlar qo'shilgan turli oziqa muhitlarida o'rganilgan

Kalit so'zlar: *in vitro*, regeneratsiya qobiliyati, fitogormonlar, morfogenez, galofitlar.

РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ *SALSOLA RICHTERI* ПРИ ВВЕДЕНИИ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Аннотация

Настоящее исследование посвящено оценке регенерационной способности галофитного вида *Salsola richteri* при введении в культуру *in vitro*. В работе представлены результаты по стерилизации семенного материала, прорастанию, индукции каллуса и морфогенезу на различных питательных средах с добавлением фитогормонов.

Ключевые слова: *in vitro*, регенерационная способность, фитогормоны, морфогенез, галофиты.

Введение. *Salsola richteri* (Рихтерова солянка) - многолетний кустарник семейства *Chenopodiaceae* (*Amaranthaceae*), широко распространенный в Центральной Азии, включая Узбекистан, Туркменистан, Казахстан и Таджикистан. Это растение характеризуется высокой засухоустойчивостью, соле- и жаростойкостью, что делает его ценным объектом для изучения адаптивных механизмов растений к экстремальным условиям. Кроме того, *S. richteri* играет важную роль в экосистемах, участвуя в стабилизации песков и служат кормом для скота [1; 2].

S. richteri в культуру *in vitro* представляет собой эффективный метод для сохранения генофонда, изучения физиологических и биохимических особенностей растения, а также для разработки методов микрореклонального размножения и генетической трансформации. Однако, несмотря на значительный интерес к этому виду, разработка эффективных протоколов культуры *in vitro* для *S. richteri* остается ограниченной.

Обзор литературы. Род *Salsola* представляет собой важную группу галофитов, обладающих высокой экологической и хозяйственной ценностью. В частности, *Salsola richteri* выделяется своей засухо- и солеустойчивостью, мощной корневой системой и приспособленностью к экстремальным условиям пустынь. В последние десятилетия, благодаря внедрению молекулярно-филогенетических подходов, было уточнено положение ряда видов, включая *Salsola richteri*. Этот вид, в некоторых классификациях, перенесён в род *Xylosalsola*, под названием *Xylosalsola richteri* (Моq.) Akhani & Roalson, в связи с особенностями морфологии и генетическими данными [3]. Несмотря, на имеющиеся достижения, биотехнологические исследования этого вида пока ограничены, что создаёт широкий простор для дальнейших научных разработок в области селекции, молекулярной биологии и устойчивого землепользования. Исследования по биотехнологии *Salsola richteri* находятся на ранней стадии. Однако его устойчивость к экстремальным условиям делает вид перспективным для: создания модельных систем по изучению солеустойчивости, разработки тканевых культур и *in vitro* - технологий, возможной генетической трансформации с целью повышения устойчивости других культур.

Целью настоящего исследования является разработка и оптимизация протокола введения *S. richteri* в культуру *in vitro*, включая стерилизацию семян, прорастание, индукцию каллуса и регенерацию побегов.

Материал и методы. Семена *Salsola richteri* были собраны в естественных условиях на территории Южного Приаралья (Каракалпакстан), в окрестностях Рыбачьего залива. Для исследования использовались зрелые семена, собранные в конце октября 2024 года.

Стерилизация семян. Для предотвращения микробного загрязнения семена прошли многоступенчатую стерилизацию [4]:

1. Промывка в проточной воде в течение 30 минут.
2. Обработка 70% этанолом в течение 30 секунд.
3. Обработка 0,5% раствором гипохлорита натрия с добавлением 1-2 капель Твина-20 в течение 10 минут.
4. Трёхкратное промывание стерильной дистиллированной водой.

Посев и условия культивирования. Стерилизованные семена высевались на питательную среду Мурасиге и Скуга (MS) без добавления фитогормонов. Культивирование проводилось в климатической камере при температуре $24 \pm 2^\circ\text{C}$, фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота) и освещенности $40 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$.

Индукция каллуса и регенерация побегов. Для индукции каллуса использовали различные концентрации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D) и бензиладенина (BAP) на питательной среде Мурасиге и Скуга (MS). Экспланты культивировали при стандартных условиях - температура $25 \pm 2^\circ\text{C}$, фотопериод 16 часов света и 8 часов темноты, а также относительная влажность воздуха около 60–70%. Продолжительность индукции каллуса составляла 3–4 недели, после чего оценивали степень каллообразования и морфогенетическую активность.

Для регенерации побегов использовали среду MS с добавлением бензиладенина (BAP) и Кинетина (Кин) в различных концентрациях. Условия культивирования при этом сохранялись неизменными. Кроме того, для стимуляции роста и дифференцировки побегов применялась среда Woody Plant Medium (WPM) с варьированием концентраций фитогормонов, что позволило выявить оптимальные параметры для эффективной регенерации. Продолжительность этапа регенерации составляла 4–6 недель, с регулярным контролем развития побегов.

Данные методы обеспечили формирование высококачественного каллуса и эффективную регенерацию побегов, что является важным этапом для последующего микрклонального размножения и биотехнологического использования галофитного вида *Salsola richteri*.

Статистические данные. Оценка всхожести семян, скорости прорастания, индекса каллусообразования и процента регенерации побегов проводилась через 7, 14 и 21 день после посева. Результаты анализировались с использованием статистического пакета SPSS, применяя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Результаты и их обсуждение. Процесс стерилизации семян показал, что оптимальное время обработки семян гипохлоритом натрия составляет 10 минут. При этом наблюдается высокая всхожесть семян (80–85%) без признаков микробного загрязнения. Увеличение времени обработки до 15 минут приводит к снижению всхожести из-за повреждения семенной оболочки.

Процесс прорастания семян на среде MS без фитогормонов начался через 7–10 дней после посева. Максимальная всхожесть (90%) была достигнута при температуре 24°C и освещенности $40 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$. При повышении температуры до 30°C наблюдается снижение всхожести до 35%.

Индукция каллуса из листовых и стеблевых эксплантов была успешной при добавлении 2,4-D в концентрации 2,0–4,0 мг/л в среду MS. Максимальный индекс каллусообразования (75%) был достигнут при концентрации 3,0 мг/л 2,4-D. Добавление BAP в концентрации 0,5 мг/л способствовало увеличению объема каллуса и ускорению его роста.

Регенерация побегов из каллуса была успешной при добавлении BAP в концентрации 1,0 мг/л и IAA в концентрации 0,5 мг/л в среду MS. Максимальный процент регенерации побегов (60%) был достигнут через 21 день после переноса каллуса на регенерационную среду.

Разработанный протокол введения *S. richteri* в культуру *in vitro* позволяет эффективно получать стерильные растения, каллус и регенерированные побеги. Полученные данные согласуются с результатами других исследований, где для индукции каллуса и регенерации побегов у представителей семейства *Chenopodiaceae* применялись ауксины (в частности, 2,4-D) в сочетании с цитокининами (BAP или кинетин). Например, аналогичные подходы использовались для видов р. *Salsola*, *Chenopodium* и *Suaeda*, демонстрируя высокую эффективность формирования каллусной массы при применении 2,4-D в диапазоне от 2 до 4 мг/л [5; 6; 7; 8; 9].

Поскольку *S. richteri* многолетний кустарник для его дальнейшего развития использовали питательную среду WPM+0,5 мг/л 6-БАП+0,5 мг/л кинетин. В этих двух экспериментальных средах уровень индукции кластера пазушных почек достигал 80%, а интенсивность побегообразования через 30 дней было 1,5 раза больше по сравнению первоначального культивирования (см. табл.). Проведенные исследования показали, что для осевых органов *Salsola richteri* характерен интенсивный рост в течение первых 15 суток после прорастания. Эта особенность рассматривается как важный адаптивный признак, способствующий быстрому укоренению проростков в условиях *in vitro*.

Таблица

Морфогенетический потенциал на различных питательных средах

Виды питательных сред	Коэффициент размножения, шт/эксплант
MS без гормонов (контроль)	18±1,9
	19±2,1
	22±2,6
	19±1,8
	19±1,9
Σ	97
V	1,35
MS, 0,5 мг/л 6-БАП, 0,5 мг/л Кинетин	12±0,8
	9±0,6
	5±0,5
	6±0,7
	5±0,6
Σ	37
V	2,72
WPM 0,3 мг/л 6-БАП 0,2 мг/л Кинетин	19±2,5
	19±0,6
	22±2,5
	26±1,8
	24±1,4
Σ	110
V	2,75
WPM 0,5 мг/л 6-БАП 0,5 мг/л Кинетин	30±2,5
	24±1,4
	30±2,5
	28±2,1
	26±1,8
Σ	138

***Salsola richteri*, n=30**

Быстрое формирование первичной корневой системы и удлинение гипокотилия создают благоприятные условия для последующей регенерации и роста растений в искусственной среде, что особенно важно для галофитных видов, адаптированных к экстремальным условиям произрастания.

В качестве исходного растительного материала (эксплантов) использовали сегменты ассимиляционных побегов (ветвей) диаметром около 1,2 см, полученные от семян возрастом около одного месяца. Отбор проводился на стадии активного морфогенеза, что позволило обеспечить высокую жизнеспособность тканей и стабильный отклик на воздействие фитогормональных стимулов.

Следует отметить, что успешная стерилизация семян оказалась критическим этапом, от которого напрямую зависит дальнейшая жизнеспособность проростков. Повреждение оболочки при избыточной стерилизации, вероятно, нарушает целостность тканей зародыша, что влечет за собой снижение прорастания. Наши результаты подтверждают выводы ранее опубликованных работ, в которых подчеркивалась необходимость точного подбора концентрации и времени воздействия гипохлорита натрия [3; 4; 5; 6; 7].

Экспериментально установлено, что наиболее эффективной питательной средой как для первичной индукции роста, так и для пролиферации пазушных почек, является модифицированная среда MS, дополненная 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л кинетина. Такая комбинация цитокининов стимулировала формирование побегов с высокой частотой, обеспечивала развитие плотных и жизнеспособных структур без признаков гиперпролиферации или некроза. Применение данной среды позволило достичь устойчивой и воспроизводимой регенерации побегов, что представляет собой важный шаг в разработке протоколов микрোকлонального размножения *S. richteri*.

Полученные результаты подтверждают высокую регенерационную способность данного вида в условиях *in vitro* и открывают перспективы для его использования в программах по сохранению, селекции и фиторекультивации засоленных территорий.

Важно отметить и то, что *S. richteri*, как и большинство ксерофитов, демонстрирует устойчивость к осмотическому стрессу, что может быть использовано при моделировании солевого и водного стресса *in vitro*. Использование культуры клеток и тканей в контролируемых условиях позволяет получать стандартизированные данные по биохимической и физиологической реакции растения на воздействие абиотических стрессоров, таких как соли или тяжелые металлы [8]. Интерес вызывает также возможность применения культуры *in vitro* для оценки аллелопатической активности *S. richteri*. Ранее было показано, что представители рода *Salsola* содержат вторичные метаболиты с антимикробной и антиоксидантной активностью. При этом применение клеточных суспензий и каллусной ткани может упростить получение и скрининг таких соединений без необходимости сбора дикорастущего материала. Также культура *in vitro* открывает путь к криосохранению генофонда *S. richteri*.

В условиях деградации пустынных экосистем и антропогенного давления, разработка эффективных протоколов микрোকлонального размножения и долгосрочного хранения (например, с использованием жидкого азота) становится особенно актуальной. Примеры успешной криоконсервации у других пустынных растений (например, *Zygophyllum spp.* и *Atriplex halimus*) демонстрируют перспективность данного направления.

Кроме того, учитывая возможность гибридизации внутри рода *Salsola*, перспективным направлением может стать использование *in vitro* культуры для создания межвидовых гибридов и последующего отбора линий с улучшенными адаптивными признаками.

Заключение. Несмотря на достигнутые положительные результаты в направлении биотехнологического использования галофитов, исследование выявило ряд ограничений, требующих дальнейшего внимания. Необходимо провести дополнительные исследования по оценке стабильности морфогенеза при длительном культивировании *in vitro*, что имеет принципиальное значение для сохранения фенотипических и физиологических характеристик растений при масштабном размножении. Отсутствие данных о генетической стабильности *in vitro*-производимого материала также ограничивает широкое внедрение данных методов в практику восстановления нарушенных экосистем.

Устранение обозначенных ограничений позволит существенно повысить эффективность восстановления деградированных территорий за счёт внедрения надёжных и устойчивых биотехнологических решений на основе местных видов галофитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Toderich K.N., Masseno I., Rabimov A. & Nurmetov D. Prospects for introduction and cultivation of non-conventional halophytes and salt tolerant crops of CBA germplasm under saline environments of Central Asian countries. – Tashkent: ICARDA, 2007. – P 28-29.
2. Shomurodov Kh., Rakhimova T., Adilov B., Beshko N., Karimov F., Polvonov F. Current state of vegetation of the dried bottom of the Aral Sea// IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science, 2021. – V.629. – P. 80-85. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/629/1/012085>.
3. Almerikova Sh., Yermagambetova M., Osmonali B., Vesselova P., Turuspekov Y., Abugaliev S. Complete Plastid Genome Sequences of Four Salsoleae s.l. Species: Comparative and Phylogenetic Analyses. *Biomolecules*, 2024. 14(8), 890. <https://doi.org/10.3390/biom14080890>.
4. Murashige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures//*Physiol. Plant.*, 1962. – №15(3). – P. 473 – 497.
5. Yungere Oyunbileg, Tserendagva Munkhtsetseg, Shimada Takiko. Shoot induced by organogenic callus of *Salsola laricifolia* TURCZ. EX. *LITV.// Botany*, 2011. – P. 1-11.
6. Stefaniak B., Wozny A., and Li. V. Plant micropropagation and callus induction of some annual *Salsola* species// *Biologia Plantarum*, 2003. – № 46(2). – P. 305-308.
7. Samar S. A. Murshid. Genus *Salsola*: Chemistry, Biological Activities and Future Prospective a Review//*Plants*, 2022. – №11(6). – P. 710-714. <https://doi.org/10.3390/plants11060714>
8. Nandwani D. *In vitro* micropropagation of a tree legume adapted to arid lands *Acacia tortilis* subsp *raddiana*. *Annales des sciences forestières// INRA/EDP Sciences*, 1995. – № 52 (2). – P. 183-189. hal- 00882990183-189.
9. Khalbekova H.U. Carbohydrate composition at different salt concentrations of halophytes under *in vitro* conditions //Abstracts of International Conference on Environmental impacts of the desiccation of the Aral Sea. – Tashkent, 22 April, 2024. – P. 577-582.