

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА КРЫМА

Тевфик А.Ш., Егорова Н.А.

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ТИМЬЯНА ОБЫКНОВЕННОГО *IN VITRO*



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ «НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОГО
ХОЗЯЙСТВА КРЫМА»

**КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ
ТИМЬЯНА ОБЫКНОВЕННОГО *IN VITRO***
(Методические рекомендации)

Симферополь
ИТ «АРИАЛ»
2021

УДК 633.81:57.085.2

ББК 64

Т 29

DOI 10.33952/2542-0720-978-5-907506-42-8

*Методические рекомендации печатаются по решению Ученого совета
ФГБУН «НИИСХ Крыма» (протокол № 2 от 29.03.2021)*

Рецензенты:

Н.П. Демченко, доктор биологических наук, ФГБУН «НИИСХ
Крыма»;

И.А. Павлова, кандидат биологических наук, ФГБУН «ВНИИ ВиВ
«Магарач» РАН».

Тевфик А.Ш.

Т 29 Клональное микроразмножение тимьяна обыкновенного *in vitro* :
методические рекомендации / А.Ш. Тевфик, Н.А. Егорова. –
Симферополь : ИТ «АРИАЛ», 2021. – 28 с.

ISBN 978-5-907506-42-8

В методических рекомендациях изложены приемы клонального микроразмножения *Thymus vulgaris* L., разработанные в лаборатории биотехнологии ФГБУН «НИИСХ Крыма». Описаны приемы стерилизации растительного материала при введении в асептическую культуру, субкультивирования при микроразмножении *in vitro*, укоренения полученных микропобегов и их адаптации *ex vitro*. Использование данных методических подходов позволяет получить коэффициент размножения до 1:12,8, и высокую частоту укоренения *in vitro* (98,3%) и адаптации *ex vitro* (93,5%) размноженных растений.

Методические рекомендации предназначены для специалистов в области биотехнологии, селекции и семеноводства, физиологии растений. Пособие может быть также использовано для студентов и аспирантов, изучающих сельскохозяйственную биотехнологию в высших учебных заведениях.

Библ. 32

УДК 633.81:57.085.2

ББК 64

ISBN 978-5-907506-42-8

© Тевфик А.Ш., Егорова Н.А., 2021

© ИТ «АРИАЛ», макет, оформление, 2021

ВВЕДЕНИЕ

Применение современных клеточных технологий, позволяет повысить эффективность селекции и семеноводства растений и перейти к высокопродуктивному сельскохозяйственному производству. Клональное микроразмножение является одним из наиболее востребованных биотехнологических приемов, которое имеет много преимуществ по сравнению с традиционными методами семенного или вегетативного размножения – получение генетически однородного посадочного материала, оздоровление растений от различных инфекций, высокий коэффициент размножения, преодоление сезонности производства, ускорение селекционного процесса и другие [2; 5-7].

У большинства видов растений чаще всего используется метод активации развития меристем при введении в культуру *in vitro* верхушечных или пазушных почек. Это позволяет с наибольшей вероятностью получить генетически стабильный материал [1; 7; 8]. Основными этапами технологии клонального микроразмножения являются: введение в асептическую культуру; собственно микроразмножение (которое можно осуществлять при использовании нескольких методов – микрочеренкования основного побега или индукции адвентивных побегов); укоренение *in vitro* и адаптация *ex vitro* [3, 9].

Несмотря на достаточно хорошую изученность многих вопросов размножения *in vitro* для основных сельскохозяйственных и цветочно-декоративных культур, для каждого нового вида растения часто необходимо разрабатывать новые или усовершенствовать существующие методики.

Многие виды рода *Thymus* L. являются ценными лекарственными и ароматическими растениями, содержащими биологически активные вещества, которые оказывают антиоксидантное, обезболивающее, отхаркивающее и иммуномодулирующее действие [12; 19; 20]. Лекарственные препараты на основе тимьяна применяются при расстройствах пищеварения, метеоризме, простудных заболеваниях, гриппе, воспалительных заболеваниях органов дыхания, нервных расстройствах, при заболеваниях кожи или ротовой полости [21; 26].

При анализе зарубежных публикаций по изучению тимьяна в культуре *in vitro* следует отметить, что большая часть касается видов, которые не встречаются в России: *T. mastichina* [28], *T. moroderi* [27], *T. bleicherianus* [31], *T. persicus* [22], *T. leucotrichus* [23], *T. syriacus*, *T. fruticosus*, *T. majorana*, *T. capitatus* [20]. Имеются сведения об исследованиях по клональному микроразмножению с использованием первичных эксплантов из проростков *T. vulgaris* L. [24; 25]. Однако применение семян в качестве исходного экспланта при культивировании *in vitro*, как правило, не позволяет получить генетически стабильный посадочный материал и сохранить ценные признаки сорта. Кроме того, сведения о приемах микроразмножения *in vitro* у разных видов тимьяна достаточно противоречивы. Отсутствие единых методик размножения *in vitro* этой культуры ограничивает применение уже опубликованных биотехнологических схем при работе с новыми видами или сортами.

При введении в культуру *in vitro* и дальнейшем культивировании исследователи часто сталкиваются с проблемами, в частности, с высокой контаминацией и низкой приживаемостью эксплантов, витрификацией побегов, снижением морфогенетического потенциала при длительном субкультивировании и низким коэффициентом размножения [30; 31].

В ФГБУН «НИИСХ Крыма» проводится комплекс исследований, связанных с разработкой приемов выращивания и переработки растительного сырья, а также с созданием новых сортов тимьяна, обладающих рядом полезных признаков. Сотрудниками лаборатории биотехнологии научно-исследовательского института изучено влияние генотипа, типа экспланта, гормонального состава питательной среды и условий культивирования на развитие микропобегов на 1-3 этапах микроразмножения *in vitro* *T. vulgaris* L. [13-18, 32]. В результате исследований была разработана методика клонального микроразмножения для этого вида тимьяна.

1. ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТ

1.1. Оборудование и оснащение лаборатории

Для осуществления работ с культурами изолированных клеток, тканей и органов в лаборатории должны быть следующие помещения [7]:

1. Моечная комната должна быть укомплектована мойками с горячей и холодной водой, мойкой из кислотостойкого материала или специальным резервуаром для обработки химической посуды кислотами, лабораторными столами, дистиллятором, сушильными шкафами (с режимом работы для сушки посуды и стерилизации инструментов – температура до 150°C), шкафы для хранения чистой химической посуды и инструментов, ёмкости для хранения моющих средств.

2. Комната для стерилизации с сушильными шкафами и автоклавом (с режимом работы при давлении до 1,5 атмосфер и температурой 120°C).

3. Комната для приготовления питательных сред должна быть оснащена весами (технические и аналитические); рН-метром; холодильниками для хранения маточных растворов солей, гормонов и витаминов; электроплитами; а также лабораторными столами и шкафами с химической посудой.

4. Операционная комната, оборудованная ламинар-боксами (рис. 1), в которой осуществляют изоляцию меристем, вегетативных почек и субкультивирование эксплантов. Стены, потолок и пол должны быть из материалов, которые легко моются. Комната должна быть оборудована бактерицидными лампами. Для стерилизации операционной комнаты перед началом работы проводится обработка ультрафиолетовым облучением в течение 1-1,5 часов. В процессе работы в ламинар-боксе все поверхности протираются раствором этилового спирта (70°). В ходе работы используется стерилизация при помощи облучателя-рециркулятора ультрафиолетового бактерицидного типа (ДЕЗАР). Через каждые 1,5-2 часа непрерывной работы необходимо снова проводить стерилизацию операционной комнаты и ламинар-боксов ультрафиолетовым облучением в течение 1 часа.



Рис. 1. Ламинарные боксы

5. Культуральная комната для культивирования эксплантов *in vitro* со стеллажами, оборудованными люминесцентными лампами с интенсивностью освещения до 3-5 клк, реле времени (обеспечивающим поддержание 16-часового фотопериода), кондиционером для регуляции температуры ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) и увлажнителем воздуха (для поддержания 70 % влажности воздуха). Необходимо обеспечить свободный доступ к штативам с пробирками, колбам и банкам для наблюдения за состоянием эксплантов и развитием регенерантов. При входе в комнаты с асептическими условиями необходимо иметь специальную комнату для переодевания в стерильную одежду и обувь. Культуральная комната также должна быть оборудована бактерицидными лампами.

6. Адаптационная комната для адаптации *ex vitro* и дорастивания полученных в культуре *in vitro* растений. Комната оборудована стеллажами с люминесцентными лампами (интенсивность освещения до 3-5 клк), реле времени (обеспечивающим 16-часовой фотопериод), кондиционером для регуляции температуры ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) и увлажнителем воздуха (для поддержания 70-90% влажности воздуха, в зависимости от этапа адаптации).

1.2. Подготовка посуды и инструментов

Для приготовления питательных сред и культивирования изолированных клеток, тканей и органов необходима следующая химическая посуда: колбы Эрленмейера для приготовления питательной среды (200-1000 мл); мерные стаканы и цилиндры (100-1000 мл); пробирки (150×15 мм), колбы (100-300 мл) и стеклянные банки (200 мл) для культивирования эксплантов; чашки Петри; стеклянные пипетки и автоматические дозаторы (от 0,1 до 10 мл). Желательно использовать посуду из жаростойкого стекла.

При мойке посуды в начале ее необходимо освободить от остатков питательной среды и замочить на 1-2 часа в теплом мыльном растворе. Затем посуду тщательно моют моющими средствами в горячей воде, споласкивают в проточной воде и высушивают при комнатной температуре. Высушенную посуду (при необходимости) замочить в растворе хромовой смеси (5%-ный раствор $K_2Cr_2O_7$ в концентрированной H_2SO_4) на 2-3 часа. После этого посуду промыть в проточной воде не менее 7-8 раз, а затем ополоснуть дистиллированной водой 2-3 раза.

Высушенную посуду стерилизуют в сушильном шкафу при 130-150°C в течение 2 часов. Затем посуду необходимо проавтоклавировать. Автоклавирование материалов (пробки, марля, вата, дистиллированная вода) осуществляется при давлении 1,5 атм. (120°C) в течение 40-50 мин. Чашки Петри заворачивают в крафтовую бумагу и повторно стерилизуют в сушильном шкафу. Подготовленная таким образом посуда хранится в биксах или закрытых коробках.

Для вычленения эксплантов и субкультивирования растительного материала используют хирургические или анатомические пинцеты, скальпели, иглодержатели. Перед началом работы инструменты моют, вытирают насухо (можно протереть спиртом), заворачивают в фольгу и стерилизуют в сушильном шкафу в течение 2 часов при 130-150°C. При работе в боксе, перед каждой операцией, инструменты обрабатывают 96° этиловым спиртом с последующим обжигом в пламени спиртовки.

1.3. Приготовление питательных сред

Одним из лимитирующих факторов, который оказывает влияние на процессы морфогенеза органов и тканей растений *in vitro*, является состав питательной среды [2; 6; 10]. Основными компонентами питательных сред являются минеральные соли (макро- и микроэлементы), источник углеводного питания (сахароза, глюкоза или другие сахара), витамины и регуляторы роста растений. Питательные среды содержат железо в хелатированной форме, которая обеспечивает его доступность растению.

Для ускорения и облегчения работы необходимо подготовить маточные растворы в увеличенных концентрациях: макро- и микросолей ($\times 10$ и $\times 100$ соответственно), витамины и регуляторы роста. Во время приготовления питательной среды в один стакан последовательно добавляют все необходимые растворы макро- и микросолей, витаминов, регуляторов роста и сахарозу. Затем доливают дистиллированной водой до необходимого объема, перемешивают и доводят pH до 5,6-5,8 с использованием КОН или 1N HCl. Среду переливают в колбу, добавляют агар, нагревают на плитке до полного его растворения. Приготовленную среду разливают по пробиркам (по 10 мл в каждую) или колбам и банкам (по 30-40 мл в каждую) и закрывают ватно-марлевыми пробками или фольгой. Питательную среду автоклавируют при давлении 0,75 атм. в течение 20 минут. Готовую среду охлаждают в комнатных условиях и перед использованием выдерживают 2-3 дня, чтобы убедиться в отсутствии инфекции. Существует большое разнообразие питательных сред для культивирования растительных клеток, тканей и органов *in vitro*. Наиболее часто используемые среды: Мурасиге и Скуга (МС), Гамборга (среда В5), Блейдиза, Уайта, Шенка-Хильденбранта (ШХ) [7].

В качестве базовой питательной среды для клонального микроразмножения тимьяна используется среда Мурасиге и Скуга, в которую добавляют регуляторы роста (кинетин (Кин.), гибберелловую кислоту (ГК₃), индолил-3-масляную кислоту (ИМК)), в различных концентрациях, в зависимости от этапа микроразмножения (табл. 1).

Таблица 1

**Питательные среды, используемые на разных этапах
клонального микроразмножения тимьяна *in vitro***

Компоненты питательной среды	Содержание компонентов в питательной среде, мг/л		
	1 этап	2 этап	3 этап
Макроэлементы:			
NH_4NO_3	1650	1650	1650
KNO_3	1900	1900	1900
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	440	440	440
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	370	370	370
KH_2PO_4	170	170	170
Микроэлементы:			
H_3BO_3	6,2	6,2	6,2
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	22,3	22,3
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	8,6	8,6
KI	0,83	0,83	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025
Fe-хелат:			
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8	27,8
$\text{Na}_2\text{ЭДТА} \times 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	37,3	37,3
Витамины и органические добавки:			
Тиамин	0,1	0,1	0,1
Никотиновая кислота	0,5	0,5	0,5
Пиридоксин	0,5	0,5	0,5
Мезо-инозит	100	100	100
Глицин	2	2	2
Регуляторы роста и другие компоненты:			
Кинетин	1,0	1,0	–
ИМК	–	–	1,0
ГК ₃	1,0	–	–
Сахароза	20000	20000	20000
Агар-агар	7000	7000	7000

2. ПОЛУЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO*

Основным требованием при введении первичного экспланта в условия *in vitro* является отсутствие бактериальной и грибной инфекции, что обычно достигается поверхностной стерилизацией исходного растительного материала дезинфицирующими средствами. В качестве стерилизующих растворов необходимо использовать те, которые обеспечивают не только освобождение эксплантов от контаминации, но и максимальное сохранение жизнеспособности клеток растения [2]. Такого же правила необходимо придерживаться и при выборе экспозиции стерилизации.

Для микроразмножения тимьяна в изолированную культуру вводят верхушки побегов или сегменты стебля с узлом (8–10 мм), выделенные из растений, выращиваемых в условиях закрытого грунта. До начала работы подготавливают растворы стерилизующих веществ, закладывают необходимое количество пробирок с питательной средой, чашки Петри, инструменты в ламинар бокс, в котором включают ультрафиолетовую лампу на 1 ч. При стерилизации эксплантов применяют ступенчатую методику. Для этого выделенные из растений стебли необходимо разрезать на сегменты по 3-4 см и на 40 мин замочить в мыльном растворе. Затем 5-7 раз промыть их проточной водой.

Дальнейшая стерилизация проводится в асептических условиях ламинарного бокса с использованием 70% этанола (40 сек) и 0,3% раствора препарата ДезТаб (10 мин). После этанола необходимо промыть растительный материал 1 раз, после хлорсодержащего раствора – 3 раза стерильной дистиллированной водой. Такая подобранная эффективная схема стерилизации позволила получить максимальное количество стерильных (94,2%) и жизнеспособных (90,5%) эксплантов тимьяна. При использовании растений, выращиваемых в полевых условиях, необходимо увеличить время стерилизации раствором препарата ДезТаб до 10-15 мин из-за большей загрязненности растительного материала.

После стерилизации в асептических условиях ламинарного бокса побеги необходимо поместить в стерильную чашку Петри

(рис. 2А) и при помощи стерильных скальпеля и пинцета выделить верхушки побегов и сегменты стебля с одним узлом (рис. 2Б). Затем взять пробирку с питательной средой в левую руку, снять с нее аккуратно фольгу. В правую руку взять пинцет, который необходимо предварительно обжечь в пламени спиртовки, и аккуратно перенести эксплант в пробирку на поверхность агаризованной питательной среды. Для введения в культуру *in vitro* тимьяна используют модифицированную среду МС с 1,0 мг/л кинетина и 1,0 мг/л ГК₃ (см. табл. 1). Потом в правую руку нужно взять фольгу, над пламенем спиртовки обжечь ее и закрыть пробирку.

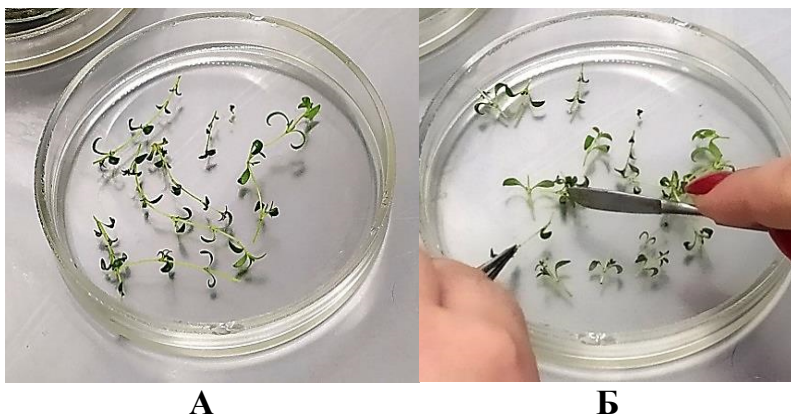


Рис. 2. Стерильные побеги (А), выделение верхушек побегов и сегментов стебля с узлом (Б) в условиях ламинарного бокса

Пробирки с эксплантатами культивируют в культуральной комнате при температуре $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, относительной влажности воздуха 70%, освещении 2-3 клк и продолжительности фотопериода 16 часов.

При введении в культуру *in vitro* через 2-3 недели у эксплантов (сегментов стебля с узлом или верхушек побегов) наблюдается развитие основного или пазушных побегов, а также индукция адвентивных почек и побегов (рис. 3).

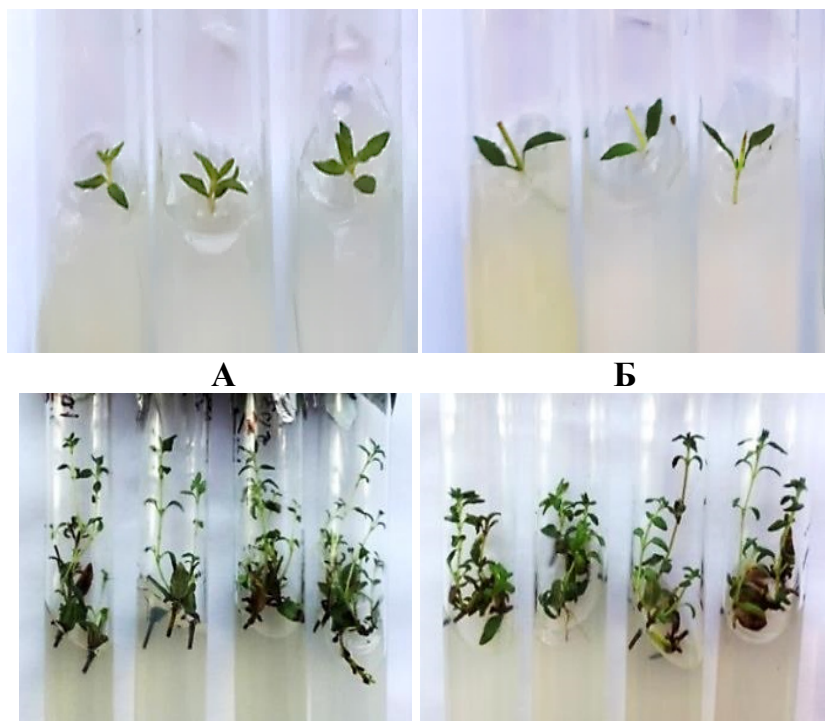


Рис. 3. Развитие микропобегов из верхушки побега (А) и сегментов стебля с узлом (Б) на первом этапе клонального микроразмножения тимьяна

При использовании в качестве эксплантов верхушек побегов на большинстве питательных сред развивалось меньшее число микропобегов, но с большей длиной и количеством узлов по сравнению с сегментами стебля с узлом [17].

Важным показателем при микроразмножении *in vitro* является коэффициент размножения, который рассчитывали, как количество микрочеренков, которое можно получить за одно субкультивирование, для этого количество образующихся на экспланте побегов умножали на число узлов на побеге. При сравнении коэффициентов размножения при использовании двух типов эксплантов практически на всех средах существенных различий не отмечено (табл. 2). В связи с этим для клонального микроразмножения тимьяна рекомендуется

использовать верхушки побегов и сегменты стебля с одним узлом, что позволяет получить больше эксплантов с одного растения и быстрее размножить ценные образцы.

Таблица 2

Влияние типа экспланта и состава питательной среды на развитие эксплантов при введении в культуру *in vitro* тимьяна

Регуляторы роста в среде МС, мг/л	Тип экспланта	Количество побегов на эксплант, шт.	Длина побега, см	Коэффициент размножения
–	верхушка побега	1,2±0,1	1,6±0,1	2,8±0,3
	сегмент стебля с узлом	1,8±0,1	0,8±0,1	3,1±0,3
БАП – 1,0; ГК ₃ – 1,0	верхушка побега	3,1±0,3	0,8±0,1	4,0±0,3
	сегмент стебля с узлом	3,2±0,3	0,6±0,1	3,8±0,3
Кинетин – 1,0; ГК ₃ – 1,0	верхушка побега	1,9±0,1	2,6±0,2	5,5±0,6
	сегмент стебля с узлом	2,2±0,2	1,8±0,2	5,1±0,5

Для оптимального развития эксплантов (сегментов стебля с узлом и верхушек побегов) рекомендуется использовать питательную среду МС, содержащую 1,0 мг/л кинетина и 1,0 мг/л ГК₃ (см табл. 2). На этой питательной среде в пробирках, закрытых фольгой, из эксплантов тимьяна на 40-е сутки культивирования развиваются 1,9-2,2 побегов длиной 1,8-2,6 мм (в зависимости от типа экспланта). Эти микропобеги используют для дальнейшего этапа собственно микроразмножения.

3. КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ТИМЬЯНА НА 2 – 3 ЭТАПАХ

3.1. Этап собственно микроразмножения

Повышение коэффициента размножения является одной из главных задач на втором этапе клонального микроразмножения. Анализ литературных источников показал, что во всех работах по тимьяну описывается только один метод размножения – адвентивное побегообразование из основания эксплантов. Мы рекомендуем комбинировать данный метод с микрочеренкованием формирующихся побегов, что позволяет значительно повысить коэффициент размножения.

Все работы по микрочеренкованию следует проводить в стерильных условиях ламинарного бокса. Для этого необходимо извлечь побеги из пробирок, в которых они культивировались на этапе введения в культуру *in vitro*, и поместить в стерильную чашку Петри. Для этого предварительно обжигают инструменты над пламенем спиртовки и берут в правую руку скальпель, а в левую пинцет. Побег придерживают пинцетом и разрезают скальпелем на сегменты стебля с одним узлом и пазушными почками (7-10 мм). После этого снова обжигают пинцет и каждый сегмент переносят в банки с питательной средой для второго этапа клонального микроразмножения. В каждую банку помещают по 5-7 экплантов. При этом пазушные почки должны находиться над уровнем питательной среды. Используют питательную среду МС с 1 мг/л кинетина (см табл 1).

Культивирование необходимо проводить в культуральной комнате при температуре $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, освещении 2-3 клк, 16-часовом фотопериоде и относительной влажности воздуха 70%.

Развитие пазушных и адвентивных побегов при культивировании сегментов стебля с узлом на этапе собственно микроразмножения начинается на 15-20 сут.

Ранее в наших исследованиях было показано, что культивирование экплантов тимьяна на средах с БАП или ТДЗ приводило к образованию мелких витрифицированных микропобегов [18; 32]. Последующее их субкультивирование не приводило к регенерации их в полноценные растения.

Одним из лимитирующих размножение тимьяна *in vitro* факторов является тип культурального сосуда. При культивировании эксплантов в пробирках и банках с питательной средой МС с 1 мг/л кинетина были выявлены существенные различия. Так, при культивировании эксплантов в течение 70 сут в банках на этой среде образуется в 2,9-3,3 раза больше побегов на эксплант, чем в пробирках (рис. 4).

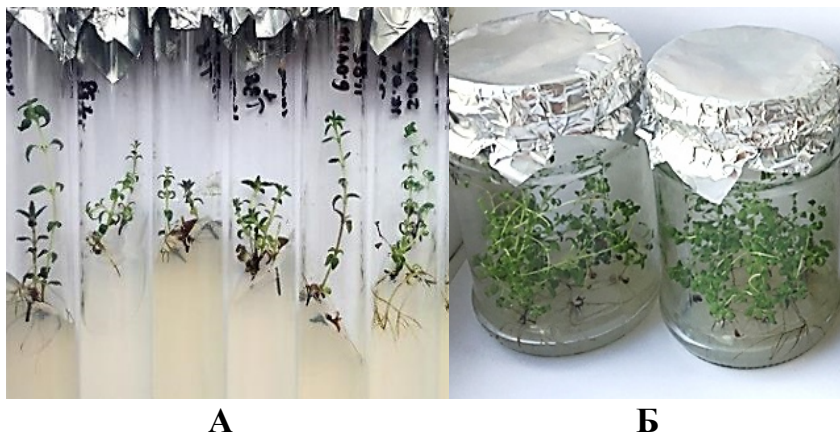


Рис. 4. Культивирование микропобегов тимьяна в пробирках (А) и в банках (Б) на втором этапе микроразмножения *in vitro*

Еще одним фактором, который имеет особое значение для максимальной реализации морфогенетического потенциала эксплантов тимьяна, является длительность цикла выращивания. Для многих видов растений при микроразмножении этот период обычно составляет 30-40 суток [4]. Поскольку в наших исследованиях при такой продолжительности были получены низкие морфометрические показатели эксплантов [18] рекомендуется проводить микрочеренкование каждые 60-70 сут. При таком цикле выращивания коэффициент размножения (при культивировании в банках) достигает максимального значения (рис. 5).

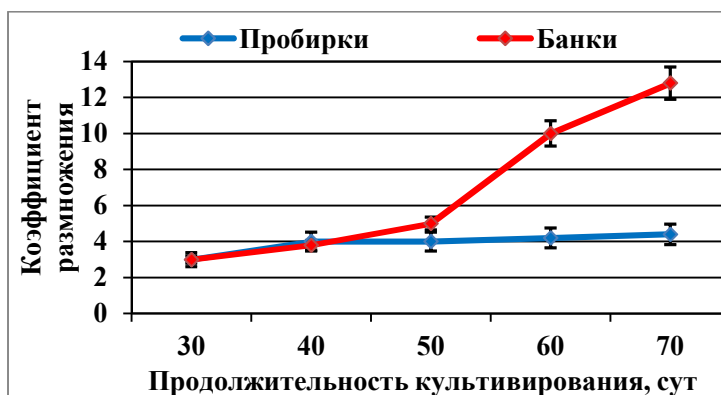


Рис. 5. Влияние длительности цикла выращивания, типа культурального сосуда на коэффициент размножения тимьяна

Таким образом, для получения максимального коэффициента размножения (12,8) и получения полноценных побегов, которые можно использовать для последующего микроразмножения *in vitro*, целесообразно культивировать сегменты стебля с узлом в стеклянных банках, использовать питательную среду МС с 1,0 мг/л кинетина и продолжительность цикла выращивания 70 сут.

3.2. Укоренение микропобегов *in vitro*

Укоренение микропобегов *in vitro* – один из важных этапов клонального микроразмножения. Для укоренения тимьяна *in vitro* необходимо использовать микропобеги, полученные на этапе собственно микроразмножения. В стерильных условиях ламинар-бокса микропобеги рекомендуется разделить на микрочеренки с одним-двумя узлами длиной 10-15 мм. Затем сегменты стебля с 1-2 узлами помещают на питательную среду для ризогенеза.

Развитие корней при культивировании сегментов стебля с узлом на 3 этапе клонального микроразмножения начинается на 20-30 сут.

В наших исследованиях культивирование на средах с кинетином кроме множественного побегообразования позволило вызвать корнеобразование с частотой от 7,1 до 98,0%

[14]. Однако количество образовавшихся корней на большинстве питательных сред, содержащих только этот цитокинин, была невысокой (2,2-4,9 шт./побег). Поэтому для активного корнеобразования миропобеги целесообразно переносить на среды, содержащие ауксины.

Применение питательной среды МС с 1,0 мг/л ИМК повышало количество корней в 2,8 раза, МС с 1,0 мг/л ИУК – в 2,4 раза, МС с 1,0 мг/л НУК – в 2,3 раза по сравнению со средой без регуляторов роста. Использование сред с ауксинами способствует повышению частоты корнеобразования (63,3-98,3%) по сравнению со средой без регуляторов роста (33,4%). Наибольшая средняя длина корня (2,6 см) была получена при культивировании на среде МС с 1,0 мг/л ИМК.

Культивирование в банках позволяет увеличить количество образовавшихся корней в 1,5-2,2 раза (в зависимости от питательной среды) по сравнению с пробирками (рис. 6).

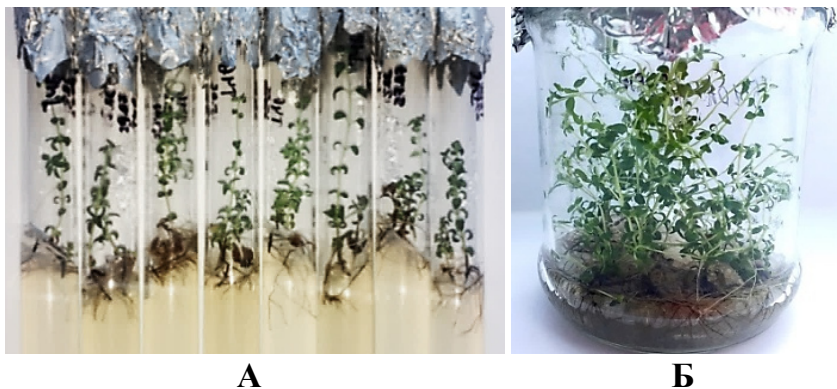


Рис. 6. Укорененные микропобеги тимьяна на среде МС с 1 мг/л ИМК в пробирках (А) и банках (Б)

Для активного корнеобразования микропобегов тимьяна рекомендуется культивировать микропобеги в банках в течение 70 сут на питательной среде МС с 1,0 мг/л ИМК, на которой формируется в среднем 7,7 корня (на побег).

4. АДАПТАЦИЯ *EX VITRO* РАСТЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ

Заключительным этапом микроразмножения *in vitro* является адаптация полученных микропобегов *ex vitro*. Для этого необходимо использовать микропобеги длиной 5-8 см с хорошо развитой корневой системой (рис. 7А) [29]. За сутки до высадки культуры необходимо залить культуральный сосуд с растениями *in vitro* водой для размягчения агар-агара. Предварительно простерилизованный (автоклавирование при режиме 126° С, 1,2 атм. в течение 40 мин) торф и перлит (1:1) смешивают и увлажняют в отдельной емкости. Затем пластиковые стаканы (объемом 200 мл), в которых заранее пробивают отверстия, наполняют субстратом и подготавливают лунки для высаживания растений. Затем с помощью пинцета извлекают растение из культурального сосуда, освобождают корневую систему от остатков агар-агара и высаживают в подготовленные стаканы.

После высадки в стерильный субстрат каждые 2-3 дня необходимо проводить подкормку растений раствором Кнопа и поддерживать высокую относительную влажность воздуха 90-100%, накрывая растения пластиковыми стаканами на 100 мл примерно 10-14 суток (рис. 7Б). Затем постепенно снижают влажность до 70%, периодически открывая пластиковые стаканы. Постепенно время, при котором растения не накрываются, увеличивают. Через 10-15 суток пластиковые стаканы убирают. В дальнейшем растения интенсивно растут, и в течение месяца формируются побеги длиной 10-15 см (рис. 7В). Через 2 месяца культивирования в условиях *ex vitro* растения достигают 20-30 см (рис. 7Г). Приживаемость растений тимьяна на оптимальном субстрате составляет до 93,5%. Затем растения из пластиковых стаканов пересаживают в вазоны большего объема с почвосмесью и выращивают в условиях закрытого грунта, а затем переносят в полевые условия.

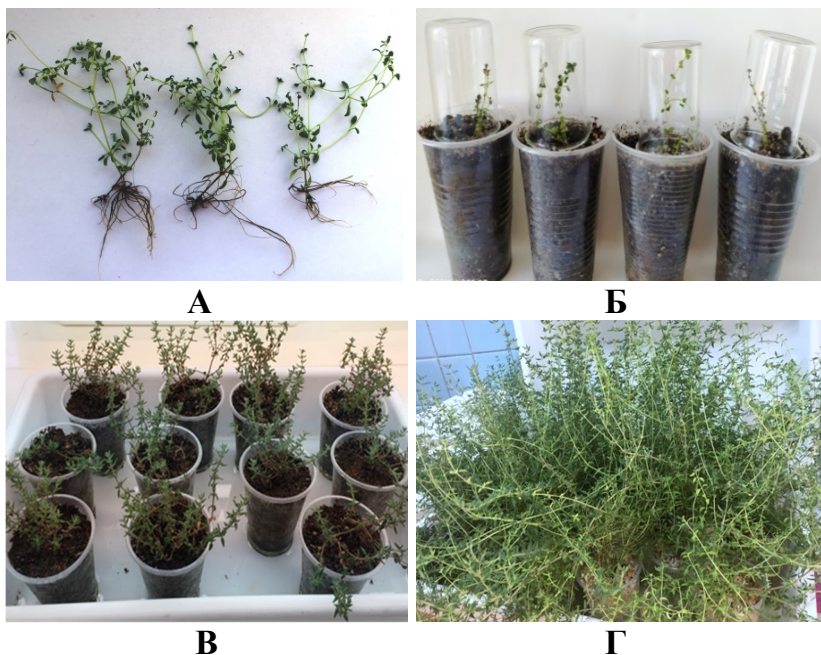


Рис. 7. Полученные *in vitro* микрорастения тимьяна: перед высадкой в субстрат (А); сразу после высадки в субстрат (Б); на 30 (В) и 60 сут (Г) культивирования на этапе адаптации *ex vitro*

Использование разработанной нами методики клонального микроразмножения тимьяна (рис. 8) позволит получить посадочный материал для закладки промышленных плантаций высокопродуктивных сортов, а также ускорить размножение ценных генотипов и таким образом повысить эффективность селекционного процесса этой культуры.

I ЭТАП. ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Стерилизация растительного материала: 70% этанол (40 сек) и 0,3% раствор препарата ДезТаб (7 мин) + 3-х кратная промывка автоклавированной дистиллированной водой по 5-10 мин

Экспланты: Верхушки побега, сегменты стебля с узлом (0,8-1,0 см)

Питательная среда: МС с 1,0 мг/л кинетина и 1,0 мг/л ГК₃

Условия культивирования: 24±2°C; 70% влажность; освещенность 2-3 клк; 16 часовой фотопериод; культуральный сосуд – пробирки, закрытые фольгой; продолжительность цикла выращивания – 40 сут.



II ЭТАП. СОБСТВЕННО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ

Экспланты: сегменты стебля с одним узлом (0,8-1,0 см), выделенные из микропобегов, полученных на первом этапе.

Питательная среда: МС с 1,0 мг/л кинетина

Условия культивирования: 24±2°C; 70% влажность; освещенность 2-3 клк; 16-ти часовой фотопериод; культуральный сосуд – банки, закрытые фольгой; продолжительность цикла выращивания – 70 сут.



III ЭТАП. УКОРЕНЕНИЕ *IN VITRO*

Экспланты: сегменты стебля с 1-2-мя узлами, выделенных из микропобегов, полученных на втором этапе микроразмножения.

Питательная среда: МС, дополненная 1,0 мг/л ИМК.

Условия культивирования: 24±2°C; 70% влажность; освещенность 2-3 клк; 16-ти часовой фотопериод; культуральный сосуд – банки, закрытые фольгой; продолжительность цикла выращивания – 70 сут.



IV ЭТАП. АДАПТАЦИЯ *EX VITRO*

Отбор микрорастений: микропобеги длиной 50-80 мм с корневой системой.

Субстрат: торф и перлит в соотношении 1:1.

Условия культивирования: растения выращивают в пластиковых стаканах (200 мл) в тепличных условиях при влажности воздуха не ниже 70-85%; освещенность 3-4 тыс. лк; полив раствором Кнопа.

Рис. 8. Схема клонального микроразмножения тимьяна обыкновенного *in vitro*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений: учебник. – С.Пб.: Изд-во С.–Петербург. ун-та, 2002. – 232 с.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений и биотехнологии на их основе: учеб. пособие. – М.: ФРК – Пресс, 1999. – 160 с.
3. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Митрофанова И.В. Влияние сорта и факторов культивирования *in vitro* на клональное микроразмножение розы эфиромасличной // Бюл. Гос. Никит. ботан. сада. – 2016. – Вып. 120. – С. 36-43.
4. Егорова Н.А., Кривохатко А.Г., Ставцева И.В., Каменек Л.И. Микроразмножение эфиромасличных растений с использованием культуры изолированных тканей и органов *in vitro* // Таврійський вісник аграрної науки. – 2013. – №1. – С. 9-14.
5. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений. – М., Юрайт, 2020. – 333 с.
6. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 487 с.
7. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
8. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. – К.: Наукова думка, 2005. – 270 с.
9. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Иванова Н.Н., Егорова Н.А., Кузьмина Т.Н., Лесникова-Седошенко Н.П., Тевфик А.Ш., Челомбит С.В. Этапы регенерации *in vitro* декоративных, ароматических и плодовых культур // Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур. Коллективная монография. Под ред. И.В. Митрофановой; НБС-ННЦ РАН. Симферополь, 2018. – С. 27-126.

10. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – К: Аграрна наука, 2011. – 344 с.

11. Паштецкий В.С., Невкрытая Н.В., Мишнев А.В., Назаренко Л.Г. Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра. – Симферополь: ИТ «Ариал», 2018. – 320 с.

12. Старчак Ю.А., Бубенчикова А.Н. Антимикробная активность водных извлечений и эфирных масел тимьянов флоры средней полосы европейской части России // Ученые записки Орловского государственного университета. – 2014. – №6 (62). – С. 144-147.

13. Тевфик А.Ш., Егорова Н.А., Загорская М.С. Влияние некоторых факторов на развитие эксплантов на первых этапах размножения тимьяна *in vitro* // Материалы III Международ. науч. конф. «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной наук» (24-28 сентября 2018 г., Симферополь). – Симферополь: ИТ «Ариал», 2018. – С. 81-82.

14. Тевфик А.Ш., Егорова Н.А. Влияние условий культивирования и гормонального состава питательной среды на микроразмножение *in vitro* тимьяна обыкновенного // Таврический вестник аграрной науки. – 2019. – № 1 (17). – С. 93-102.

15. Тевфик А.Ш. Особенности клонального микроразмножения *Thymus vulgaris* L. на этапе введения в культуру *in vitro* // Сб. тр. Седьмой науч. конф. с международ. участием. Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения (19 декабря 2019 г., Москва). – Москва: ФГБНУ ВИЛАР, 2019. – С. 411-416.

16. Тевфик А.Ш., Егорова Н.А. Особенности микроразмножения двух образцов *Thymus vulgaris* L. на этапе введения в культуру *in vitro* // М-лы IV международ. научно-практич. конф. «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки» (09-13 сентября 2019 г., Симферополь). – Симферополь: ИТ «Ариал», 2019. – С. 243-245.

17. Тевфик А.Ш., Егорова Н.А., Загорская М.С. Особенности морфогенеза эксплантов тимьяна обыкновенного на первом этапе

клонального микроразмножения // Таврический вестник аграрной науки. – 2018. – № 2 (14). – С. 118–127.

18.Тевфик А.Ш., Егорова Н.А. Оптимизация условий культивирования для 1 и 2-го этапов микроразмножения *Thymus vulgaris* L. *in vitro* // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2019. – № 81. – С. 188-195.

19.Achoub H., Zaiter L., Benayache F., Benayache S., Chalchat J.C., Chalard P., Figueredo G., Akkal S. Chemical composition of the essential oil of aerial parts of *Thymus ciliatus* (Desf.) // Acta Scientifica Naturalis. – 2019. – Vol. 6(2). – P. 62-70.

20.Alcowni R., Solyman E., Qaoud H. Introducing some of threatened *Thymus* species to *in vitro* tissue culturing as an approach for their conservation // Pak. J. Bot. – 2017. – Vol. 49, № 1. – P. 259-264.

21.Aljabeili H.S., Barakat H., Abdel-Rahman H.A. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of Thyme essential oil (*T. vulgaris*) // Food and Nutrition Sciences. – 2018. –Vol. 9. – P. 433-446.

22.Bakhtiar Z., Mirjalili M.H., Sonboli A. *In vitro* callus induction and micropropagation of *Thymus persicus*, an endangered medicinal plant // Crop Breeding and Applied Biotechnology. – 2016. –Vol. 16. – P. 48-54.

23.Becircan T., Cüce M., Yaşar A., Sökmen A. *In vitro* multiplication and essential oil accumulation of *Thymus leucotrichus* Hal. // Second Sumposium on EuroAzian Biodiversity (SEAB-2016), 23-27 May, 2016, Turkey, Antalya. – 2016. – P. 366.

24.El Ansari Z.N., Mihaoui A.El, Boussaoudi I., Benkaddour R., Hamdoun O., Tahiri H., Badoc A., Oualkadi A., Lamarti A. Effect of macronutrients, cytokinins and auxins, on *in vitro* organogenesis of *Thymus vulgaris* // American Journal of Plant Sciences. – 2019. – Vol. 10. – P. 1482-1502.

25.Hosseini B., Khoshkhoy M. Effects of media and growth regulators in *Thyme* (*T. vulgaris*) micropropagation // Iranian Journal of Horticultural Science and Technology. – 2005. – Vol. 6, №2. – P. 61-68.

26. Javed H., Erum Sh., Tabassum S., Ameen F. An overview on medicinal importance of *Thymus vulgaris* // Journal of Asian Scientific Research. – 2013. – Vol.3, №10. – P. 974-982.
27. Marco-Medina A., Casas J.L. *In vitro* multiplication and essential oil composition of *Thymus moroderi*, an endemic Spanish plant // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2015. – Vol. 120. – P. 99–108.
28. Mendes M.L., Romano A. *In vitro* cloning of *Thymus mastichina* L. field-grown plants // Acta Hort. – 1999. – № 502. – P. 303-306.
29. Mitrofanova I.V., Tevfik A.Sh., Mitrofanova O.V., Brailko V.A., Lesnikova-Sedoshenko N.P. Features of canna regeneration *in vitro* and plantlets adaptation *in vivo* // Acta Hort. – 2017. – № 1155. – P. 447-454.
30. Hazarika B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants // Scientia Horticulturae. – 2006. – Vol. 108(2). – P. 105–120.
31. Nordine A., Meskaoui A. Rapid *in vitro* regeneration and clonal multiplication of *Thymus bleicherianus* Pomel, a rare and threatened medicinal and aromatic plant in Morocco // Med Aromat Plants. – 2014. – Vol. 3, №1. – P. 145.
32. Tevfik A.Sh., Yegorova N.A. Clonal micropropagation of *Thymus vulgaris* L. *in vitro* // In vitro cellular and developmental biology – animal. – 2020. – Vol. 56, S1. – S63-S64.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТ.....	5
1.1. Оборудование и оснащение лаборатории.....	5
1.2. Подготовка посуды и инструментов.....	7
1.3. Приготовление питательных сред.....	8
2. ПОЛУЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ НА ЭТАПЕ ВВЕДЕНИЯ <i>IN VITRO</i>	10
3. КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ТИМЬЯНА НА 2- 3 ЭТАПАХ.....	14
3.1. Этап собственно микроразмножения.....	14
3.2. Укоренение микропобегов <i>in vitro</i>	16
4. АДАПТАЦИЯ <i>IN VIVO</i> РАСТЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ.....	18
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	21

Для заметок

Для заметок

Научно-методическое издание

ФГБУН «НИИ сельского хозяйства Крыма»

Тевфик А. Ш., Егорова Н. А.

**Клональное микроразмножение тимьяна
обыкновенного *in vitro*.**

**Методические рекомендации
Ответственный за выпуск: Л.А. Радченко**

в авторской редакции

Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 1,63. Тираж 300 экз.

ИЗДАТЕЛЬСТВО ТИПОГРАФИЯ «АРИАЛ»
295015, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Севастопольская, 31-а/2,
тел.: +7 978 71 72 901, e-mail: it.arial@yandex.ru, www.arial.3652.ru

Отпечатано с оригинал-макета в типографии «ИТ «АРИАЛ»
295015, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Севастопольская, 31-а/2,
тел.: +7 978 71 72 901, e-mail: it.arial@yandex.ru, www.arial.3652.ru

В методических рекомендациях изложены приемы клонального микроразмножения *Thymus vulgaris* L., разработанные в лаборатории биотехнологии ФГБУН «НИИСХ Крыма». Описаны приемы стерилизации растительного материала при введении в асептическую культуру, субкультивирования при микроразмножении *in vitro*, укоренения полученных микропобегов и их адаптации *ex vitro*. Использование данных методических подходов позволяет получить коэффициент размножения до 1:12,8, и высокую частоту укоренения *in vitro* (98,3%) и адаптации *ex vitro* (93,5%) размноженных растений.

Методические рекомендации предназначены для специалистов в области биотехнологии, селекции и семеноводства, физиологии растений. Пособие может быть также использовано для студентов и аспирантов, изучающих сельскохозяйственную биотехнологию в высших учебных заведениях.

ISBN 978-5-907506-42-8



9 785907 506428