

Д.Н. Жарасова*, Н.А. Толеп

*Мангышлакский экспериментальный ботанический сад, Актау, Казахстан
Автор для корреспонденции: dypara_zharassova@mail.ru

Особенности введения в культуру *in vitro* барбариса илийского (*Berberis iliensis* М. Поп.)

Приведены результаты введения в культуру *in vitro* барбариса илийского (*Berberis iliensis* М. Поп.) — редкого эндемичного растения. В настоящее время редкий вид находится под угрозой исчезновения. Отработаны способы введения в культуру *in vitro*, подобраны стерилизующие агенты и режимы стерилизации (5%-ный раствор отбеливатель «Белизна», время обработки 5 мин, 10%-ный раствор перекиси водорода, время экспозиции 7 мин). Определена оптимальная для успешного развития растений *Berberis iliensis* в культуре *in vitro* питательная среда WPM, с уровнем pH 5,6–5,8. К стандартному минеральному составу среды были добавлены витамины. Мадженты с эксплантами культивировали в комнате без доступа света при температуре 22–25 °С и влажности 70 % в течение 3–4 недель. Дальнейшее культивирование проводили при 26 °С, световом периоде 16 ч и освещенности 4–5 тыс. люкс. Получены асептические культуры *Berberis iliensis*, которые обладают регенеративной способностью. Побегообразовывались без каллуса, то есть наблюдается прямая регенерация, что является наиболее благоприятным для микроклонального размножения.

Ключевые слова: *Berberis iliensis*, семена, *in vitro* культура, стерилизация эксплантов, питательная среда, WPM, культивирование.

Введение

Сохранение генофонда растительного мира и введения в культуру редких видов, в том числе и реликтовых видов, является актуальной задачей современности. Эта задача осуществляется, с одной стороны, при помощи разработки методов учета и охраны редких и исчезающих видов растений, с другой — за счет отработки приемов выращивания этих растений *in situ* и *in vitro* [1].

Сохранение биологического разнообразия — одна из важнейших задач в деле охраны природы, которой уделяют большое внимание во всем мире. Важность сохранения биоразнообразия воспринята людьми, как на мировом, так и на национальном уровне. Об этом свидетельствует принятая на Генеральной ассамблее Международного союза биологических наук при поддержке ЮНЕСКО Международная программа «DIVERSITAS», Международная Конвенция о сохранении биологического разнообразия и Постановление Правительства Республики Казахстан [2, 3].

Перечисленные выше программные документы предлагают в качестве мер по сохранению биоразнообразия, в частности, разнообразия флоры, использование методов *ex situ* (создание коллекций живых растений в ботанических садах, хранилищ зародышевой плазмы, семенных банков и др.) и *in situ* (создание в природных условиях особо охраняемых природных территорий). Но, наряду с традиционными способами сохранения растений *ex situ* и *in situ*, все большее значение приобретает использование методов биотехнологии, в частности, методик культивирования изолированных тканей и органов [4].

Барбарис илийский (*Berberis iliensis* М. Поп.) — ветвистый колючий кустарник высотой до 3–4 м, с бледно-красными, продолговато-яйцевидными плодами. Распространен в ущельях в восточной части Заилийского Алатау и Кетменского хребта, на южных склонах Джунгарского Алатау, вблизи устьев рек Чилик, Чарын, впадающих в реку Или. С 1978 г. вид занесен в Красную книгу Казахстана, так как часть ареала была уничтожена при строительстве Капчагайского и Бортогайского водохранилищ на реках Или и Чилик, к тому же небольшие по размеру и фрагментированные суб-популяции испытывают антропогенный стресс из-за отбора воды, рубки и пожаров [5, 6].

B. iliensis представляет научный и практический интерес, так как, имея пищевое, лекарственное и косметологическое значение, изучен недостаточно [7, 8]. Учитывая полезные свойства данного исчезающего вида барбариса, важно изучить и сохранить это уникальное растение в природных популяциях. В дополнение к традиционным методам необходимо сохранение растений в культуре *in vitro* с отработкой методов длительного хранения [9–12].

Исходя из сказанного выше, целью нашей работы являлось изучение особенностей введения в культуру *in vitro* барбариса илийского.

Материалы и методы

Работы с культурой *in vitro* проводили в стерильных условиях лаборатории биотехнологии РГП «Мангышлакский экспериментальный ботанический сад» КН МОН РК. В качестве исходного материала для введения в культуру *in vitro* использовали семена барбариса илийского.

Для стимулирования прорастания семена *B. iliensis* после годовой холодной стратификации (при температуре 0–2 °С) предварительно замачивали в течение 22–24 ч в 0,5 %-ном растворе $KMnO_4$, затем переносили на среду WPM.

Растительный материал промывали в мыльном растворе и проточной воде, обрабатывали 70 %-ным этанолом, затем стерилизовали в растворе отбеливателя «Белизна» (1:1) с последующим промыванием в стерильной воде, а затем в 10 %-ном растворе перекиси водорода (H_2O_2). Концентрацию стерилизующего раствора и время экспозиции подбирали экспериментально. Схема опыта по стерилизации представлена в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Схема стерилизации растительного материала *B. iliensis*

Стерилизующий раствор	Время экспозиции, мин*				
	Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4	Вариант 5
70 % этанол	2	2	2	2	2
10 % «Белизна»	5	10	-	-	15
5 % «Белизна»	-	-	5	10	-
10 % перекись водорода	-	-	7	10	7

Примечание. *Промывка семян после обработки трехкратно в стерильной дистиллированной воде.

Метод культуры *in vitro* проводили на среде Woody Plant Medium (WPM), с уровнем pH 5,6–5,8. К стандартному минеральному составу среды были добавлены витамины. Мадженты с эксплантами культивировали в комнате без доступа света при температуре 22–25 °С и влажности 70 % в течение 3–4 недель. Дальнейшее культивирование проводили при 26 °С, световом периоде 16 ч и освещенности 4–5 тыс. люкс. Для поддержания пролиферирующих культур каждые 2–3 недели экспланты пересаживали на свежую питательную среду. Проводили до 3-х пассажей для укоренившихся черенков. Микропобеги при пересадке делили на 2–3 части.

Учет количества проросших семян проводили через каждые 7–10 дней в течение четырех месяцев культивирования на стеллажах световой. Проводили учет зараженных и некротизированных эксплантов. Оценка полученных чистых культур (стерильных) проводили по количеству выживших эксплантов.

Результаты и обсуждение

Жизнеспособный асептический материал *B. iliensis* удалось получить после последовательной стерилизации в 70 % этаноле (2–3 мин), 5 % «Белизне» (5 мин) и 10 % растворе перекиси водорода (7 мин). Применение этанола и раствора «Белизны» оказалось недостаточным, после культивирования на следующие 3–5 сутки экспланты очень быстро поражались патогенной микрофлорой. В ходе эксперимента дополнительно применяли раствор перекиси водорода. Увеличение времени экспозиции стерилизующего агента вызывали ожог эксплантов. Признаки прорастания у семян появились через 3–4 недели культивирования, всхожесть семян составила от 23,5 до 62,7 % (рис. 1). В каждом из вариантов обработки было получено от 60 до 85 микропобегов.

Результаты опытов показали, что 90 % стерильность эксплантов была достигнута в варианте с использованием следующего режима стерилизации: 70 % этиловый спирт, время экспозиции 3 мин, 5%-ный раствор отбеливателя «Белизна», время обработки 5 мин, 10 %-ный раствор перекиси водорода, время экспозиции 7 мин. При этом отмечена сохранность побегов. Так, наибольшее количество жизнеспособных эксплантов (60,5 %) было получено именно в данном варианте обработки (табл. 2).



Рисунок 1. Проращивание семян барбариса илийского на питательной среде

Т а б л и ц а 2

Количество полученных жизнеспособных эксплантов в зависимости от условий стерилизации растительного материала *B.iliensis*

Вариант	Стерилизующий раствор	Время экспозиции, мин	Кол-во жизнеспособных эксплантов, %
1	70 % этанол 5 % «Белизна» 10 % перекись водорода	3	60,5
		5	
		7	
2	70 % этанол 5 % «Белизна» 10 % перекись водорода	3	24,7
		10	
		10	
3	70 % этанол 5 % «Белизна» 10 % перекись водорода	3	23,5
		10	
		15	

Образовавшиеся при стерильном проращивании микропобеги были поделены на экспланты, а затем снова помещены на питательную среду WPM. Полученные микропобеги успешно укоренились на безгормональной питательной среде. Количество микропобегов увеличивалось при каждом пассаже на свежую питательную среду (рис. 2).

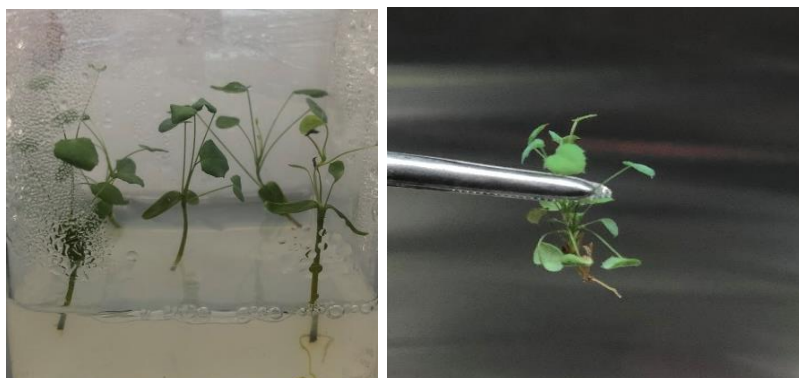


Рисунок 2. Микроклональное размножение *B. iliensis*

Так, после 1-го пассажа — в 2,5 раза, после 2-го — в 2,2 раза, после 3-го — в 1,8 раза.

Результаты исследований показали, что введение в культуру *in vitro* *B. iliensis* — длительный и сложный процесс, требующий детального подхода к каждому этапу культивирования.

Заклучение

Таким образом, получены асептические культуры *B. iliensis* и они обладали регенеративной способностью. Выявлено, что оптимальной питательной средой для введения в культуру *in vitro* являлась среда WPM. Побегообразовывались без каллуса, то есть наблюдается прямая регенерация, что является наиболее благоприятным для микроклонального размножения. Оптимизированы условия стерилизации семян для получения жизнеспособных микропобегов.

Статья подготовлена в рамках научно-технической программы «Разработка научно-практических основ и инновационных подходов интродукции растений в природных зонах Западного и Восточного Казахстана для рационального и эффективного использования» Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (2021–2022 гг.).

Список литературы

- 1 Сулейманова З.Н. Особенности биологии цикласа поникающего при культивировании в условиях оранжереи / З.Н. Сулейманова // Научные ведомости. Сер. Естественные науки. — 2014. — № 17 (188). — Вып. 28. — С. 56–59.
- 2 Национальная стратегия и План действий по сохранению и сбалансированному использованию биологического разнообразия. — Алматы, 1999. — 336 с.
- 3 Об утверждении Перечней редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений и животных. Постановление Правительства Республики Казахстан от 31 октября 2006 г. № 1034 [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://adilet.zan.kz/rus/docs/P060001034_/links.
- 4 Асанова Г.К. Введение в культуру *in vitro* барбариса каркаралинского (*Berberis karkaralensis* Korn. et Potap.) / Г.К. Асанова, З.К. Шаушеков, И.О. Байтулин, С.М. Адекенов // Изв. НАН Республики Казахстан. Сер. биол. и мед. — 2016. — Т. 315, № 3. — С. 15–20.
- 5 Красная книга Казахской ССР. — Алма-Ата: Наука, 1981. — 263 с.
- 6 Кокорева И.И. Растения Джунгарского и Заилийского Алатау, нуждающиеся в охране / И.И. Кокорева. — Алматы, 2007. — 212 с.
- 7 Ryabushkina N. Brief review of Kazakhstan flora and use of its wild species / N. Ryabushkina, N. Gemedjjeva, M. Kobaisy, C. L. Cantrell // The Asian and Australasian journal of plant science and biotechnology. — 2008. — Vol. 2 (2). — P. 64-71.
- 8 Karimov A. Investigation of the alkaloids of *Berberis iliensis* / A. Karimov, R. Shakirov // Chem. Nat. Comp. — 1993. — Vol. 29, No. 1. — P. 69-70.
- 9 Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity / F. Engelmann // In Vitro Cellular & Developmental Biology. — 2011. — Vol. 47 (1). — P. 5-16.
- 10 Keller E.R.J. Cryopreservation for plant genebanks — a matter between high expectations and cautious reservation / E.R.J. Keller, A. Kaczmarczyk, A. Senula // Cryo Letters. — 2008. — Vol. 29 (1). — P. 53-62.
- 11 Lynch P.T. Climate change: the role of *ex situ* and cryoconservation in the future security of economically important, vegetatively propagated plants / P.T. Lynch, E.E. Benson, K. Harding // J. Horticultural Science & Biotechnology. — 2007. — Vol. 82 (2). — P. 157-160.
- 12 Мурсалиева В.К. Микроклональное размножение редких видов и коллекционных растений Мангышлакского экспериментального ботанического сада: Науч.-метод. реком. / В.К. Мурсалиева, С.В. Нам, Ж.С. Кожебаева, Т.М. Муханов, А.А. Иманбаева. — Алматы, 2020. — 17 с.

Д.Н. Жарасова, Н.А. Төлеп

Іле бөріқарақатының (*Berberis iliensis* M. Pop.) өсіндісін *in vitro* енгізудің ерекшеліктері

Мақалада сирек кездесетін эндемикалық өсімдік Іле бөріқарақатының (*Berberis iliensis* M. Pop.) өсіндісін *in vitro* енгізудің нәтижелері келтірілген. Қазіргі таңда сирек кездесетін өсімдік түрі жоғалып кету қаупінде тұр. Өсіндіні *in vitro* енгізу жолдары жасақталып, залалсыздандыратын агенттер және залалсыздандыру режимдері таңдалды (5%-дық «Белизна» ағартқыш ерітіндісі, өңдеу уақыты 5 мин, 10%-дық сутектің асқын тотығы ерітіндісі, экспозиция уақыты 7 мин). *Berberis iliensis* өсімдігінің өсіндісі *in vitro* оңтайлы дамуына рН мөлшері 5,6-5,8 болатын қоректік орта WPM таңдалды. Стандартты минералды қоректің ортаның құрамына дәрумендер қосылды. Экспланты бар мадженталар қа-

раңғы бөлмеде 22-25 °C температурада және 70% ылғалдылықта 3-4 апта аралығында жасанды өсірілді. Әрі қарай жасанды өсіру жарық мерзімі 16 сағат және жарық дәрежесі 4-5 мың люкс болатын 26 °C температурада жүргізілді. *Berberis iliensis*-тің асептикалық өскіндері алынды және олар регенеративті қабілетке ие. Өскін сабақтары шорланусыз түзілді, яғни тікелей регенерация бақыланды, ал бұл өз кезегінде микроклондық көбейтуге өте ыңғайлы.

Кілт сөздер: *Berberis iliensis*, тұқымдар, *in vitro* өскіні, экспланттарды залалсыздандыру, қоректік орта, WPM, жасанды жағдайда өсіру.

D.N. Zharasova, N.A. Tolep

Features of the introduction of *Berberis iliensis* M. Pop. into *in vitro* culture

The results of the introduction of *Berberis iliensis* M. Pop., a rare endemic plant, into *in vitro* culture are presented. The rare species is currently endangered. Methods of introduction into *in vitro* culture have been worked out, sterilizing agents and sterilization modes have been selected (5% bleach solution “Belizna”, treatment time 5 min, 10% hydrogen peroxide solution, exposure time 7 min). The WPM nutrient medium, with a pH level of 5.6–5.8, was selected as optimal for the successful development of *Berberis iliensis* plants in *in vitro* culture. Vitamins were added to the standard mineral composition of the medium. Magentas with explants were cultivated in a room without access to light at a temperature of 22–25°C and a humidity of 70% for 3–4 weeks. Further cultivation was carried out at 26°C, a light period of 16 h, and illumination of 4000–5000 lux. Aseptic cultures of *B. iliensis* were obtained and they had a regenerative capacity. Shoots were formed without callus, that is, direct regeneration is observed, which is the most favorable for micropropagation.

Keywords: *Berberis iliensis*, seeds, *in vitro* culture, sterilization of explants, nutrition medium, WPM, cultivation.

References

- 1 Suleimanova, Z.N. (2014). Osobennosti biologii tsikasa ponikaiushchego pri kultivirovanii v usloviakh oranzherii [Features of the Biology of Dipping Cycas in Greenhouse Cultivation]. *Nauchnye vedomosti. Seriya Estestvennye nauki — Scientific Statement. Natural Science Series*, 17 (188), 28, 56–59 [in Russian].
- 2 (1999). *Natsionalnaia strategii i Plan deistvii po sokhraneniui i sbalansirovannomu ispolzovaniui biologicheskogo raznoobrazii* [National strategy and plan of actions for storage and balanced use of biological diversity]. Almaty [in Russian].
- 3 (2006). *Ob utverzhdenii Perechnei redkikh i nakhodiashchikhsia pod ugrozoi ischeznoveniia vidov rastenii i zhivotnykh. Postanovlenie Pravitelstva Respubliki Kazakhstan ot 31 oktiabria 2006 goda N 1034* [On the approval of the Lists of Rare and Endangered Species of Plants and Animals. Decree of the Government of the Republic of Kazakhstan of October 31, 2006 No. 1034]. Retrieved from https://adilet.zan.kz/rus/docs/P060001034_/links [in Russian].
- 4 Asanova, G.K., Shaushekov, Z.K., Baitulin, I.O., & Adekenov, S.M. (2016). Vvedenie v kulturu *in vitro* barbarisa karkaralinskogo (*Berberis karkaralensis* Korn. et Potap.) [Introduction to culture of *in vitro* of *Berberis karkaralensis* Korn. Et Potap.]. *Izvestiia Natsionalnoi akademii nauk Respubliki Kazakhstan. Seriya biologicheskaiia i meditsinskaia — Proceeding of National Academy of Science of Republic of Kazakhstan. Biology and Medicine Series*, 315 (3); 15–20 [in Russian].
- 5 (1981). *Krasnaia kniga Kazakhskoi SSR* [The Red Book of Kazakh SSR]. Alma-Ata: Nauka [in Russian].
- 6 Kokoreva, I.I. (2007). *Rasteniia Dzhungarskogo i Zailiiskogo Alatau, nuzhdaiushchiesia v okhrane* [Plants of Dzungarsky and Zailiysky Alatau in need of protection]. Almaty [in Russian].
- 7 Ryabushkina, N., Gemedjieva, N., Kobaisy, M., & Cantrell, C.L. (2008). Brief review of Kazakhstan flora and use of its wild species. *The Asian and Australasian journal of plant science and biotechnology*, 2 (2); 64–71.
- 8 Karimov, A., & Shakirov, R. (1993). Investigation of the alkaloids of *Berberis iliensis*. *Chem. Nat. Comp.*, 29 (1); 69–70.
- 9 Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 47 (1); 5–16.
- 10 Keller, E.R.J., Kaczmarczyk, A., & Senula, A. (2008). Cryopreservation for plant genebanks — a matter between high expectations and cautious reservation. *Cryo Letters*, 29 (1); 53–62.
- 11 Lynch, P.T., Benson, E.E., & Harding, K. (2007). Climate change: the role of *ex situ* and cryoconservation in the future security of economically important, vegetatively propagated plants. *J. Horticultural Science & Biotechnology*, 82 (2); 157–160.
- 12 Mursalieva, V.K., Nam, S.V., Kozhebaeva, Zh.S., Mukhanov, T.M., & Imanbayeva, A.A. (2020). *Mikroklonalnoe razmnozhenie redkikh vidov i kollektсионnykh rastenii Mangyshlaksckogo eksperimentalnogo botanicheskogo sada. Nauchno-metodicheskie rekomendatsii* [Microclonal reproduction of rare species and collectible plants of the Mangyshlak Experimental Botanical Garden. Scientific and methodological recommendations]. Almaty [in Russian].