

УДК: 633:511

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР У СОРТОВ ХЛОПЧАТНИКА, ОТНОСЯЩИХСЯ К ВИДАМ *GOSSYPIMUM HIRSUTUM* L. И *GOSSYPIMUM BARBADENSE* L.

Хўжақулова Наима Шахри қизи 
базовый докторант (PhD)

Мамедова Феруза Фахриддиновна 
доктор философии по сельскохозяйственным наук

Курбонов Абдоржон Ёркинович 
доктор сельскохозяйственных науки, старший научный сотрудник

Мамадалиев Алп-Баходир Шухрат ўгли 
Студент ТашГАУ

Аннотация

В наших исследованиях у местных сортов Гулистан, Сурхон-106, Андижан, Бухара-105, С-6575, С-8296 и Сосер-310, относящихся к видам *G. hirsutum* L. и *G. barbadense* L., были изучены морфологические и физиологические характеристики каллусных тканей, а также процессы индукции и регенерации. На основе проведённых анализов были исследованы состояние каллусных тканей и их реакция в различных питательных средах.

Ключевые слова: *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L., каллусные ткани, морфологические, физиологические, индукция хлопчатника, регенерация.

Annotatsiya

Tadqiqotlarimizda *Gossypium hirsutum* L. va *Gossypium barbadense* L. turlariga mansub mahalliy paxta navlari — Guliston, Surxon-106, Andijon, Buxoro-105, S-6575, S-8296 va Cocer-310 — ning kallus to'qimalarining morfologik va fiziologik xususiyatlari, shuningdek, induksiya va regeneratsiya jarayonlari

AGRO KIMYO HIMOYA VA O'SIMLIKLAR KARANTINI

o'rganildi. O'tkazilgan tahlillar asosida kallus to'qimalarining holati va ularning turli oziqa muhitlaridagi reaksiyasi tadqiq qilindi.

Kalit so'zlar: *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L., kallus to'qimalari, morfologik, fiziologik, paxta induksiyasi, regeneratsiya.

Abstract

In our studies, the morphological and physiological characteristics of callus tissues, as well as induction and regeneration processes, were observed in local varieties Guliston, Surkhon-106, Andijan, Bukhara-105, C-6575, C-8296, and Coker-310, belonging to the species *G. hirsutum* L. and *G. barbadense* L. Based on the analyses conducted, the condition of callus tissues and their response in various nutrient media were examined.

Keywords: *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L., callus tissues, morphological, physiological, cotton induction, regeneration.

Введение.

Хлопок является одной из важнейших волокнистых культур в мире. Узбекистан занимает восьмое место в мире по площади возделывания хлопка. Сорта хлопчатника *G. hirsutum* L. и *G. barbadense* L. относятся к группе волокнистых растений по стоимости производимой продукции и занимают первое место среди технических сельскохозяйственных культур, составляя 70-75% сырья прядения (Умбетаев И.И., 2005). На протяжении многих лет селекционеры улучшали хлопок с помощью традиционных методов разведения, но эти методы требуют много времени. Селекционеры чтобы сократить время обратились к трансформации растений *in vitro* или генной инженерии. По всему миру инициировали программу улучшения хлопка, в ходе которой было выведено множество высокоурожайных сортов. Резкое снижение урожайности из-за биотических и абиотических стрессов хорошо известно. Разработка эффективной системы регенерации в сортах хлопчатника необходима для расширения сферы биотехнологических манипуляций в улучшении хлопчатника. Культура клеток, тканей и органов растений *in vitro* выращивается на искусственно приготовленных питательных средах, и полученные растения считаются свободными от вирусов и бактерий (George и др., 2008). В наших исследованиях у местных сортов Гулистан, Сурхон-106, Андижан, Бухара-105, C-6575, C-8296 и Coker-310, относящихся к видам *G. hirsutum* L. и *G. barbadense* L., были изучены морфологические и физиологические характеристики каллусных тканей мы оптимизировали питательных сред. Для генетической манипуляции *G. hirsutum* сорт Coker был максимально использован с многочисленными сообщениями о его регенерации посредством соматического эмбриогенеза (Davidonis G.H., 1983).

AGRO KIMYO HIMOYA VA O'SIMLIKLAR KARANTINI

Основными компонентами питательных сред для культуры клеток и тканей растений являются минеральные соединения (макро- и микроэлементы), источник углеродного питания (обычно сахара или глюкоза), витамины, регуляторы роста. Иногда в состав питательных сред включают комплексные органические добавки (гидролизат казеина или смесь аминокислот, дрожжевой экстракт, кокосовое молоко, экстракты из определенных органов растений) (Plant Cell Technology, 2023; Biology Discussion, 2022).

Основные характеристики каллусных культур: основной важнейшей особенностью популяции соматических клеток является нестабильность генома клеток и их генетическая гетерогенность – появление в процессе культивирования полиплоидных, анеуплоидных клеток, клеток с хромосомными абберациями и генными мутациями (Dodds & Roberts, 1985; Batygina, 1987 – KPFU.)

Проведенные гистологические и электронномикроскопические исследования позволили выявить некоторые морфологические и гистологические особенности различных типов каллусных культур гречихи (Kruglova et al., 2023 – MDPI).

1. Белый рыхлый каллус состоял из дедифференцированных паренхимных клеток с большой центральной вакуолью (Biology Discussion, 2022)

2. Плотногобулярный белый или желтоватый (рис.4а), медленно нарастающий каллус представлен плотно сцепленными между собой глобулами, состоящими из массы крупных вакуолизированных клеток, покрытых сверху обширными слоями мелких меристематических клеток.

3. Гетерогенный каллус, состоящий из рыхлых глобул серого, желтого или светло-коричневого цвета, в большинстве случаев медленно нарастающий.

4. Плотный бело-серый, медленно нарастающий каллус (рис. 6а). Каллусная ткань была представлена плотно прилегающими друг к другу паренхимными клетками (Dodds & Roberts, 1985)

5. Глобулярный, распадающийся при культивировании на отдельные, не связанные между собой глобулы. В глобулярных каллусах меристематические зоны расположены в центре отдельной глобулы и окружены сверху обкладкой из паренхимных клеток. Однако регенерация у хлопка является проблемой из-за: 1) зависимости от генотипа, 2) соматической изменчивости, 3) отсутствия знаний о наследовании и действии генов во время эмбриогенеза *in vitro* и 4) специфических требований к среде для разных генотипов (Wilkins TA, Mishra R 2004). Наиболее высокой регенерационной способностью обладал плотный, матовый, узловатый каллус белого или желтого цвета с белыми вкраплениями. Исследования показали, что этот каллус

AGRO KIMYO HIMOYA VA O'SIMLIKLAR KARANTINI

состоит из округлых, мелких клеток с густой цитоплазмой и крупным ядром, что характерно для меристематических клеток. Этот морфотип был назван высокорегенеративным. Однако каллусы такого типа составляли лишь небольшую часть от общей массы сформированных каллусов (менее 10%), а у некоторых сортов таких каллусов вообще не было получено (Kruglova et al., 2023 – MDPI; Batygina, 1987).

Материалы и методы.

Растительные материалы.

Этот эксперимент проводилась в лаборатории «Биотехнология хлопка» ПСУЕАИТИ.

Стерилизация и проращивание семян.

Семена Гулистон, Сурхон-106, Андижон, Бухоро-105, С-6575, С-8296 ва Socer-310 было очищены от ворса концентрированной H_2SO_4 следующим этапом было метод эффективный и экономичный способ стерилизации (А. Bakhsh, и E. Anayol 2016). Использовали этанол (70%), гипохлорит натрия (20%) и H_2O_2 (перекись водорода) 15%, мыльный раствор и стерильную дистиллированную воду. В лабораторных условиях всхожесть семян хлопчатника была проверена на основе O'z DSt 1128:2006.

Инициация и поддержание каллуса.

Мы оптимизируем для Гулистон, Сурхон-106, Андижон, Бухоро-105, С-6575, С-8296 ва Socer-310 несколько методов для приготовления питательной среде Krishna Mohan Pathi и Narendra Tuteja (2013), Ibrokhim Y. Abdurakhmonov (2014), чтобы получить морфологические и физиологические характеристики каллусных культур. Влияние углеводов играет важную роль в полноценном развитии культур клеток, тканей и органов *in vitro*. К основным углеводам, которые могут использоваться растениями в искусственных питательных средах, относятся моносахаридные гексозы (глюкоза, фруктоза, галактоза и манноза), пентозы (арабиноза, рибоза, ксилоза), дисахариды (мальтоза, лактоза, целлобиоза, трегалоза) и трисахариды (раффиноза) (Yatazawa и др., 1967). В органогенезе хлопчатника широко применяются такие углеводы, как сахароза, фруктоза, глюкоза и манноза. По данным некоторых исследователей, различные углеводы оказывают неодинаковое влияние на морфогенез тканей в зависимости от вида растения (Skrebsky и др., 2004).

Результаты и обсуждение.

Гипокотиль и семядольные экспланты от Гулистон, Сурхон-106, Андижон, Бухоро-105, С-6575, С-8296 ва Socer-310 было посажено в

AGRO KIMYO HIMOYA VA O'SIMLIKLAR KARANTINI

оптимизированных несколько для приготовления питательной среде. Экспланты были выращены при температуре 28 ± 2 °C при фотопериоде 16 ч/8 свет/темнота в белом люминесцентном ламповом свете ($60 \text{ мкмоль/м}^2/\text{с}$). Активно растущие каллусы, полученные после 8 недель. Из гипокотильной части полученных эксплантов нами были получены различные типы каллусных тканей. У некоторых каллусов было побурение вызвано ферментативными реакциями, которые приводят к окислению фенольных соединений и хлорогеновых кислот (Cheng G.W., 1995). Эта проблема была решена путем увеличения скорости субкультивирования в течение 3 недель и отбрасывания коричневых частей, которые сохраняли их свежими и растущими (Chaudhary, G 2015).

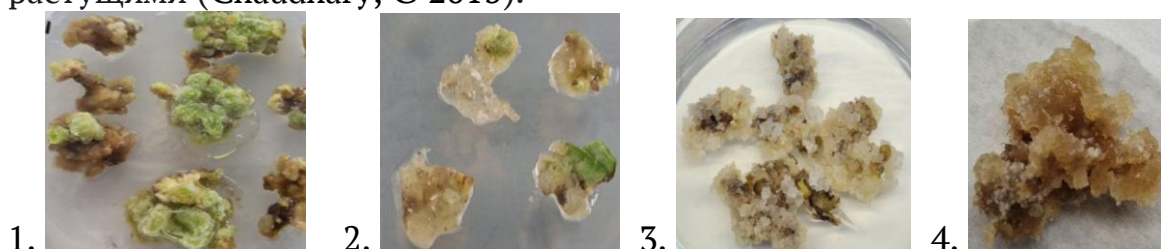


Рисунок 1. Типы каллусов, полученных из наших эксплантов.

1. Плотноглобулярный каллус. 2. Белый рыхлый каллус.
3. Гетерогенный каллус. 4. Глобулярный каллус.

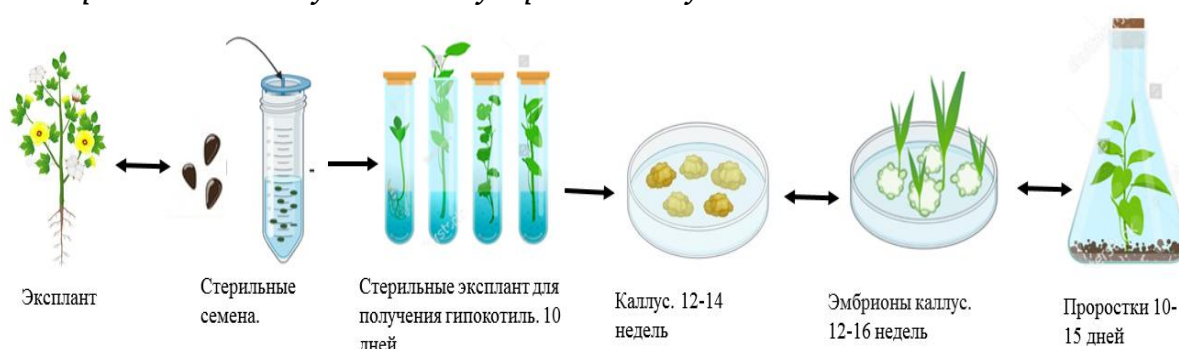


Рисунок 2. Последовательность выполнения работы (рабочая схема)

Выводы.

Реакция эксплантов на образование каллуса значительно различалась в зависимости от их исходного органа. Установлено, что гипокотильные экспланты формировали каллус с большей частотой и интенсивностью по сравнению с эксплантами семядолей. Подобное превосходство гипокотилия над семядолями в способности к каллусообразованию ранее также было отмечено Уилкинсом и соавт. (Wilkins T.A., 2004). В проведенном исследовании показано, что различные комбинации регуляторов роста — ИБА, кинетин является одним из наиболее часто используемых регуляторов роста в сочетании, с 2,4-Д, 6-БАП, ИУК, НУК, 2-иР и ТдЗ — оказывали стимулирующее влияние на индукцию каллуса и приводили к формированию

AGRO KIMYO HIMOYA VA O'SIMLIKLAR KARANTINI

различных его морфотипов (Kumar M. 2013). В наших последующих экспериментах для дальнейшего анализа были отобраны преимущественно гетерогенные каллусы. Среди них наибольшей регенерационной способностью обладал плотный, матовый, узловатый каллус белого или жёлтого цвета с характерными белыми вкраплениями. Гистологические исследования показали, что он состоит из мелких округлых клеток с густой цитоплазмой и крупным ядром, что типично для меристематических клеток. Данный морфотип был охарактеризован как высокорегенеративный. Такие исследования желательны для расширения сферы применения биотехнологических подходов к рекальцитрантным сортам хлопка.

Литературы:

1. Bakhsh, E., Anayol, C., Sancak, C., Özcan, S. An efficient and cost effective sterilizing method with least microbial contamination and maximum germination ratio for in vitro cotton (*Gossypium hirsutum* L.) culture // The Journal of Animal & Plant Sciences. – 2016. – P. 868–873.
2. Батыгина, Т.Б. Клеточная биология и морфогенез растений. – Л.: Наука, 1987. – 312 с.
3. Callus Culture: Definition and Applications // Plant Cell Technology. – 2023. – Режим доступа: <https://plantcelltechnology.com/blogs/blog/callus-culture-definition-and-application> (дата обращения: 16.08.2025).
4. Callus Tissue: Morphology, Internal Structure and Characteristics // Biology Discussion. – 2022. – Режим доступа: <https://www.biologydiscussion.com/plant-tissues/callus-tissue/callus-tissue-morphology-internal-structure-and-characteristics-with-diagram> (дата обращения: 16.08.2025).
5. Dodds, J.H., Roberts, L.W. Experiments in plant tissue culture. – Cambridge: Cambridge University Press, 1985. – 232 p.
6. Kruglova, Z., Zinatullina, A., Yegorova, O. Histological approach to the study of morphogenesis in callus cultures in vitro // Life. – 2023. – Vol. 14, № 2. – P. 42. DOI: 10.3390/life1402042.
7. Умбетаев, И.И. Технология возделывания отечественных сортов хлопчатника. – Алматы, 2005. – 235 с.
8. Kumar M, Shukla AK, Singh H, Verma PC, Singh PK. A genotype-independent agrobacterium mediated transformation of germinated embryo of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) International Journal of Bio-Technology and Research. 2013;3:81–90
9. Davidonis GH, Hamilton RH. Регенерация растений из каллусной ткани *Gossypium hirsutum* L. Plant Sci Lett. 1983;32:89–93.
10. Krishna Mohan Pathi and Narendra Tuteja. High-frequency regeneration via multiple shoot induction of an elite recalcitrant cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv Narashima) by using embryo apex 2013.

AGRO KIMYO HIMOYA VA O'SIMLIKLAR KARANTINI

11. Ibrokhim Y. Abdurakhmonov, Zabardast T. Buriev, Phytochrome RNAi enhances major fibre quality and agronomic traits of the cotton *Gossypium hirsutum* L. Nature communications. 5:3062. DOI: 10.1038/ncomms4062. www.nature.com/naturecommunications.
12. Wilkins TA, Mishra R, Trolinder NL. Agrobacterium mediated transformation and regeneration of cotton. Food Agri. Env. 2004;2:179-87.
13. George EF, Hall MA, Klerk GJD (2008) The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. Plant propagation by tissue culture pp 65-113
14. Yatazawa M, Furuhashi K, Shimizu M (1967) Growth of callus tissue from rice-root in vitro. Plant Cell Physiol 8(3):363.
15. Skrebsky EC, Nicoloso FT, Ferrao GE (2004) Sacarose e peri´odo de cultivo in vitro na aclimatizaco ex vitro de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). Cieˆncia Rural 34(5):1471-1477.
16. S J Dalton (2020) A reformulation of Murashige and Skoog medium (WPBS medium) improves embryogenesis, morphogenesis and transformation efficiency in temperate and tropical grasses and cereals. Plant Cell Tissue Organ Cult 257-273 **6**.
17. Kumar M, Shukla AK, Singh H, Verma PC, Singh PK. Induction and establishment of somatic embryogenesis in elite Indian cotton cultivar (*Gossypium hirsutum*L. cv Khandwa-2) Plant Signal Behav . 2013 Oct 29;8(10):e26762. doi: 10.4161/psb.26762
18. Cheng, G.W. and Crisosto, C.H. (1995). Browning potential, phenolic composition and polyphenoxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue. Journal of the American Society for Horticultural Science. 120: 835-838.
19. Chaudhary, G. and Dantu, K. (2015). Evaluation of callus browning and develop a strategically callus culturing of *Boerhaavia diffusa* L. Journal of Plant Development. 22: 47-58.
20. O'z DSt 1128:2006. Методы определения всхожести семян хлопчатника. – Ташкент, 2006. – 20 с.