

N E W S

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 3, Number 315 (2016), 15 – 20

INTRODUCTION TO CULTURE OF IN VITRO OF BERBERIS KARKARALENSIS KORN. ET POTAP.

G. K. Asanova, Z. K. Shaushekov, I. O. Baitulin, S. M. Adekenov

JSC “International Research and Production Holding “Phytochemistry”, Karaganda, Kazakhstan.

E-mail: arglabin@phyto..kz

Keywords: Berberis karkaralensis Korn. et Potap., endangered and rare species, explant, callus formation.

Abstract. The article presents the results of experiments on the cultivation of rare and endangered species of plants in Central Kazakhstan of Berberis karkaralensis in the in vitro conditions. Sterilization conditions of explant young shoots of Berberis karkaralensis with various sterilizing agents are selected. Primary callus culture of Berberis karkaralensis on the modified Murashige and Skoog agar with a hormonal background is received: NAA 1 mg/l: BAP 1 mg/l NAA 2 mg/l: BAP 0.5 mg/l. Influence of various phytohormones, their combination and concentration on processes of growth and development of callus tissue is studied. The results of the dynamic of cell culture growth activity of Berberis karkaralensis in the presence of various concentrations of BAP and NAA are given.

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* БАРБАРИСА КАРКАРАЛИНСКОГО (*BERBERIS KARKARALENSIS* KORN. ET POTAP.)

Г. К. Асанова, З. К. Шаушеков, И. О. Байтулин, С. М. Адекенов

АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Караганда, Казахстан

Ключевые слова: барбарис каркаралинский, исчезающий и редкий вид, эксплант, каллусогенез.

Аннотация. Приведены данные экспериментов по культивированию редкого и исчезающего вида растений Центрального Казахстана барбариса каркаралинского (*Berberis karkaralensis* Korn. et Potap.) в условиях *in vitro*. Подобраны условия стерилизации эксплантов молодых побегов барбариса каркаралинского с применением различных стерилизующих агентов. Получена первичная каллусная культура барбариса каркаралинского на модифицированной среде Мурасиге и Скуга с гормональным фоном: НУК 1 мг/л : БАП 1 мг/л, НУК 2 мг/л : БАП 0,5 мг/л. Изучено влияние различных фитогормонов, их сочетаний и концентраций на процессы роста и развития каллусных тканей. Приведены результаты изучения динамики ростовой активности культуры клеток барбариса каркаралинского в присутствии различных концентраций БАП и НУК.

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 планетарном, так и на национальном уровнях. 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 [1, 2].

Вышеперечисленные программные документы предлагают в качестве мер по сохранению биоразнообразия, в частности разнообразия флоры, использование методов *ex situ* (создание ботанических садов, хранилищ зародышевой плазмы и др.) и *in situ* (образование на территории государств заповедников, заказников и других природоохранных зон). Но, наряду с традиционными способами сохранения растений *ex situ* и *in situ*, все большее значение приобретает использование для этих целей методов биотехнологии, в частности, методик культивирования изолированных тканей и органов.

Барбарис каркаралинский (*Berberis karkaralensis* Kornilova et Potapov) – очень редкий, узкоэндемичный вид, растет в Центральном Казахстане в Каркаралинских горах. Это реликт хвойно-лиственных лесов четвертичного периода. Произрастает в горно-сопочных борах, на щебенистых склонах, гранитах, на высоте 600–1000 м над уровнем моря под пологом редких сосен вместе с другими видами кустарников. Мезоксерофильный кустарник высотой до 0,7–2 м, ветви его покрыты серой корой, а годовые побеги – красновато-коричневые, блестящие. Соцветие – немногочетковая кисть с 5, 9 желтыми цветками. Чашелистики яйцевидные, лепестки обратнойцевидные, плоды продолговато-обратнойцевидные, ярко-красные, односемянные или частично без семян [3–5].

Подробное изучение онтогенеза и биологии этого вида в условиях Карагандинского ботанического сада проводилось в 1985–1990 годах Р. О. к.б.н., Мынбаевой под руководством профессора А. Н. Куприянова [6, 7].

Барбарис каркаралинский относится к растениям, которые нуждаются в сохранении и восстановлении популяции, так как вид находится на грани исчезновения. Его можно отнести к одной из наиболее уязвимых категорий редкости, принятой в Красных книгах Казахстана.

В связи с вышесказанным нами поставлена цель – оптимизация условий получения и культивирования каллусных культур редкого и эндемичного вида барбариса каркаралинского и включение его в коллекцию *in vitro*.

На этапах исследований решали следующие задачи

- определить оптимальные режимы стерилизации эксплантов;
- изучить степень каллусогенеза при использовании различных стимуляторов роста;
- изучить динамику роста каллусных тканей барбариса каркаралинского.

Материалы и методы исследований

В работе для получения первичных каллусных тканей использованы молодые однолетние побеги барбариса каркаралинского (*Berberis karkaralensis* Kornilova et Potapov). По литературным данным, в большинстве случаев, при использовании молодых побегов образования каллуса происходит быстрее и степень контаминаций ниже, чем на одревесневших побегах [8–10].

Подготовку эксплантов и введение их в культуру *in vitro* производили в стерильных условиях согласно общепринятым рекомендациям [11]. В качестве субстрата для эксплантов и культивирования каллусных тканей барбариса каркаралинского использовали питательную среду Мурасиге и Скуга [12]. Из фитогормонов использовали ауксин – нафтилуксусная кислота (НУК) и цитокинин – 6-бензиламинопуридин (БАП) в различных концентрациях.

В качестве стерилизующих агентов использовали спирт, раствор сулемы (0,1%) и гипохлорид кальция (40%).

Индукцию каллусогенеза оценивали в процентах как отношение числа эксплантов с каллусом к общему числу эксплантов. Скорость роста измеряли через каждые 3 суток и оценивали по истечении 30 суток субкультивирования по значению ростового индекса (РИ), вычисляемого по формуле:

$$РИ = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100\%,$$

где W_0 – начальная масса экспланта; W_1 – масса каллуса в конце цикла культивирования.

Влияние вариантов фитогормонов на прирост каллусных тканей проводили в 5-кратной повторности с вычислением ошибки средней арифметической. Все результаты исследований обрабатывались стандартными биометрическими методами [13].

Результаты и их обсуждение

В процессе введения в культуру необходимо было оптимизировать стерилизацию эксплантов изучаемого растения в зависимости от стерилизующих агентов и стимуляторов роста. Нами было исследовано действие различных дезинфицирующих агентов: гипохлорида натрия, сулемы и этанола.

В качестве эксплантов использовали сегменты листа и стеблей молодых побегов исследуемого растения. После стерилизации и пассажа в субстрат, через пять суток определяли степень зараженности эксплантов чужой микрофлорой (таблица 1).

Таблица 1 – Степень контаминации эксплантов барбариса каркаралинского

Стерилизующий агент	Концентрация, %	Экспозиция	Контаминация, %
Гипохлорид кальция	10	5 мин	11±3,9
Этанол	70	5 сек	
Сулема	0,1	3 мин	8,4±2,6
Этанол	70	5 сек	
Этанол	70	10 сек	68,5±3,4

При введении в культуру участков молодых побегов выявлено, что наиболее приемлемой оказалась двухступенчатая стерилизация: 1) $HgCl_2$ 0,1% в течение 3 мин; 2) этанол 70% в течение 5 секунд. При этом достигается наиболее высокий процент живых, незараженных эксплантов.

Каллусная ткань была получена в результате каллусогенеза из молодых побегов на среде, содержащей НУК и БАП. На начальных стадиях развития наблюдалось увеличение общего объема площади эксплантов. На сегментах эксплантов листовой пластины образования каллусов не наблюдалось. Формирование каллусов происходило на узловых сегментах и стебельках листа (рисунок 1, 2).



Рисунок 1 – Образование каллусов на узловых сегментах стебля барбариса каркаралинского



Рисунок 2 – Образование каллусов в стебельках листа барбариса каркаралинского

Каждую неделю в ходе культивирования проводили учет результатов экспериментов, отмечая появление на эксплантах недифференцированной ткани. В конце третьей недели культивирования на среде для инициации, отмечается развитие базального каллуса на эксплантах (таблица 2).

Таблица 2 – Степень каллусогенеза эксплантов барбариса каркаралинского

Фитогормоны	Каллусогенез, %
НУК 3 мг/л : БАП 1 мг/л	12,0±2,5
НУК 1 мг/л : БАП 1 мг/л	78,7±2,4
НУК 2 мг/л : БАП 0,5 мг/л	56±0,9
НУК 0,5 мг/л : БАП 0,5 мг/л	23,4±3,6
НУК 0,5 мг/л : БАП 2 мг/л	10,8±4,5

Первичный каллус, полученный из эксплантов, отличался нестабильностью окраски, консистенции и структурированности. В целом можно отметить, что преобладание в среде гормоном ауксиновой природы приводило к образованию оводненного каллуса, большей частью бесцветного или белого, или желтоватого. В нескольких случаях было зафиксировано образование каллуса бурой и буро-зеленой окраски. Где преобладает БАП каллусы более плотные и плохо растут.

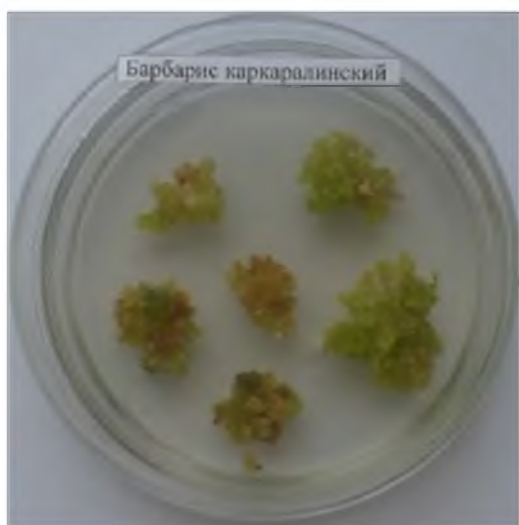


Рисунок 3 – Каллусные ткани барбариса каркаралинского (*Berberis karkaralensis* Kom.et Potap.)

Семена оказались непригодными для каллусообразования, поскольку они не проросли ни на одной из использованных сред.

Каллусы, полученные на среде МС с фитогормонами НУК 1 мг/л : БАП 1 мг/л и НУК 2 мг/л : БАП 0,5 мг/л, имеют наилучшие морфологические характеристики: однородную консистенцию, светло-зеленый, местами бурый и темно-бордовый цвет, средне глобулярные (рисунок 3).

Таким образом, получена первичная каллусная культура редкого и эндемичного вида барбариса каркаралинского на среде Мурасиге и Скуга с гормональным фоном БАП – 1 мг/л, НУК – 1 мг/л и БАП – 0,5 мг/л, НУК – 2 мг/л.

Изучена динамика ростовой активности культуры клеток барбариса каркаралинского в присутствии различных концентраций БАП и НУК. Полученные результаты представлены на рисунке 4.

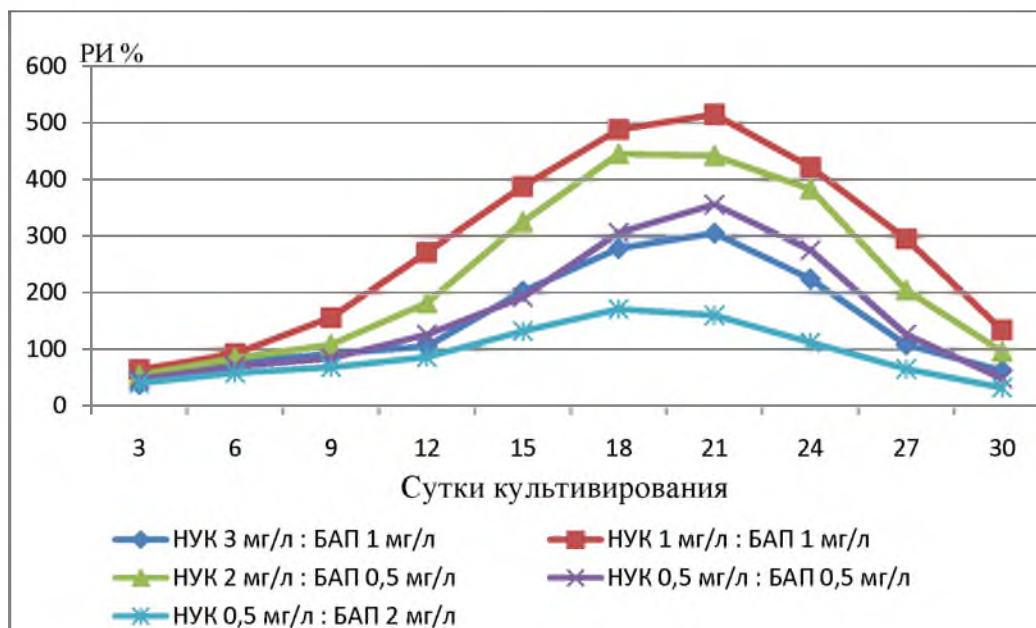


Рисунок 4 – Динамика ростовой активности каллусной ткани барбариса каркаралинского в присутствии различных концентраций фитогормонов

Из пяти вариантов сочетания фитогормонов оптимальными для роста каллусных тканей барбариса каркаралинского являлись НУК 1 мг/л : БАП 1 мг/л, т.к. при этом ростовая активность культуры составляло 515 %. Своего максимума значения ростового индекса достигает на 21 сутки культивирования. На НУК 2 мг/л : БАП 0,5 мг/л тоже каллусы растут не плохо, здесь пик ростового индекса показан на 17, 18 сутки. Кривые роста культуры клеток барбариса каркаралинского в присутствии больших концентраций БАП отражают почти линейный прирост биомассы, в котором сложно выделить какие-либо фазы, кроме фазы некроза культуры.

Таким образом, в результате проведенного исследования определено, что оптимальным для роста каллусной ткани барбариса каркаралинского является содержание в питательной среде 1 мг/л БАП и 1 мг/л НУК, при этом пик ростовой активности происходит на 21 сутки культивирования.

Выводы. На основании вышеприведенных экспериментов определено, что наилучшим условием для стерилизации эксплантов молодых побегов барбариса каркаралинского является двухступенчатая стерилизация: 1) HgCl_2 0,1% в течение 3 мин; 2) этанол 70% в течение 5 секунд.

Получена первичная каллусная культура редкого и эндемичного вида барбариса каркаралинского на среде Мурасиге и Скуга с гормональным фоном НУК – 1 мг/л : БАП – 1 мг/л и НУК – 2 мг/л : БАП – 0,5 мг/л.

Определено, что оптимальной концентрацией для роста каллусных тканей барбариса каркаралинского является НУК 1 мг/л : БАП 1 мг/л, т.к. при этом ростовая активность культуры составляет 515 %, своего максимума значения ростового индекса достигает на 21 сутки культивирования.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Национальная Стратегия и План действий по сохранению и сбалансированному использованию биологического разнообразия. – Алматы, 1999. – 336 с.

[2] Об утверждении Перечней редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений и животных // Постановление Правительства Республики Казахстан от 31 октября 2006 года № 1034.

[3] Корнилова В.С. *Berberis karkaralensis* Korn. et Potap. sp.nova // Флора Казахстана, Алма-Ата: Наука, 1961. – Т. 4. – С. 522-523.

[4] Красная книга Казахской ССР. – Ч. 2: Растения. – Алма-Ата, 1981. – 284 с.

[5] Dzhangaliev A.D. Salova T.N., Turekhanova P.M. The Wild Fruit and Nut Plants of Kazakhstan // Horticultural Reviews. – 2003. – Vol. 29. – P. 305-371.

[6] Мынбаева Р.О. Сохранение редких и эндемичных растений Казахстана в культуре // Тезисы докл. регион. конф. «Научно-технические проблемы промышленной ботаники в Казахстане». – Караганда, 1991. – 34 с.

- [7] Мынбаева Р.О., Куприянов А.Н., Адекенов С.М. Биоморфологические особенности *Berberis karkaralensis* Kornilova et Potapov в культуре // Рукопись депонир. В КазГосИНТИ. 08.02.96 г. № 6718-Ка-1996. – 12 с.
- [8] Samyn G., De Schepper S., Van Bockstaele E. Adventitious shoot regeneration and appearance of sports in several *azalea* cultivars // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2002. – Vol. 70. – P. 223-227.
- [9] Якимова О.В., Егорова Н.А. Индукция каллусогенеза в культуре изолированных органов *Origanum vulgare* L. // Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2014. – Вып. 2. – С. 81-86.
- [10] Быструшкин А.Г. Размножение *in vitro* редких и находящихся на грани исчезновения эндемичных Уральских видов рода *Eritrichium*. – М.: Биотехнология. – 2008. – Вып. 11. – С. 34-36.
- [11] Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 158 с.
- [12] Murashige I. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiology Plant.* –1962. – N 6. – P. 473-497.
- [13] Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Наука, 1990. – 352 с.

REFERENCES

- [1] Nacional'naja Strategija i Plan dejstvij po sohraneniu i sbalansirovannomu ispol'zovaniju biologicheskogo raznoobrazija. Almaty, 1999. 336 s. (in Russ.).
- [2] Ob utverzhenii Perechnej redkih i nahodjashhihsja pod ugrozoi ischeznovenija vidov rastenij i zhivotnyh. Postanovlenie Pravitel'stva Respubliki Kazahstan ot 31 oktjabrja 2006 goda #1034 (in Russ.).
- [3] Kornilova V.S. *Berberis karkaralensis* Korn. et Potap. sp.nova // *Flora Kazahstana*. Alma-Ata: Nauka, 1961. Vol. 4. P. 522-523 (in Russ.).
- [4] Krasnaja kniga Kazahskoj SSR. Ch. 2: Rastenija. Alma-Ata, 1981. 284 s. (in Russ.).
- [5] Dzhangaliev A.D. Salova T.N., Turekhanova P.M. The Wild Fruit and Nut Plants of Kazakhstan. *Horticultural Reviews*. 2003. Vol. 29. P. 305-371.
- [6] Мынбаева Р.О. Сохранение редких и эндемичных растений Казахстана в культуре. Тезисы докл. регион. конф. «Научно-технические проблемы промышленной ботаники в Казахстане». Караганда, 1991. 34 с. (in Russ.).
- [7] Мынбаева Р.О., Куприянов А.Н., Адекенов С.М. Биоморфологические особенности *Berberis karkaralensis* Kornilova et Potapov в культуре. Рукопись депонир. В КазГосИНТИ. 08.02.96 г. № 6718-Ка-1996. 12 с. (in Russ.).
- [8] Samyn G., De Schepper S., Van Bockstaele E. Adventitious shoot regeneration and appearance of sports in several *azalea* cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2002. Vol. 70. P. 223-227.
- [9] Jakimova O.V., Egorova N.A. Indukcija kallusogeneza v kul'ture izolirovannyh organov *Origanum vulgare* L. *Nauchno-tehnicheskij bjulleten' Vserossijskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta maslichnyh kul'tur.* 2014. Vyp. 2. P. 81-86 (in Russ.).
- [10] Bystrushkin A.G. Razmnozhenie *in vitro* redkih i nahodjashhihsja na grani ischeznovenija jendemichnyh Ural'skih vidov roda *Eritrichium*. Moskva, Biotehnologija. 2008. Vyp. 11. S. 34-36 (in Russ.).
- [11] Butenko, R.G. *Biologija kletok vysshih rastenij in vitro i biotehnologii na ih osnove*. M.: FBK-PRESS, 1999. 158 s. (in Russ.).
- [12] Murashige I. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant.* 1962. N 6. R. 473-497.
- [13] Lakin G.F. *Biometrija*. M.: Nauka, 1990. 352 s. (in Russ.).

ҚАРҚАРАЛЫ БӨРІҚАРАҚАТЫ ӨСІМДІГІН (*BERBERIS KARKARALENSIS* KORN. ET POTAP.) IN VITRO ДАҚЫЛГА ЕНГІЗУ

Г. Қ. Асанова, З. Қ. Шәушеков, И. О. Байтулин, С. М. Әдекенов

«Фитохимия» Халықаралық ғылыми-өндірістік холдингі» АҚ, Қарағанды, Қазақстан

Түйін сөздер: қарқаралы бөріқарақаты, жойылып бара жатқан және сирек кездесетін түр, эксплант, каллус түзу.

Аннотация. Мақалада Орталық Қазақстанның сирек кездесетін және жойылып бара жатқан өсімдік түрі қарқаралы бөріқарақатын (*Berberis karkaralensis* Korn. et Potap.) *in vitro* жағдайында өсіру бойынша эксперименттердің мәліметтері берілген. Қарқаралы бөріқарақатының жас өркендерінің экспланттарын әртүрлі зарарсыздандыргыш агенттерді қолдана отырып зарарсыздандыру жағдайлары таңдап алынды. Модифицирленген Мурасиге және Скуг қоректік ортасында НСҚ 1 мг/л : БАП 1 мг/л, НСҚ 2 мг/л : БАП 0,5 мг/л фитогормондарын қолдана отырып біріншілік каллустық ұлпалары алынды.

Әртүрлі фитогормондардың және олардың үйлесімдері мен концентрацияларының каллустық ұлпалардың өсуі мен дамуына әсері зерттелді. Қарқаралы бөріқарақатының жасуша дақылдарының БАП пен ИСҚ-ның әртүрлі концентрацияларының қатысуымен өсу динамикасын зерттеу нәтижелері келтірілген.

Поступила 04.05.2016 г.