

Таким образом, изучение радиозащитных свойств семейства *Lamiaceae* представляется крайне важным, поскольку данные сведения можно будет использовать в радиотерапии, радиодиагностике, радиофармацевтической промышленности.

Библиографический список

1. Shimo K., Masuda S., Shen B., et al. Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice // Mutation Research/Fundamental and Molecular mechanisms of mutagenesis. – 1996. – Т. 350. – № 1. – С. 153-161.
2. Samarth R. M., Goyal P. K., Kumar A. Modulatory effect of *Mentha piperita* (Linn.) on serum phosphatases activity in Swiss albino mice against gamma irradiation. – 2001.
3. Mahendran G., Rahman L.U. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on Peppermint (*Mentha × piperita* L.) – A review // Phytotherapy Research. – 2020. – Vol. 34. – № 9. – P. 2088-2139.
4. Wadikar D.D., Patki P.E. *Coleus aromaticus*: a therapeutic herb with multiple potentials // Journal of food science and technology. – 2016. – Vol. 53. – № 7. – P. 2895-2901.
5. Chacko T., Menon A., Majeed T., et al. Mitigation of whole-body gamma radiation-induced damages by *Clerodendron infortunatum* in mammalian organisms // Journal of Radiation Research. – 2017. – Vol. 58. – № 3. – С. 281-291.
6. Arami S., Ahmadi A., Haeri S.A. The radioprotective effects of *Origanum vulgare* extract against genotoxicity induced by ¹³¹I in human blood lymphocyte // Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals. – 2013. – Vol. 28. – № 3. – P. 201-206.

УДК 57.085.23

ТЕХНОЛОГИЯ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ АМОМУМ LONGILIGULARE

Кухат Ван Куэт аспирант кафедры биотехнологии, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, преподаватель, Ханойский педагогический университет, факультет биологии и сельского хозяйства (Вьетнам, Ханой), khuatquyetst@gmail.com

Киракосян Рима Нориковна, доцент, к.б.н., доцент кафедры биотехнологии, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, mia41291@mail.ru

Научный руководитель: **Калашикова Елена Анатольевна**, профессор, д.б.н., профессор кафедры биотехнологии, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, kalash0407@mail.ru

Аннотация: Приводятся результаты по оптимизации условий культивирования амомум пурпурного (*Anotum longiligulare* T.L. Wu) на разных этапах клонального микроразмножения. Показана зависимость микроразмножения от гормонального состава питательной среды.

Ключевые слова: амомум, *in vitro*, морфогенез, клональное микроразмножение

Лекарственные растения широко применяются в здравоохранении с незапамятных времен. Во всем мире проводятся исследования по проверке их биологической активности и эффективности использования при лечении различных заболеваний. Полученные результаты приводят к созданию и производству новых лекарств на растительной основе. Стоимость мирового рынка лекарственных растительных продуктов превышает 100 миллиардов долларов США в год. По данным Всемирной организации здравоохранения, примерно 80% населения земного шара зависит от традиционных систем здравоохранения в сочетании с натуральными продуктами.

Амомум пурпурный (*Amomum longiligulare* T.L. Wu), относящийся к семейству Имбирные (Zingiberaceae), является ценным лекарственным растением во Вьетнаме [2-4]. Плоды амомума содержат эфирные масла со многими ценными химическими соединениями, такими как камфен, β -пинен, лимонен, камфара; борнеол и сапонины [5,7]. Эфирное масло амомума обладает антибактериальным, противогрибковым, активирующим действие на макрофаги и укрепляющим иммунитет действием. В настоящее время протокол для клонирования *A. longiligulare* не разработан, поэтому исследования для данной культуры остаются актуальными.

Исходя из выше изложенного, цель исследования – разработать высокоэффективную технологию клонального микроразмножения *A. longiligulare*.

Материалы и методы. Зрелые растения пурпурного амомума были собраны в лесу на скалистой горе (около 22°46'08,9" северной широты и 104°59'18,4" восточной долготы) в деревне Ланг Кунг, коммуна Дао Дык, район Ви Сюйен, провинция Хагьянг, Вьетнам, в августе 2020 года.

Первичным эксплантом служили кусочки корневища с пазушными почками (3-4 см в длину). Перед введением в культуру *in vitro* корневища очищали от чешуйчатых листьев, затем их промывали водопроводной водой с мылом (60 минут), а затем в условиях ламинар-бокса изолировали пазушные почки. Почки промывали 70%-ным этанолом в течение 1 минуты, после чего стерилизовали водным раствором хлорида ртути [HgCl_2 : 0,05% или 0,1% (по массе)] или гипохлорита кальция [$\text{Ca}(\text{OCl})_2$: 5% или 10% (по массе)] в течение 4, 8 или 12 минут соответственно. Затем эксплантаты четыре раза промывали стерильной дистиллированной водой и дополнительно обрезали перед переносом во флаконы для культивирования.

Эксплантаты культивировали на базальной среде Murashige и Skoog (MS) [6], в которую для инициации культивирования добавляли индивидуально различные концентрации 6-бензиламинопурина (БАП: 0,5-3,0 мг/л) и кинетина (Кп: 0,5-3,0 мг/л). В качестве контроля служила среда без регуляторов роста.

Для размножения применяли среды с БАП или кинетином в сочетании с НУК 0,25 и 0,5 мг/л. Укоренение микропобегов осуществляли на питательной

среде MS, содержащей ИМК или НУК в концентрации 0,25-1,0 мг/л. Во всех экспериментах в качестве контроля служила среда без регуляторов роста.

Выращивание растений проводили в условия световой комнаты, где поддерживается 16-ти часовой фотопериод, температура 22-25⁰С и освещение люминесцентными лампами с интенсивностью освещения 5 тыс.лк.

Все исследования *in vitro* проводили в соответствии с методическими рекомендациями, разработанными на кафедре биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева [1].

В дальнейшем, укорененные микропобеги высотой 4,0-5,0 см с 3-4 листьями переносили в почвенный субстрат для адаптации. Для этого с колбы, в которой были сформированы микроклоны, снимали крышку и оставляли в таком положении на двое суток. После этого микроклоны извлекали из питательной среды, тщательно промывали корневую систему проточной водопроводной водой и затем обрабатывали 0,5%-ным раствором Бавистина в течение 10 минут. Последняя операция была необходима для предотвращения грибкового заражения. Далее микроклоны были перенесены в почвенный субстрат. В эксперименте использовали два типа почвы: грунт универсальный (производитель «Garden star»), содержащий питательные вещества (мг/100 л) N-300, P-300, K-400 и биогрунт (производитель «Фаско»), состоящий из высокогорного и низинного торфа, песка, биогумуса, доломитовой муки и полного минерального удобрения. Выживаемость микроклонов учитывали через 1 и 3 месяца после пересадки в условия *ex vitro*.

Средние значения всех данных были рассчитаны с использованием Microsoft office Excel 2010. Дисперсионный анализ (ANOVA) выполнялся с использованием Sirichai Statistics 7.0, а средние значения сравнивались с использованием LSD с уровнем вероятности 0,05.

Результаты и обсуждение. Применение в качестве стерилизующего агента HgCl₂ и Ca(ClO)₂ приводило к получению асептических культур с разной эффективностью. Так, исследования показали, что при увеличении концентрации и времени стерилизации эксплантов Ca(ClO)₂ повышается эффективность получения асептических эксплантов с 2,2% до 17,8%. При использовании 10% Ca(ClO)₂ выживаемость эксплантов составила 15,6% при экспозиции 8 минут и 17,8% -при экспозиции 12 минут. Однако эти режимы стерилизации было не оптимальными, так как наилучшие результаты были получены при использовании HgCl₂. Максимальный выход асептических эксплантов (53,3%) и самая высокая выживаемость (35,6%) были получены при использовании 0,1% раствора HgCl₂ с экспозицией воздействия 12 минут.

Полученные асептические культуры в дальнейшем культивировали на питательных средах с различным содержанием цитокининов. Исследования показали, что в контрольном варианте (безгормональная среда) эксплантаты обладали очень низкой способностью к регенерации побегов (в среднем 0,18 побег/эксплант). В то время как при использовании питательной среды дополненной 1,0 мг/л БАП, коэффициент размножения увеличивался и составил в среднем 1,04 побег/эксплант. В этом варианте формировались

хорошо развитые побеги с ярко зелеными листьями. При увеличении концентрации БАП с 1,5 до 3,0 мг/л коэффициент размножения уменьшался и формировались недоразвитые побеги. Вышеуказанные результаты могут быть обусловлены высокой концентрацией БАП в питательной среде. Аналогичные результаты были также зарегистрированы и на среде MS, дополненной кинетином. Добавление в состав питательной среды ауксина НУК оказывало существенное влияние на коэффициент размножения. Так, при совместном использовании БАП (1,5 мг/л) и НУК (0,25 мг/л) коэффициент размножения увеличился и составил 5,96 побегов/эксплант. При совместном использовании кинетина (1,5 мг/л) и НУК (0,25 мг/л) коэффициент размножения увеличился и составил 5,56 побегов/эксплант.

На последнем этапе клонального микроразмножения необходимо добиться получения укорененных микропобегов. Для этого используют ауксины. Исследования показали, что применение ИМК или НУК в концентрации 0,5 мг/л приводило к 100% укоренению микропобегов и формированию хорошо развитой корневой системой. Такие растения в дальнейшем хорошо переносили адаптацию к условиям *ex vitro*.

Таким образом, на основании проведенных исследований был разработан протокол клонального микроразмножения *A. longiligulare*, позволяющий получать с высокой эффективностью высококачественный, генетически однородный посадочный материал.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2022-746 от 13 мая 2022 года (внутренний номер МК-3084.2022.1.4) о предоставлении гранта в виде субсидии из Федерального бюджета Российской Федерации в рамках гранты Президента Российской Федерации на государственную поддержку молодых российских ученых - кандидатов наук, докторов наук и ведущих научных школ Российской Федерации при, а также при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2020-905 от 16 ноября 2020 года о предоставлении гранта в виде субсидии из федерального бюджета Российской Федерации. Грант был предоставлен для государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Библиографический список

1. Калашникова Е.А., Чередниченко М.Ю., Киракосян Р.Н. Основы биотехнологии. 2022, Москва:КНОРУС, 278 с.
2. Anh T.T., Ngoc, N.B., Phuc N.D., Nhat D.D., Danh, P.H., Bach L.G. Essential oil from *Amomum longiligulare* T.L. Wu cultivated in Ninh Thuan province, Vietnam. // In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. **2020**, 991(1), p. 012113.
3. Chau L., Thang T.D., Huong L.T., Ogunwande I.A. Constituents of essential oils from *Amomum longiligulare* T.L. Wu from Vietnam. // Chemistry of Natural Compounds. **2015**, 51(6), 1181-1183.

4. Li W., Wang, J.P., Shigematsu M.; Lu G.Z. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Amomum Tsao-Ko* cultivated in Yunnan area. // *Advanced Materials Research*. **2011**, 183, p. 910-914.

5. Loi D.T. Vietnamese medicinal plants and herbs. Medical Publishing House: Hanoi, Vietnam, 2001; pp. 400-408.

6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. // *Physiol. Plant*. **1962**, 15, 473-497.

7. Nguyen D.M., Ngo V.T., Do T.H.V., Le N.T. Study of chemical composition of *Amomum longiligulare* T.L. Wu seeds. // *Journal of Science, Technology and Food*. **1994**, 390(12), 464-465.

УДК 58.085

ОБЗОР МЕТОДИК ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ БАТАТА

Сумин Антон Вадимович, аспирант кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, sumin.anton1997@gmail.com

Киракосян Рима Нориковна, доцент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, r.kirakosyan@rgau-msha.ru

Аннотация: в данной статье произведен анализ данных об эффективном выделении протопластов батата (*Ipomoea batatas* L.). Рассмотрены основные составляющие методик. Приведены протоколы выделения, которые могут быть применены на изучаемой культуре.

Ключевые слова: батат, протопласты, выделение протопластов.

Исследования по выделению протопластов батата *Ipomoea batatas* L велись с конца двадцатого века (Wu and Ma 1979, Kobayashi *et al.* 1990 и др.) [1]. Протопласты являются удобным объектом для использования в различных научных целях, таких как слияние протопластов, трансфекция и проверка наличия транзгентной экспрессии.

Важный шаг в процессе выделения протопластов – это выбор первичного экспланта. Так, в качестве эксплантов используют стерильные части стебля, черешков и листьев. Большое значение уделяется возрасту растительного материала. В исследовании Belarmino *et al.* (1996) сообщается, что молодые листья являются лучшим источником жизнеспособных протопластов, чем более зрелые листья, поскольку имеют более высокую плотность и жизнеспособность [1].

В работе Belarmino *et al.* (1994) в качестве материала использовали стерильные черешки и стебли *I. batatas* L и *I. lacunosa* L, которые нарезались на части 2-3мм длиной [2]. А в более позднем исследовании J.M.Guo *et al* используются стерильные молодые листья трехнедельного возраста, которые нарезаются на полоски 2x2мм [3].

Перед этапом расщепления клеточной стенки, экспланты подвергают плазмолизу. Так, в исследовании Belarmino *et al* используется раствор для