

РОЛЬ ЭКЗОГЕННЫХ ФИТОГОРМОНОВ КАК КЛЮЧЕВОГО
ФАКТОРА МОРФОГЕНЕЗА НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА
FERULA L. (APIACEAE LINDL.) В УСЛОВИЯХ *in vitro*

© 2022 г. Д. Н. Жамалова¹*, Ф. У. Мустафина¹, Г. Т. Курбаниязова¹, Д. Э. Турдиев¹

¹Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент, 100125 Республика Узбекистан

*e-mail: dilafruz.jamalova.91@mail.ru

Поступила в редакцию 23.02.2022 г.

После доработки 02.07.2022 г.

Принята к публикации 10.07.2022 г.

В настоящем обзоре обсуждены протоколы микроклонального размножения с использованием регуляторов роста на разных этапах морфогенеза. Представлена информация по индукции каллусогенеза, органогенеза и эмбриогенеза и способствующие этим процессам у некоторых видов рода *Ferula L.* оптимальные концентрации экзогенных ауксинов и цитокининов. Данный обзор может быть использован при разработке протокола микроклонального размножения экономически ценных, лекарственных и, часто, находящихся под угрозой исчезновения видов рода *Ferula L.*

Ключевые слова: лекарственные растения, фитогормоны, *Ferula L.*, каллусогенез, соматический эмбриогенез, эксплант, клональное размножение, культура *in vitro*, цитокинины, ауксины

DOI: 10.56304/S0234275822040160

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наблюдается повышенный интерес к методам культивирования тканей с целью массового размножения и сохранения редких, исчезающих или находящихся под угрозой исчезновения лекарственных видов растений. В этом случае биотехнология предоставляет возможность сохранения генотипа растений, а также модификации их генетической информации, основываясь на данных эпигенетики и транскриптомики с целью получения биологически активных природных соединений с лучшими свойствами и в больших количествах. Разработка протоколов микроклонального размножения растений *in vitro* с параллельным контролем фитохимического состава является актуальным вопросом биотехнологии при создании плантаций перспективных лекарственных растений. В данном обзоре рассматриваются протоколы *in vitro* микроклонального размножения видов рода *Ferula L.* с целью выявления оптимальных условий, позволяющих вести культуру этих перспективных, лекарственных видов растений.

Род *Ferula L.* (Apiaceae Lindl.) включает около 200 видов цветковых растений семейства Apiaceae

Lindl; многие из которых являются лекарственными, пищевыми, кормовыми, медоносными, эфирно-масличными и смолосодержащими растениями. В Средней Азии насчитывается 114 видов, в Узбекистане – около 60, из которых 5 являются эндемиками [1, 2]. Как и большинство представителей семейства зонтичные, виды этого рода во всех частях растения содержат эфирные масла или смолообразные вещества, кумарины, сесквитерпены, флавоноиды, реже сапонины [2, 3]. Большое количество видов ферулы выделяют камедию смолу, которая считается ценным лекарственным средством в Индии, Пакистане, США, Швеции, Германии и Португалии. Камедию смолу, полученную из корня некоторых видов ферулы, используется в качестве ингредиента более чем ста традиционных рецептов восточной медицины [4].

Основные направления развития биотехнологии растений охватывают широкий круг задач, в том числе ускоренное производство высококачественного посадочного материала диких, исчезающих видов, а также получение возобновляемого растительного лекарственного сырья и биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения, которые необходимы для современной медицины, фармакологии, ветеринарии и т.д.

Протоколы микроклонального размножения *in vitro* разработаны для некоторых высокоценных лекарственных видов ферулы, например, *F. ferulaeoides* (Steud.) Korov. [4], *F. assa-foetida L.* [5–8],

Список сокращений: АБК – Абсцизовая кислота, 2,4-Д – 2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота, БАП – 6-бензил-амино пурин, БА – Бензиладенин, ИУК – Индол-3-уксусная кислота, ИМК – Индол-3-масляная кислота, НУК – α -нафталинуксусная кислота, Кин – Кинетин, ГКЗ – Гибберелиновая кислота, МС – среда Мурашига и Скуга, В5 – среда Гамборга и Эвелега.

F. gummosa Boiss. [9], *F. jaeschkeana* Vatke [10] и *F. orientalis* L. [11]. Успех исследований, проводимых со стерильной культурой тканей и клеток, а также их практическое применение в биотехнологии, в значительной степени зависит от правильно подобранных — в зависимости от поставленных задач — комбинации и концентрации фитогормонов в средах культивирования. Важное значение имеют и другие факторы, — такие, как состав питательных сред, условия освещения, выбор экспланта, свойства самого растения и т.д. Размножение клеток *in vitro*, основанное на индукции клеточных делений с использованием экзогенных фитогормонов, включает, в основном, применение ауксинов и цитокининов. Действие фитогормонов на растения можно охарактеризовать как поливалентное: они влияют на рост и деление клеток, на процессы адаптации и старение, на транспорт веществ, дыхание, синтез нуклеиновых кислот и белков и на многие другие процессы [12].

Цель данного обзора — проанализировать влияние количественного и качественного содержания фитогормонов в среде, а также типа питательной среды на частоту формирования каллуса, соматического эмбриогенеза и органогенеза у некоторых видов рода *Ferula* в условиях *in vitro* для определения оптимальных условий микроклонального размножения этих экономически ценных и малоизученных в этом направлении видов, большинство из которых находятся под антропогенным прессингом.

ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ ВИДОВ РОДА *Ferula*

В ряде исследований описаны особенности регенерации и морфогенеза представителей рода *Ferula*. Первая система регенерации *in vitro* разработана Bernard et al. в 2007 году для *F. gummosa* [9]. Часто для видов рода *Ferula* в качестве первичного экспланта используют семена, проростки (семядоли, гипокотиль, корешок), зрелые зародыши и т.д. На этапе собственно размножения видов рода *Ferula* применяют среды по прописи Мурасиге и Скуга [13], а также Гамборга и Эвелга (B5) [14], дополненные регуляторами роста — цитокининами бензиламинопурином (БАП), бензиладенином (БА), кинетином (Кин), ауксинами никотинусусной кислотой (НУК), индолилуксусной кислотой (ИУК), индоллил-3-масляной кислотой (ИМК) 2,4-дихлорфеноксисукусной кислотой (2,4-Д), а также гибберелинами, абсцизовой кислотой и др.

Размножение видов рода *Ferula* с использованием методов микроклонирования в условиях *in vitro* может быть чрезвычайно эффективным подходом в программах по сохранению видов и их размножению. Это весьма актуально, так как многие виды этого рода, в частности, *F. assa-foetida*, *F. gummosa*, *F. jaeschkeana*, *F. ferulaeoides*, *F. tadshikorum* Pimenov, *F. sumbul* (Kauffm.) Hook.f. и др., уязвимы или находятся под угрозой исчезновения из-

за низкой прорастаемости семян, длительности периода покоя семян, плохой регенерации в природе, чрезмерной эксплуатации со стороны человека, а также отсутствия организованного культивирования, ограниченного географического ареала и т.д. Эти факторы приводят к угрозе исчезновения перечисленных видов [15, 16]. Методы биотехнологии давно стали неотъемлемой частью программ ботанических садов по сохранению генофонда редких растений. Одним из направлений является длительное сохранение пробирочных растений при пониженных температурах, что позволяет создать генетический банк ценных форм.

Микроклональное размножение растений может быть осуществлено с использованием двух способов: (1) прямой органогенез, представляющий собой формирование адвентивных побегов (униполярный морфогенез) и/или адвентивных соматических или зиготических эмбрионов (биполярный морфогенез) на самом экспланте; (2) непрямой органогенез, формирующийся из недифференцированных клеток (каллусные или суспензионные культуры клеток) или тканей (калусы, которые развиваются на экспланте). Для большинства растений используется первый метод, однако микроклональное размножение некоторых видов растений возможно только путем формирования каллуса. Однако важной проблемой микроклонального размножения являются соматические изменения растений при прохождении стадии каллуса или суспензионной культуры перед индукцией соматического эмбриогенеза.

Данный обзор исследований по микроклональному размножению ценных видов рода *Ferula* в разрезе влияния содержания фитогормонов в питательной среде на особенности и пути формирования морфогенеза, позволит оптимизировать условия размножения и сохранения этого ценного генетического ресурса, находящегося на грани исчезновения вследствие антропогенной активности.

Каллусогенез

Регенерация растений в условиях *in vitro* зависит от наличия в меристематических тканях — митотически активных клеток. Часто регенерационная способность обнаруживается не у экспланта, а в возникшем от него каллусе. Ограничения использования каллусных культур для сохранения генофонда связаны с высокой вероятностью получения измененных генотипов, возникающих как результат соматической изменчивости, а также снижением или полной утратой регенерационных способностей длительно пассируемых каллусных культур. Тем не менее, формирование каллуса, как один из этапов размножения растений в условиях *in vitro*, имеет важное значение в работах по сохранению генофонда редких видов, в частности, когда микроклонирование возможно только через стадию каллусогенеза. Это относится к случаям, когда культивируются недозре-

лые зародыши или фрагменты соматических тканей растений.

Из числа видов рода *Ferula*, каллусогенез индуцирован для *F. ferulaeoides* [4], *F. assa-foetida* [6–8], *F. jaeschkeana* (табл. 1) [10].

Suran et al. [4] разработали протокол по проращиванию семян и индукции каллусогенеза еще одного вида, находящегося под угрозой исчезновения из-за низкой регенерации в природе и ограниченного географического ареала – *F. ferulaeoides*. В результате эксперимента установлено, что комбинации БАП с ИУК или 2,4-Д были наиболее эффективными для инициации каллуса из частей, проросших в условиях *in vitro* семян. Высокая скорость образования каллуса отмечена для питательных сред с содержанием фитогормонов следующей комбинации: БАП (0.5 мг/л) + ИУК (0.5 мг/л). Развитие каллуса отмечали, в первую очередь, из корешков на 10 день после посадки. На питательных средах, содержащих БАП в комбинации с НУК образование каллуса не наблюдалось. Частота индукции каллуса из корневых сегментов проросших семян отмечалась выше, чем из гипокотилей и сегментов семядолей [4].

В исследованиях Hassani et al. [5] различные концентрации кинетина и НУК использовали в базальной среде МС для индукции каллуса на гипокотильных сегментах проросших семян *F. assa-foetida*. Каллус индуцирован в течение 12 недель из гипокотилей на среде МС при добавлении 0.1–1.0 мг/л НУК и 0.5–4.0 мг/л кинетина. Частота индукции каллуса варьировалась от 25 до 100% в зависимости от экотипа вида, концентраций кинетина и НУК. Высокий процент каллусогенеза наблюдали на питательной среде МС, дополненной 1.0 мг/л кинетина с 0.5 мг/л НУК в экотипе Табас [5].

Zare et al. [6] исследовали микроклональное размножение *F. assa-foetida* путем индукции непрямого эмбриогенеза. Среда МС с содержанием НУК (1 мг/л) и БА (2 мг/л) оказалась наиболее эффективной (100%) для пролиферации каллуса из корневых эксплантов. Частота индукции каллуса из корневых сегментов проросших растений отмечалась значительно выше, чем из гипокотилей или сегментов семядолей. Отмечено, что именно сочетание НУК с БА характеризовалось наибольшей эффективностью для последовательной индукции каллуса. В регенерационной среде образование каллуса также увеличивалось с повышением концентрации БА [6].

В исследованиях Roozbeh et al. [7] высокий процент каллусогенеза для *F. assa-foetida* наблюдали на питательной среде В5, содержащей комбинации НУК (1 мг/л) + Кин (1 мг/л), БАП (0.2 мг/л) + Кин (0.5 мг/л) или БАП (0.5 мг/л) + Кин (0.5 мг/л). Эксперименты показали значительное влияние компонентов питательной среды, концентрации и типа регуляторов роста, а также вида эксплантов на процент каллусогенеза. На базальной среде В5 каллусогенез был выше, чем на питательной среде МС. Комбинация БАП

(1 мг/л) + Кин (0.2 мг/л) в питательной среде приводила к максимальному образованию каллуса, далее комбинации НУК (1 мг/л) + Кин (0.2 мг/л), НУК (1 мг/л) + Кин (1 мг/л) и БАП (1 мг/л) + Кин (1 мг/л) способствовали иницированию и развитию каллусогенеза. Максимальное формирование каллуса наблюдали при использовании в качестве экспланта корешка проросшего растения, минимальное – из семядолей и гипокотилей.

Otroshi et al. [8] исследовали влияние типа эксплантов, состава питательной среды и регуляторов роста растений на возникновение непрямого соматического эмбриогенеза *F. assa-foetida* в условиях *in vitro*. Результаты их исследований позволили сделать вывод, что высокие концентрации БАП и НУК при низких концентрациях кинетина оказывают положительное влияние на формирование каллуса у *F. assa-foetida*. Высокий процент каллусогенеза был получен при использовании следующих вариантов добавок: БАП (2.0, 1.0 и 3.0 мг/л), БАП (4.0 мг/л) + Кин (0.5 мг/л), 2,4-Д (0.5 мг/л) + Кин (0.5 мг/л), НУК (3.0 мг/л) + Кин (0.5 мг/л) и НУК (4.0 мг/л) + Кин (0.2 мг/л). Формирование каллуса из корневых эксплантов отмечалось выше (75.62%), чем при использовании гипокотилей и семядолей [8].

В исследованиях Sharma и Khajuria [10] был получен 12-недельный рыхлый каллус из экспланта черешка *F. jaeschkeana* на питательной среде МС, дополненной 2,4-Д (2.0 мг/л) и Кин (1.0 мг/л). Этот каллус использовали в качестве базового источника для иницирования соматического эмбриогенеза. Эмбриогенные каллусы были получены и размножены на среде с добавлением ауксинов 2,4-Д, НУК, ИУК и ИМК (отдельно) в концентрации от 0.2 до 4.0 мг/л. Высокий показатель эмбриогенеза наблюдали на среде с ауксином 2,4-Д в концентрации 4.0 мг/л (84.2) [10, 17].

Резюмируя данный раздел, необходимо отметить, что многие авторы указывают на вероятность возникновения соматической изменчивости у растений-регенерантов при использовании непрямого метода морфогенеза (с формированием каллуса). В то же время, регенерация растений некоторых видов *Ferula* описывается именно с использованием каллусной культуры. Важная роль при этом отводится присутствию в питательной среде в качестве цитокинина кинетина в малой концентрации. В большинстве комбинаций фитогормонов на основе питательной среды МС, в которых наблюдалось успешное развитие каллусной культуры, в качестве ауксинов присутствуют НУК и БАП.

Соматический эмбриогенез

Процесс соматического эмбриогенеза в условиях *in vitro* происходит на основе вегетативных частей растений; зиготический эмбриогенез формируется из зиготы. Развитие эмбрионов непосредственно из клеток экспланта представляет собой

Таблица 1. Комбинации концентраций фитогормонов в питательных средах, успешно используемых для индукции каллусогенеза видов рода *Ferula* L.
Table 1. Combinations of phytohormone concentrations in nutrient media successfully used to induce callusogenesis in species of the genus *Ferula* L.

№	Виды	Среда	Концентрации фитогормонов с наилучшими показателями каллусогенеза	Доля каллусогенеза на эксплант	Эксплант	Авторы
1	<i>F. feruloides</i>	МС	ИУК (0.5 мг/л) + БАП (0.5 мг/л)	100%	Корешок, семядоли, гипокотиль	[4]
			ИУК (2.0 мг/л) + БАП (0.5 мг/л)			
			НУК (0.5 мг/л) + Кин (1.0 мг/л)			
2	<i>F. assa-foetida</i>	МС	НУК (1 мг/л) + Кин (1.5 мг/л)	100%	Корешок, семядоли, гипокотиль	[5]
			НУК (0.5 мг/л) + Кин (2.0 мг/л)			
			НУК (1.0 мг/л) + БА (2.0 мг/л)			
			БАП (1.0 мг/л) + Кин (0.2 мг/л)			
			НУК (1.0 мг/л) + Кин (0.2 мг/л)			
3	<i>F. jaeschkeana</i>	МС	НУК (1.0 мг/л) + Кин (1.0 мг/л)	84.2 ± 1.4%	Черешок	[10]
			БАП (1.0 мг/л) + Кин (0.2 мг/л)			
			НУК (1.0 мг/л) + Кин (0.2 мг/л)			
			НУК (1.0 мг/л) + Кин (1.0 мг/л)			
			БАП (1.0 мг/л) + Кин (1.0 мг/л)			
			БАП (0.2 мг/л) + Кин (0.5 мг/л)			
			БАП (0.5 мг/л) + Кин (0.5 мг/л)			
4	<i>F. assa-foetida</i>	МС	БАП (4.0 мг/л) + Кин (0.5 мг/л)	62.78%	Корешок, семядоли, гипокотиль	[8]
			2.4-Д (0.5 мг/л) + Кин (0.5 мг/л)			
			НУК (3.0 мг/л) + Кин (0.5 мг/л)			
			НУК (4.0 мг/л) + Кин (0.2 мг/л)			
			2.4-Д (0.5 мг/л) + Кин (2.0 мг/л)			
5	<i>F. assa-foetida</i>	МС	НУК (2.0 мг/л) + Кин (0.2 мг/л)	54.44%	Корешок, семядоли, гипокотиль	[7]
			НУК (2.0 мг/л) + Кин (0.2 мг/л)			

прямой соматический эмбриогенез, тогда, как процесс формирования зародыша на основе каллуса составляет непрямой или косвенный эмбриогенез. Ряд публикаций посвящен соматическому эмбриогенезу видов рода *Ferula* (табл. 2).

Hassani et al. [5] впервые оптимизировали протокол культивирования тканей путем индукции прямого и непрямого соматического эмбриогенеза у монокарпичного вида *F. assa-foetida*. Прямой соматический эмбриогенез был индуцирован на безгормональной среде МС. Соматические зародыши на различной стадии развития можно было наблюдать через 8 недель после переноса. Косвенный эмбриогенез был достигнут на питательной среде с различными комбинациями кинетина и НУК. Формирование каллуса проходило на среде МС в течение 12 недель; лучшей комбинацией фитогормонов при этом была следующая: 1.0 мг/л кинетина с 0.5 мг/л НУК. После переноса каллуса на безгормональную среду, наблюдали развитие узелкового, зеленовато-желтого эмбрионного каллуса различной плотности. Большинство зародышей характеризовались нормальным развитием, хотя присутствовали несколько аномальных зародышей, в частности, семядольные зародыши с одной, тремя и более семядолями (листочками). Отмечено влияние экотипа на формирование соматического эмбриогенеза; из двух провинций Ирана, Ширку и Табас, наиболее интенсивно формирование зародышей наблюдалось у эксплантов экотипа Табас. Частота эмбриогенеза варьировала от 6 до 31% на среде МС, содержащей различные концентрации кинетина и НУК (табл. 2). Лучшей гормональной комбинацией, в которой наблюдалось формирование зародыша у эксплантов из обоих экотипов, оказалась питательная среда с 1.5 мг/л кинетина в сочетании с 1.0 мг/л НУК. Максимальное среднее число зрелых соматических зародышей на эксплант составило 8.4 для экотипа Табас на питательной среде, дополненной 1.0 мг/л НУК + 1.5 мг/л Кин, и 6.56 для экотипа Ширку на питательной среде, содержащей 0.5 мг/л НУК + 2.0 мг/л Кин. На основании этих экспериментов Hassani et al. [5] сделали заключение о критической роли кинетина в формировании соматического эмбриогенеза у *F. assa-foetida* на стадии формирования каллуса при непрямом эмбриогенезе [5].

Bernard et al. [9] сообщили о формировании прямого соматического эмбриогенеза в течение 2 недель из интактных проростков *F. gummosa* в жидкой суспензионной среде МС, содержащей 0.5 мг/л 2,4-Д или 1.0 мг/л НУК. Непрямой эмбриогенез инициирован у *F. gummosa* на твердой базовой безгормональной среде МС при условии фотопериода 16 ч (при 19°C) и 8 ч (при 7°C), причем развитие зародышей было выше из каллуса, сформированного на питательной среде, содержащей 1.0 мг/л НУК. В данном эксперименте авторами отмечена высокая степень формирования морфологических аномалий у соматических зародышей и проростков как результат цитохиме-

ризма. Авторы описали развитие первого листа у нормально и аномально укоренившихся саженцев с последующим периодом покоя [9].

В исследованиях Roozbeh et al. [7] в качестве экспланта использованы корешок, гипокотиль и семядоли проросшего семени *F. assa-foetida*. Авторы отмечали значительное влияние типа экспланта на степень формирования зародышей. Наилучший прямой соматический эмбриогенез был получен из семядолей на питательной среде МС с 2,4-Д (0.2 мг/л) + Кин (0.2 мг/л), а максимальный непрямой соматический эмбриогенез из корешка, проросшего семени на питательной среде В5 с 2,4-Д (0.5 мг/л) + Кин (0.2 мг/л). Кроме того, авторы указывают, что индукция прямого соматического эмбриогенеза была достигнута с использованием НУК (1.0 мг/л) + Кин (0.5 мг/л) или НУК (0.5 мг/л) + Кин (1.0 мг/л). Отмечено, что низкие концентрации регуляторов роста предотвращают каллусогенез и, в то же время, способствуют индукции прямого соматического эмбриогенеза. При низких концентрациях 2,4-Д и в отсутствии кинетина эмбриогенез не наблюдался, что доказывает важную роль кинетина для эмбриогенеза у *F. assa-foetida* [7, 9].

В исследованиях Otroushi et al. [8] низкие концентрации 2,4-Д с кинетином (0.5 или 0.2 мг/л) приводят к соматическому эмбриогенезу *F. assa-foetida*. Высокий процент эмбрионного каллуса был получен на питательной среде В5, содержащей 2,4-Д (0,5 мг/л) + Кин (0.2 мг/л). Авторы отметили, что эмбриогенез не наблюдался до тех пор, пока эксплантаты оставались в первичной индукционной среде и был инициирован после субкультивирования эксплантов на безгормональную питательную среду. Cho et al. [18] также сообщали, что у многих растений, например, моркови, после индуцирования в среде, содержащей 2,4-Д, соматический эмбриогенез осуществлялся на безгормональной питательной среде МС [18–20].

Sharma и Khajuria [10] опубликовали протокол индукции соматического эмбриогенеза в условиях *in vitro* из каллуса, сформированного из черешка *F. jaeschkeana*. Авторы отметили важность использования протокола для массового производства посадочного материала *F. jaeschkeana* в качестве способа сохранения вида. Исследовано применение различных концентраций (0.2–4.0 мг/л ауксинов: 2,4-Д, ИМК, ИУК и НУК) в различных концентрациях), а также безгормональной базовой среды МС для формирования зародышей. Многочисленные шаровидные зародыши были получены на питательной среде с 2,4-Д после 8 недель культивирования. Для дальнейшего их созревания наиболее благоприятной оказалась базовая безгормональная среда МС (18.4 зрелых зародышей/культуру). Следующей по продуктивности оказалась питательная среда с ИМК в концентрации 0.1 мг/л. Дальнейшее включение в состав питательной среды ауксина 2,4-Д ингибировало созревание соматических зародышей [10].

Таблица 2. Комбинации концентраций фитогормонов в питательных средах, успешно использованных при соматическом эмбриогенезе видов рода *Ferula* L.
Table 2. Combinations of phytohormone concentrations in nutrient media successfully used in somatic embryogenesis of species of the genus *Ferula* L.

№	Виды	Среда	Концентрации фитогормонов с наилучшими показателями соматоэмбриогенеза	Доля соматического эмбриогенеза на экплант	Экплант	Тип морфогенеза	Авторы
1	<i>F. assa-foetida</i>	МС	НУК (1.0 мг/л) + Кин (1.5 мг/л)	25–31% 8.4% 6.56%	Корешок, семядоли, гипокотиль	Непрямой соматоэмбриогенез	[5]
			НУК (1.0 мг/л) + Кин (1.5 мг/л)				
			НУК (0.5 мг/л) + Кин (2.0 мг/л)				
	<i>F. assa-foetida</i>	МС	2.4-Д (0.2 мг/л) + Кин (0.2 мг/л)	0.33%	Семядоли гипокотиль	Прямой соматоэмбриогенез	[7]
		B5	2.4-Д (0.5 мг/л) + Кин (0.2 мг/л)	0.22%	Корешок	Непрямой соматоэмбриогенез	[8]
		B5	2.4-Д (0.5 мг/л) + Кин (0.2 мг/л)	4.92%	Гипокотиль	Непрямой соматоэмбриогенез	[10]
2	<i>F. jaeschkeana</i>	МС	Кин (1.0 мг/л) ИМК (0.1 мг/л) + Кин (1.0 мг/л)	18.4 + 0.4% 16.2 ± 0.2%	Черешок	Непрямой соматоэмбриогенез	[10]

В публикациях многих авторов соматический эмбриогенез некоторых видов *Ferula* получен из эмбриогенного каллуса, сформированного на питательных средах, содержащих 2,4-Д с кинетином или НУК с кинетином, чаще всего низкой концентрации (0.2–0.5 мг/л). Использование 2,4-Д с целью индуцирования эмбриогенеза также описано и для других растений семейства *Ariaceae*: *Bunium persicum* [21], *Heracleum candicans* [22], *Glehnia littoralis* [23], *Petroselinum hortense* [24] и *Eustoma grandiflorum* [25].

Стоит отметить, что при пассаже эмбриогенного каллуса некоторых видов *Ferula* на безгормональную среду наблюдается асинхронное формирование зародышей. Использование различных эксплантов показало, что гипокотиль и котилидон являются лучшими эксплантами для индукции эмбриогенеза, а корешок — для индукции каллусогенеза.

Резюмируя данную часть, необходимо отметить, что формирование эмбриогенного каллуса, либо прямого и косвенного эмбриогенеза наблюдалось при низких концентрациях фитогормонов, либо на безгормональной питательной среде.

Органогенез

Органогенез, или формирование униполярной структуры, подразделяется на ризогенез при развитии корня, геммогенез при развитии вегетативной или репродуктивной почки, а также гемморизогенез с одновременным формированием почки и корня. Как и эмбриогенез, органогенез может формироваться непосредственно на экспланте (прямой органогенез), либо на каллусной ткани (косвенный органогенез). Ряд публикаций посвящен органогенезу видов рода *Ferula* (табл. 3).

Так, в исследованиях Zare et al. [6] питательная среда МС, содержащая 1.0–3.0 мг/л БА или кинетин отдельно или в сочетании с 0.2 или 0.5 мг/л НУК, способствовала развитию непрямого органогенеза у *F. assa-foetida*. Наибольшее количество сформированных побегов на эксплант (81.1%) отмечали после переноса каллусной ткани на питательную среду МС, которая содержала БА (1.0 мг/л) и НУК (0.2 мг/л). Авторы отметили, что оптимальная для индукции и пролиферации каллусной ткани среда также содержала комбинации БА и НУК. Формирование проростков из каллусной ткани, полученной из гипокотилия, было более интенсивным (в среднем 7.4 побега на каллусе) в сравнении с каллусной тканью из корней (в среднем 2 побега на каллусе). Фитогормон БА стимулировал индукцию побегов из каллуса эффективнее кинетина. Увеличение концентрации фитогормонов оказало отрицательный эффект на формирование проростков:

(1) не сформировалось ни одного побега на питательной среде с БА (3.0 мг/л) или кинетином с НУК различной концентрации;

(2) количество формирующихся побегов значительно снизилось в питательной среде с кинетином в концентрациях выше 2.0 мг/л;

(3) среднее количество побегов уменьшалось с увеличением концентрации НУК. Регенерации побегов из корневых и семядольных каллусов не наблюдали на базальной среде МС, в то время как на безгормональной среде МС число побегов в каллусах, полученных из гипокотилия, значительно увеличилось. Около 90% саженцев были акклиматизированы и перенесены на почву [6].

В исследованиях Roozbeh et al. [7] развитие саженцев из зародышей *F. assa-foetida* наблюдали на питательной среде В5, которая содержала 2,4-Д (0.5 мг/л) + Кин (0.2 мг/л). Авторы также отметили высокую эффективность увеличения содержания НУК и кинетина в питательной среде при укоренении саженцев. Некоторые экспланты непосредственно укоренялись в этих средах, но другие дали корни после переноса в среду, свободную от гормонов. Основная часть саженцев укоренялась после переноса на безгормональную среду [7].

В исследованиях Sharma и Khajuria [10] зрелые соматические зародыши *F. jaeschkeana* с двумя хорошо развитыми семядолями и гипокотильной корневой осью с большой вероятностью давали развитие проросткам. Для превращения соматических эмбрионов в проростки в качестве контроля использовали среду МС без регуляторов роста, и 15.0% культуры отвечали за превращение соматического эмбриона в проростки. Питательная среда с различными цитокининами (БАП и кинетин) реагировала по-разному, причем БАП оказывался более эффективным в сравнении с кинетином. На питательной среде с БАП концентрацией 0.2 мг/л (%) было отмечено максимальное формирование проростков из зародышей (44.1 ± 3.1). При добавлении в раствор ИМК в количестве 0.01 мг/л, интенсивность их формирования увеличивалась. При этом увеличивалась и скорость превращения соматических зародышей в проростки. В присутствии ИМК 68.1% соматических зародышей формировали проростки.

Известно, что клональное микроразмножение растений путем непрямого эмбриогенеза, часто сопровождается соматической изменчивостью. В то же время в исследованиях Sharma и Khajuria [10] описано формирование нормальных 22 хромосом в клетках кончиков корней *F. jaeschkeana*, регенерированных в условиях *in vitro*, что свидетельствовало о генетической стабильности полученного материала. Регенерированные в условиях *in vitro* растения морфологически не отличались от полученных из семян [10, 17].

В исследованиях Hassani et al. [5] случайный органогенез придаточных корней и побегов, в основном, наблюдали на неэмбриогенных каллусах. Однако, органогенез, который приводил к формированию полноценного растения, формировался из зародышей в течение 4 недель после переноса каллуса на безгормональную питатель-

Таблица 3. Комбинации концентрации фитогормонов в питательных средах, успешно используемых для индукции органогенеза видов рода *Ferula* L.
 Table 3. Combinations of phytohormone concentrations in nutrient media successfully used to induce organogenesis in species of the genus *Ferula* L.

№	Виды	Среда	Концентрации фитогормонов с наилучшими показателями органогенеза	Доля органогенеза на explant	Эксплант	Тип морфогенеза	Авторы
1	<i>F. assa-foetida</i>	МС	БА (1.0 мг/л) + НУК (0.2 мг/л)	7.4 побега на каллусе	Гипокоотиль	Геммогенез	[6]
			ИМК (2.5 мг/л)	7.23 корня на побег	Гипокоотиль	Ризогенез	
2	<i>F. assa-foetida</i>	МС B5	2.4-Д (0.5 мг/л) + Кин (0.2 мг/л)	15.23%	Корешок, семядоли, гипокотиль	Геммогенез	[7]
			БАП (0.2 мг/л) + ИМК (0.01 мг/л) + ГК (30.05 мг/л)	78%	Черешок	Непрямой органогенез	
3	<i>F. orientalis</i>	МС	2.4-Д (0.5 мг/л) + БАП (2 мг/л) 2.4-Д (1.0 мг/л) + БАП (2 мг/л) 2.4-Д (0.5 мг/л) + БАП (1 мг/л)	3.0 побег/11 explant 2.75 побег/10 explant 2.25 побег/9 explant	Одноузловые explantты.	Геммогенез	[11]

ную среду МС. Морфологически все проростки, сформированные из зародышей, были идентичны растениям, проросшим из семян.

Впервые Tuncer [11] провел исследования по использованию одноузловых междоузлий в качестве экспланта при разработке протокола *in vitro* регенерации некоторых лекарственных видов растений. В качестве базальной была использована питательная среда МС. Автор отметил, что в среде с 0.5 мг/л 2,4-Д + 2.0 мг/л БАП наблюдалось наибольшее количество образовавшихся побегов *F. orientalis*. По мнению автора высокая концентрация БАП (2.0 мг/л и более) в комбинации ауксинами более низкой концентрации (0.1, 0.2 и 0.5 мг/л) имеет важное значение для регенерации побегов в условиях *in vitro*. Наибольшее количество побегов на эксплант было получено на питательной среде МС с содержанием фитогормонов 2,4-Д 0.5 мг/л + БАП 2.0 мг/л, чуть меньше – на этой же среде с комбинацией фитогормонов 2,4-Д 1.0 мг/л + БАП 2,0 мг/л или 2,4-Д 0.5 мг/л + БАП 1.0 мг/л. Появление коричневых эксплантов среди культивируемых одноузловых эксплантов варьировалось от 46.9 до 78.1%, а доля инфицированных эксплантов от 15.6 до 28.1%. Потемнение, происходящее в условиях *in vitro*, приводит к потере жизнеспособности тканей у многих видов, богатых фенольными соединениями. Известно, что внесение в питательную среду фенол-адсорбирующих компонентов (как например, поливинилпирролидон, активированный уголь, нитрат серебра) способствуют снижению потерь, в результате возникновения коричневых тканей [11].

Резюмируя данную часть, нужно отметить, что для исследованных к настоящему моменту видов рода *Ferula* оптимальной питательной средой для инициирования органогенеза является среда МС с высоким содержанием цитокинина БАП в сочетании с низкой концентрацией ауксина НУК.

ВЫВОДЫ

Приведенный обзор опубликованных ранее протоколов для видов рода *Ferula* вновь доказывает важность выбора экспланта, комбинаций фитогормонов, а также состава питательной среды для успешного протекания процессов морфогенеза. Показатель каллусогенеза по сравнению с сегментами гипокотыля и семядолей на корневых эксплантах выше. В то же время, органогенез развивался наиболее интенсивно на гипокотыле.

Низкие концентрации ауксинов в сочетании с кинетином предотвращают каллусогенез исследованных видов рода *Ferula* и, чаще всего, индуцируют соматический эмбриогенез. При низких концентрациях 2,4-Д и кинетина, либо НУК и кинетина отмечалось формирование эмбриогенного каллуса. Субкультивирование на безгормональную среду, либо использование безгормональной среды

в качестве индуцирующей питательной среды способствовало развитию биполярных зародышей.

Для размножения востребованных, экономически важных растений, биотехнология предлагает прогрессивные способы и подходы; среди них, прямой соматический эмбриогенез и органогенез являются наиболее перспективными направлениями, позволяющими избежать генетические изменения в полученных растениях-регенерантах. Прямой соматический эмбриогенез *F. assafoetida* был получен на безгормональной питательной среде МС [13]. В то же время Roozbeh et al. [7] отметили важную роль кинетина для формирования эмбриогенеза у этого вида [9, 13], о чем также свидетельствует Otroschi et al. [8]. Прямой соматический эмбриогенез *F. gummosa* получен на питательной среде с низкой концентрацией ауксинов (0.5 мг/л 2,4-Д или 1.0 мг/л НУК), а не прямой – на безгормональной среде МС [9].

Преимуществом прямого эмбриогенеза являются отсутствие фитогормонов в питательной среде либо их низкая концентрация. Кроме того, индукция и развитие прямых соматических эмбрионов завершается через 4 месяца, в то время как в протоколе индукции каллуса и непрямого соматического эмбриогенеза он завершается через 5 месяцев. Более того, протокол прямого соматического эмбриогенеза проще и дешевле, чем непрямого соматического эмбриогенеза.

Согласно анализу публикаций по введению в культуру видов *Ferula* методы *in vitro* должны быть оптимизированы для каждого вида индивидуально, принимая во внимание результаты многочисленных исследований, изложенных в данном обзоре.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данный обзор выполнен в рамках проекта Института ботаники Академии Наук Республики Узбекистан А-ФА-2021-146 “Создание технологии организации и размножения лекарственных растений методом *in vitro*”, финансируемого Министерством инновационного развития Республики Узбекистан.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Миревич В.М., Горячкина Е.Г., Бочарова Г.И., Федосеева Г. Лекарственные растения, включенные в Красную книгу: учебное пособие. ФГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава РФ, кафедр фармакогнозии и ботаники. – Иркутск: ИГМУ, 2016, 70 с.
2. Рахмонов Х.С. Биология и ресурсы *Ferula tadshikorum* Pimen. в Южном Таджикистане. Дисс. ...канд. биол. наук, Таджикский Государственный Педагогический. Университет, Биологический факультет, Душанбе, 2017.
3. Sharopov F.S., Khalifaev P.D., Satyal P., Sun Y., Safomuddin A., Musozoda S., Setzer W.N. The chemical composition and biological activity of the essential oil from the underground parts of *Ferula tadshikorum* (Apiaceae). *Records of Natural Products*, 2019, 13(1), 18–23. <https://doi.org/10.25135/rnp.65.18.02.089>

4. Suran D., Bolor T., Bayarmaa G. *In vitro* Seed Germination and Callus Induction of *Ferula ferulaeoides* (Steud.) Korov. *Mongol. J. Biol. Sci.*, 2016, 14(1–2), 53–58.
<https://doi.org/10.22353/mjbs.2016.14.07>
5. Hassani B., Saboora A., Radjabin T., Fallah Husseini H. Somatic embryogenesis of *Ferula assafoetida*. *Journal of Science, University of Tehran*, 2008, 4(33), 15–23.
6. Zare A.R., Solouki M., Omidi M., Irvani N., Mahdi Ne-zad N., Rezazadeh Sh. Callus induction and plant re-generation in *Ferula assafoetida* L.(Asafetida), an en-dangered medicinal plant. *Trakia Journal of Sciences*, 2010, 8(1), 11–18.
7. Roozbeh S., Otroshy M., Bozorgipoor R., Ebrahimi M., Moeini Najafabadi A., Struik P.C. Micropropagation of *Ferula assa-foetida* L. (a medicinal plant) via direct so-matic embryogenesis. International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants IMAPS2010 and His-tory of Mayan Ethnopharmacology IMAPS2011 964, 2011, 143–152.
8. Otroshy M., Edrisi S., Enteshary S. Propagation of me-dicinal plant *Ferula assa foetida* L. through indirect so-matic embryogenesis. *Int. J. Med. Plant Res.*, 2013, 2(3), 179–186.
9. Bernard F., Bazarnov H.Sh., Khatab L.J., Darabi A.Sh., Sheidai M. *Ferula gummosa* Boiss. Embryogenic Cul-ture and Karyological Changes. *Pak. J. Biol. Sci.*, 2007, 10(12), 1977–1983.
<https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.1977.1983>
10. Sharma R.K., Khajuria A.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Ferula jaeschkeana* Vatke: a threatened medicinal herb. *Vegetos*, 2020, 33(4), 658–664.
<https://doi.org/10.1007/s42535-020-00154-1>
11. Tuncer B. Investigation of the *in vitro* regeneration of some medical and aromatic wild plant species. *Appl. Ecol. Environ. Res.*, 2017, 15(4), 905–914.
https://doi.org/10.15666/aeer/1504_905914
12. Филиппов П.П. Как внешние сигналы передаются внутрь клетки. *Статьи Соросовского образователь-ного журнала*, 1998, 4(3), 78–84.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, 15(3), 473–497.
14. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient require-ments of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 1968, 50(1), 151–158.
15. Chandrasekhar T., Hussain M.A., Ghanta R.K., Sriniva-sa Rao J.V. Somatic embryogenesis of *Tylophora indica* (Burm.F.) Merril. an important medicinal plant. *Int. J. Appl. Sci. Eng.*, 2006, 4(1), 33–40.
16. Salehi M., Naghavi M.R., Bahmankar M. A review of *Ferula* species: Biochemical characteristics, pharma-ceutical and industrial applications, and suggestions for biotechnologists. *Ind. Crops Prod.*, 2019, 139, 111511.
17. Sharma R.K. Callus formation in *Ferula jaeschkeana* Vatke. *Int. J. Plant Sci.* (Muzaffarnagar), 2015, 10(1), 98–101.
<https://doi.org/10.15740/HAS/IJPS/10.1/98-101>
18. Cho D., Lee Y., Chung W.I., Soh W.Y. Enhanced somatic embryogenesis and plant regeneration in leaf explants cultures of *Ostericum koreanum* on medium of varying pH. *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.*, 2003, 75(3), 215–222.
19. Tiwari K.N., Sharma N.C., Tiwari V., Singh B.D. Micro-propagation of *Centella asiatica* L., a valuable medicinal herb. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 2000, 63(3), 179–185.
20. Martin K.P. Plant regeneration through somatic em-bryogenesis in medicinally important *Centella asiatica* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant*, 2004, 40(6), 586–591.
<https://doi.org/10.1079/IVP2004573>
21. Wakhlu A.K., Nagari S., Barna K.S. Somatic embryo-genesis and plant regeneration from callus cultures of *Bunium persicum* Boiss. *Plant Cell Rep.*, 1990, 9(3), 137–138.
22. Wakhlu A.K., Sharma R.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Heracleum candicans* wall. *Plant Cell Rep.*, 1998, 17(11), 866–869.
23. Hirai G., Kasai N., Harada T. Somatic embryogenesis in mature zygotic embryo culture of *Glehnia littoralis*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1997, 48(3), 175–180.
24. Vasil I.K., Hildebrandt A.C. Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures II. *Petroselinum hort-ense*. *Am. J. Bot.*, 1966, 53(9), 869–874.
25. Yumbala-Orbes M., Rocha D.I., Matos E.M., Koehler A.D., Pinheiro M.V.M., Batista D.S., Freitas D.M.S., Cruz A.C.F., Barbosa J.G., Viccini L.F., Otoni W.C. Somatic embryo-genesis induced from vascular tissues in leaf explants of Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn) gener-ates true-to-type diploid plants. *Vegetos*, 2020, 33(1), 135–144.

The role of Exogenous Phytohormones as a Key *in vitro* Factor in the Morphogenesis of Some Species of the *Ferula* L. (Apiaceae Lindl.) Genus

D. N. Jamalova^{a, #}, F. U. Mustafina^a, G. T. Kurbaniyazova^a, and D. E. Turdiev^a

^a*Institute of Botany, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, 100125 Uzbekistan*

[#]*e-mail: dilafruz.jamalova.91@mail.ru*

Abstract—This review discusses the protocols of clonal micropropagation using growth regulators at different stages of morphogenesis. The information on the induction of callusogenesis, organogenesis and embryogenesis in some species of the *Ferula* L. genus is represented, and optimal concentrations of exogenous auxins and cytokinins, contributing to these processes, are indicated. This review can be used to develop a protocol for micropropagation of economically valuable, medicinal and often endangered species of the genus *Ferula* L.

Keywords: medicinal plants, phytohormones, *Ferula* L., callusogenesis, somatic embriogenesis, explant, clonal reproduction, *in vitro* culture, cytokinins, auxins