

OPTIMIZATION OF BARBERRY MICROPROPAGATION

Romadanova N.V., Machmutova I.A., Karasholakova L.N., Christenko A.A.,
Kushnarenko S.V.

*Institute of Plant Biology and Biotechnology
Almaty, 050040, Kazakhstan
nata_romadanova@mail.ru*

ABSTRACT

The creation of an *in vitro* collection of aseptic plants is the first stage for preservation of genetic diversity of barberry in a cryobank and production of mother plantations in natural habitats. Seedlings and plantlets of barberry were obtained from seeds and cuttings, respectively, using biotechnological methods to produce aseptic plants. Scarification and stratification is required for seeds of some species that are difficult to germinate in wet perlite. Treatment of explants with 0.1% HgCl₂ for 8 min is optimal for *in vitro* culture and produces 46.4% regeneration. *In vitro* plants were tested for the presence of infection in a specialized 523 medium to detect bacteria and fungi. On average, 44.5% of the *in vitro* shoots in all the tested accessions were affected by endophytic infection. The composition of the nutrient medium was optimized as Murashige-Skoog medium with 166 mg/l CaCl₂, 3.7 g/l MgSO₄·7H₂O, 30 g/l sucrose, 0.8 mg/l 6-benzylaminopurine, 0.02 mg/l indolebutyric acid, 0.1 mg/l gibberellic acid, 2 mg/l calcium pantothenate, 1 mg/l ascorbic acid, 1.75 g/l gelrite, 4 g/l agar, pH 5.7. A maximum multiplication factor of 4.3 and high quality of regenerated plants were obtained using the optimized medium. A biotechnological regulation was developed to obtain an *in vitro* collection of barberry plants and a collection consisting of 51 accessions was created. This collection will serve as the basis for the creation of cryobank of Kazakhstan barberry germplasm and for international exchange of plant resources.

Key words: barberry, seeds, shoots, micropropagation, *in vitro* collection

УДК 634.1/.7;602.6:59;602.6:612

ОПТИМИЗАЦИЯ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ БАРБАРИСА

Ромаданова Н.В., Махмутова И.А., Карашолакова Л.Н., Христенко А.А.,
Кушнаренко С.В.

*Институт биологии и биотехнологии растений
Алматы, 050040, Казахстан
nata_romadanova@mail.ru*

АБСТРАКТ

Для сохранения генетического разнообразия барбариса в криобанке и создания маточников в естественных местах обитания на первом этапе требуется получить коллекцию асептических растений *in vitro*. Для выполнения поставленной задачи биотехнологическими методами получены проростки барбариса из семян и черенков. Для трудно прорастающих во влажном перлите семян некоторых видов требуется дополнительно провести скарификацию и стратификацию. Для введения в культуру *in vitro* оптимальна обработка эксплантов в 0,1% растворе HgCl₂ в течение 8 мин, регенерация при которой составляет – 46,4%. Растения в культуре *in vitro* протестированы на наличие инфицированности на специализированной среде 523 для детекции бактерий и грибов. Проверка показала, что в среднем 44,5% побегов, введенных в культуру *in vitro* у всех исследуемых образцов, были поражены эндофитной инфекцией. Оптимизирован состав питательной среды: Мурасиге-Скуга с добавлением 166 мг/л CaCl₂, 3,7 г/л MgSO₄·7H₂O, 30 г/л сахаразы, 0,8 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,02 мг/л индолил масляной кислоты, 0,1 мг/л гибберелловой кислоты, 2 мг/л пантотената кальция, 1 мг/л аскорбиновой кислоты, 1,75 г/л

джелрайта, 4 г/л агара, рН 5,7, при котором получен максимальный коэффициент размножения – 4,3 и высокое качество регенерировавших растений. Разработан биотехнологический регламент получения коллекции растений барбариса *in vitro*, создана коллекция растений, состоящая из 51 образца. Полученная коллекция послужит основой для создания криобанка гермоплазмы барбариса Казахстана и для международного обмена растительными ресурсами.

Ключевые слова: барбарис, семена, побеги, микрклональное размножение, коллекция *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ

В Казахстане произрастает 8 видов барбариса, 2 из которых: барбарис илийский (*Berberis iliensis* M. Pop.) и барбарис каркаралинский (*Berberis karkaralensis* Kornilova & Potarov) занесены в Красную книгу Казахстана [1-4]. Проблема утраты биоразнообразия, сокращение тугайных лесов, вследствие изменения условий их произрастания, стала важной проблемой нарушения экологии. На данный момент уже более 90% тугайных лесов утеряно, оставшиеся площади находятся в неудовлетворительном состоянии. Принимаются различные программы по сохранению и восстановлению тугайных лесов вдоль рек Сырдарья, Или, Таласа и других, а также гор Каратау [5]. С местным населением ведутся беседы для повышения осведомленности, на данных участках запрещена хозяйственная деятельность, однако общая численность лесов постоянно сокращается.

Барбарис в Казахстане встречается в Зайсане, Алтае и Тарбагатае, Джунгарском, Заилийском и Кунгей Алатау, Чу-Илийских горах. Это в основном кустарники, плоды, листья, кора, древесина и корни которых обладают различными полезными свойствами. Человек с незапамятных времен использует барбарис в лечебных целях, в питании, как краситель, дубильное вещество и т.д. [6-8].

Барбарис – экономически ценное растение, и поэтому важно сохранить его уникальные виды, находящиеся под угрозой исчезновения. В нашей стране, кроме естественных мест произрастания, некоторые виды барбариса содержатся лишь в ботанических садах и в частных коллекциях, что недостаточно обеспечивает надежное сохранение гермоплазмы. Недостатки традиционных приемов сохранения генетических ресурсов обусловили необходимость разработки биотехнологических методов сохранения генофонда барбариса. Анализ имеющихся литературных данных позволяет сделать заключение, что решение проблемы сохранения коллекций на современном этапе необходимо проводить с учетом применения всех наиболее прогрессивных технологий, в том числе и длительное сохранение генетического материала в криобанках [9-11].

Для создания криобанка апикальных меристем барбариса требуется достаточное количество растений *in vitro*. Поэтому на первоначальном этапе необходимо ввести растительный материал в культуру *in vitro* и размножить асептические растения [12-13]. Ранее нами был опубликован материал о результатах введения некоторых дикорастущих видов барбариса в культуру *in vitro* [14, 15]. Целью настоящей работы являлась разработка биотехнологии микрклонального размножения для массового получения растительного материала и создание коллекции асептических растений барбариса.

Образцы гермоплазмы барбариса, сохраненные в коллекции *in vitro*, послужат для проведения широкого спектра биологических исследований. Среди них, прежде всего, разработка надежной методологии сохранения генетических ресурсов в криобанках, особенно редких и исчезающих видов, с возможной последующей их реинтродукцией в естественные места обитания [16-17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

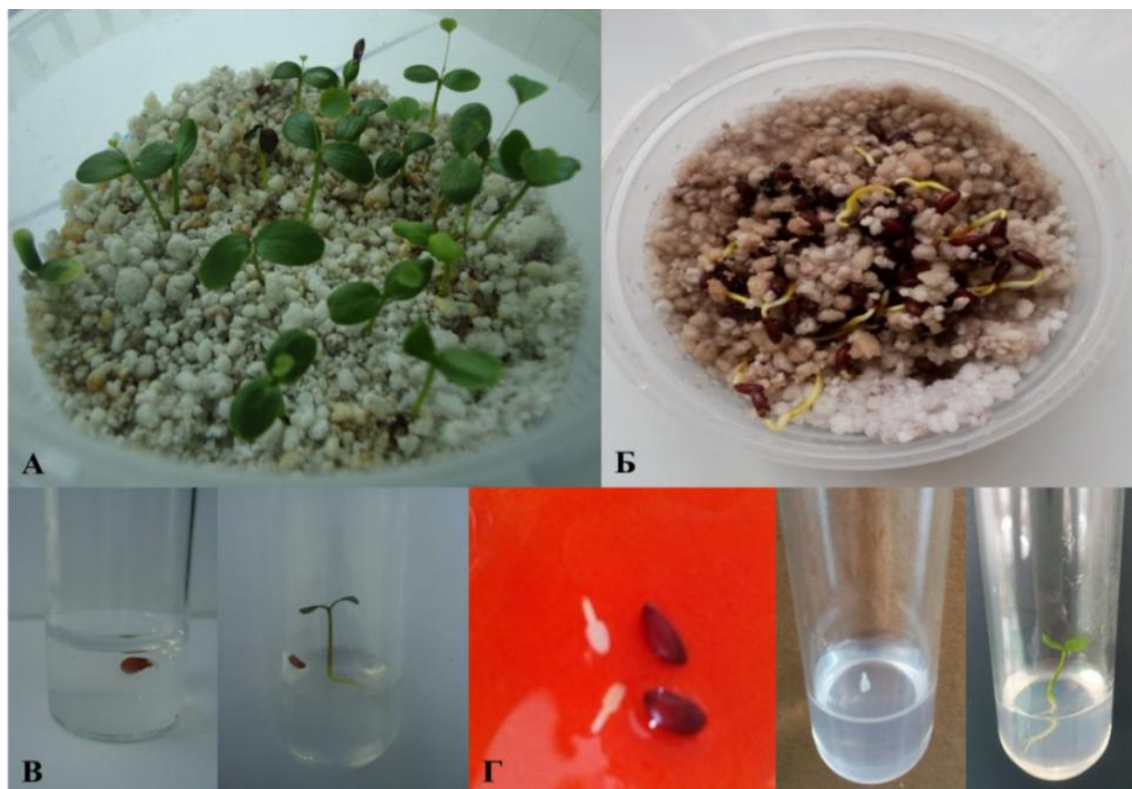
Объектами исследования являлись 73 образца черенков и плодов барбариса, собранных в разные периоды вегетации в ущелье Каскасу Сайрам-Угамского Национального парка, в пойме реки Большая Алматинка в ущелье Алмарасан Иле-Алатауского Национального парка, в ущелье Иссык Заилийского Алатау, в пойме реки Или в ущелье Кербулак, из коллекций в АО «Лесной питомник», Алтайского ботанического сада, и из Карагандинского Национального Университета: 1 форма барбариса амурского (*Berberis amurensis* Rupr.), 13 форм барбариса илийского (*Berberis iliensis* M. Pop.), 1 форма барбариса корейского (*Berberis koreana* Palib.), 21 форма барбариса круплоплодного (*Berberis sphaerocarpa* Kar, et Kir), 1 форма барбариса монетовидного (*Berberis nummularia* Vge.), 1 форма барбариса обыкновенного (*Berberis vulgaris* L.), 2 формы барбариса продолговатого (*Berberis oblonga* (Regel) C.K.Schneid.), 1 форма барбариса сибирского (*Berberis sibirica* Pall.), 1 форма барбариса Тунберга (*Berberis thunbergii* DC.), 27 форм барбариса цельнокрайнего (*Berberis integerrima* Bunge), 2 гибрида барбариса оттавского (*Berberis* x

ottawiensis Schneid), 2 сорта: барбарис оттавский “Суперба” (*Berberis x ottawensis* “Superba”) и барбарис Тунберга “Келлера” (*Berberis thunbergii* “Kelleriis”).

Черенки со спящими почками и плоды барбариса для транспортировки помещались в чистые полиэтиленовые пакеты. Сбор черенков проводили в феврале-марте, плодов – в августе-сентябре.

Получение проростков барбариса из семян

Для проращивания побегов использовали семена, которые очищали от мякоти плодов, обрабатывали раствором отбеливателя «Белизна», разбавленного 1:1 в течение 5 минут: а) проращивали в перлите при 25°C, освещенности 40 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 16-часовом фотопериоде (рисунок 1А); б) стратифицировали во влажном перлите при 4°C в течение 8 недель при освещенности 10 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 16-часовом фотопериоде (рисунок 1Б); в) проращивали семена в условиях *invitro* на среде Кнопа следующего состава: 1 г/л $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,25 г/л $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 г/л KH_2PO_4 , 0,125 г/л KCl , 27,8 мг/л $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 37,3 мг/л $\text{Na}_2\text{ЭДТА}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,75 г/л джелрата, 4 г/л агара, pH 5,7 (рисунок 1В)[18]; г) получали проростки из зародышей: семена на 16 часов помещали на мокрую вату, удаляли разбухшую семенную кожуру. Далее в стерильных условиях ламинар-бокса обрабатывали раствором «Белизны», разбавленного 1:1 в течение 10 мин, изолировали зародыш, который переносили на питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) с 30 г/л сахарозы, 1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 0,1 мг/л гибберелловой кислоты ГК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7 (рисунок 1Г)[19].



А – проростки из семян *Berberis integerrima* во влажном перлите; Б – пророщенные семена *Berberis sphaerocarpa* формы 2 после стратификации во влажном перлите при +4°C, освещенности 10 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 16-часовом фотопериоде в течение 8 недель; В – проращивание побегов *Berberis sphaerocarpa* форма 12 в условиях *invitro* из семян на питательной среде Кнопа; Г – получение побегов из зародышей *Berberis vulgaris*

Рис. 1. Получение проростков барбариса

A – seedlings of *Berberis integerrima* seeds in wet perlite; Б – germinated seeds *Berberis sphaerocarpa* Form 2 after stratification in wet perlite at +4°C, light 10 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 16-hour photoperiod for 8 weeks; В – germination of *Berberis sphaerocarpa in vitro* shoots Form 12 from seeds on Knop nutrient medium; Г – obtaining seeds from *Berberis vulgaris* embryos

Fig. 1. Obtaining barberry seedlings

Получение проростков барбариса из черенков

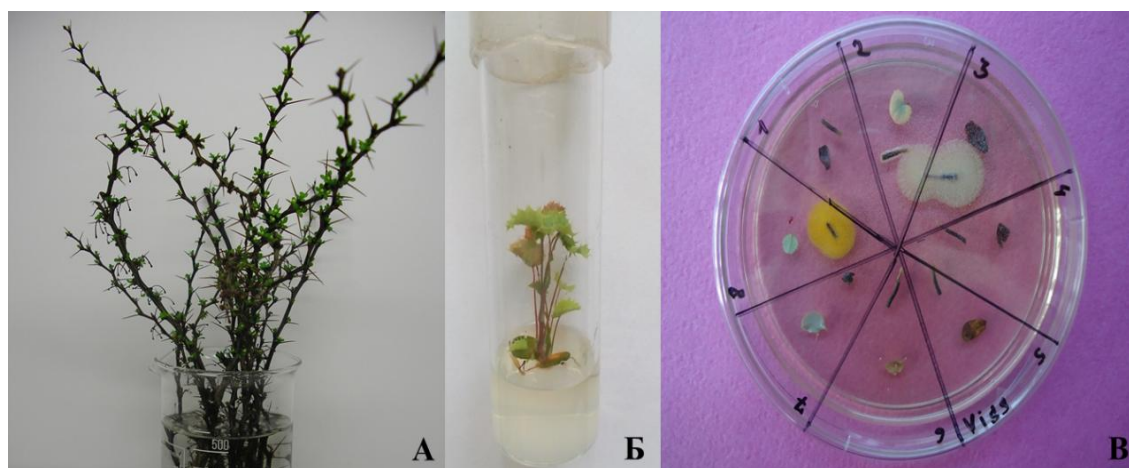
Черенки длиной 20-30 см срезали у однолетних побегов, промывали в мыльном растворе и проточной воде, затем в течение 5 мин обрабатывали разбавленным раствором отбеливателя «Белизна» (1:1) и промывали в проточной воде. Для стимуляции побегообразования из покоящихся почек черенки помещали в сосуды с водой (рисунок 2А). Через 2-4 недели получали проростки длиной 1-1,5 см, которые использовали для введения в культуру *in vitro*.

Введение в культуру *in vitro* побегов, полученных из семян и черенков

Нестерильные побеги, полученные проращиванием семян и черенков длиной 1-1,5 см, срезали и в ламинарном боксе стерилизовали в 0,1% растворе сулемы (HgCl_2) в течение 8 мин. Верхушки побегов после стерилизации помещали в пробирки со средой МС, содержащей 30 г/л сахарозы с добавлением регуляторов роста: 0,5 мг/л БАП, 0,01 мг/л идолилмасляной кислоты (ИМК), 1,75 г/л джелрата, 4 г/л агара, pH 5,7 (рисунок 2Б).

Проверка растений на эндофитную микрофлору

Введённые в культуру *in vitro* экспланты были протестированы на отсутствие эндофитной инфекции на специализированной среде для роста бактерий и грибов 523, в состав которой входили: 10 г/л сахарозы, 8 г/л гидролизата казеина, 4 г/л дрожжевого экстракта, 2 г/л KH_2PO_4 , 0,15 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6 г/л джелрайта, pH 6,9 [20]. Во время пересадки растений на свежую питательную среду срезали основания микропобега и помещали в чашки Петри на среду 523, культивировали при температуре 25°C в течение 1-2 недель. Среда со стерильными эксплантами остается прозрачной, тогда как помутнение среды или рост колоний указывает на инфицированность микропобегов, которые следует сразу же отбраковывать (рисунок 2В).



А – проращивание черенков *Berberis thunbergii* в воде; Б – побег *Berberis oblonga* на питательной среде МС; В – проверка растений на наличие инфицированности на среде 523

Рис. 2. Введение барбариса в культуру *in vitro*

А – germination of *Berberis thunbergii* cuttings in the water; Б – *Berberis oblonga* shoot on MS nutrient medium; В – testing of plants for the presence of infection on 523 medium

Fig. 2. Introduction of barberry into *in vitro* culture

Микрочлассальное размножение барбариса *in vitro*

Были испытаны 26 вариантов питательных сред на основе среды МС, только во 2 варианте использовали ½ концентрацию солей МС, в 3 варианте ¼ [19]. Неизменными в питательной среде являлись: 30 г/л сахарозы, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7. Остальные компоненты представлены в таблице 1.

Пробирочные растения выращивали в светокультуральной комнате при температуре 23-25°C, освещенности $40 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 16-часовом фотопериоде пассировали на свежую питательную среду с интервалом 3-4 недели.

Коэффициент размножения (Кр) микрочеренков барбариса рассчитывался по формуле: $R = a/vc$, где «а» – количество образовавшихся побегов, «v» – количество высаженных побегов; «с» – количество пассажей.

В экспериментах использовали 5 побегов, в опыте проводили 3 повторности (n=15). Кр вычисляли через 3 пассажа. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по общепринятым методикам, описанным в пособии Г.Ф. Лакина и в программном пакете SYSTAT [21-22].

Таблица 1. Состав питательной среды для размножения барбариса в культуре *in vitro*

Table 1. Nutrient medium composition for barberry micropropagation

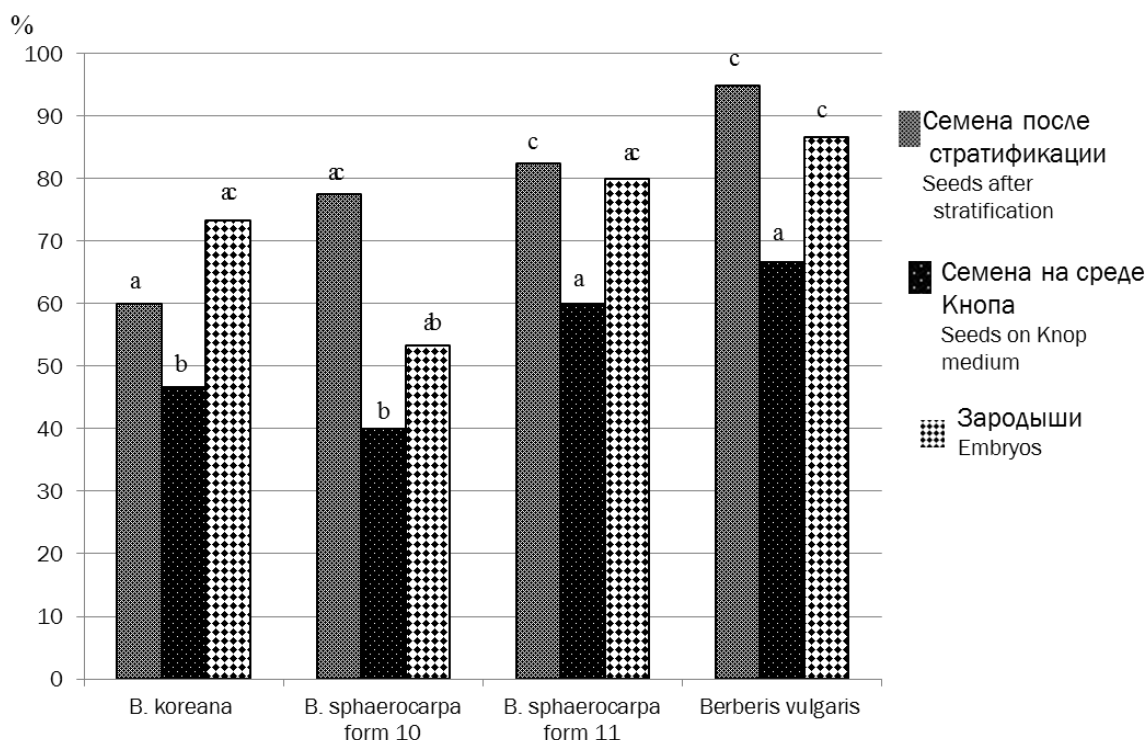
Вариант питательной среды Variants of nutrient medium	Компоненты питательной среды, мг/л Components of nutrient medium, mg/L									
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	KH ₂ PO ₄	FeSO ₄ ·7H ₂ O	Na ₂ ЭДТА·2H ₂ O	CaCl ₂	6-бензиламинопури 6-benzylaminopuri	Индолилмасляная кислота Indole butyric acid	Гибберелловая кислота Gibberellic acid	Аскорбиновая кислота Ascorbic acid	Пантотенат кальция Calcium pantothenate
	1	-	-	-	-	-	0,5	0,01	-	-
2	-	-	-	-	-	0,5	0,01	-	-	-
3	-	-	-	-	-	0,5	0,01	-	-	-
4	-	-	-	-	-	0,5	0,01	1,0	-	-
5	-	-	-	-	-	0,5	0,01	2,0	-	-
6	-	-	-	-	-	0,5	0,02	0,1	-	-
7	-	-	-	-	-	0,5	0,02	2,0	-	-
8	-	-	-	-	-	0,5	0,01	3,0	-	-
9	-	-	-	-	-	0,5	0,05	1,0	-	-
10	-	-	-	-	-	0,5	0,05	2,0	-	-
11	-	-	-	-	-	0,5	0,05	3,0	-	-
12	-	-	-	-	-	0,8	0,02	2,0	-	-
13	-	-	-	-	-	1,0	0,02	2,0	-	-
14	-	-	-	-	-	0,8	0,02	0,1	1,0	-
15	-	-	-	-	-	0,8	0,02	0,1	1,0	2,0
16	-	-	27,8	37,3	-	0,8	0,02	0,1	1,0	2,0
17	-	-	27,8	37,3	332,0	0,8	0,02	0,1	1,0	2,0
18	-	-	-	-	332,0	0,8	0,02	0,1	1,0	2,0
19	-	-	-	-	166,0	0,8	0,02	0,1	1,0	2,0
20	-	-	13,9	18,7	166,0	0,8	0,02	0,1	1,0	2,0
21	-	-	7,0	9,3	166,0	0,8	0,02	0,1	1,0	2,0
22	370	-	-	-	166,0	0,8	0,02	0,1	1,0	2,0
23	370	170	-	-	166,0	0,8	0,02	0,1	1,0	2,0
24	370	170	7,0	9,3	166,0	0,8	0,02	0,1	1,0	2,0
25	185	85	7,0	9,3	166,0	0,8	0,02	0,1	1,0	2,0
26	185	85	-	-	166,0	0,8	0,02	0,1	1,0	2,0

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения проростков семена погружали во влажный перлит и проращивали в светокультуральной комнате в течение 1-4 недель. Лабораторная всхожесть образцов в среднем составила 66,6%. Однако выявлено, что семена *Berberiskoreana*, *Berberisphaerocarpi* и *Berberis vulgaris* практически не прорастают в вышеуказанных условиях (8,2%). Следует отметить, что покровы семян барбариса состоят из трудно проницаемых для воды клеток. Главная причина задержки прорастания семян и сводится к тому, что вода не находит доступа к зародышу семени. В природе прорастание происходит под действием почвенных микроорганизмов, которые разрушают покровы. Поэтому для образцов,

которые плохо прорастали, была проведена скарификация – нарушение целостности оболочки семян с помощью надрезов, что повысило лабораторную всхожесть до 26,7%.

Также для того, чтобы приблизить условия прорастания семян к природным, а именно к смене времен года, было принято решение провести для этих образцов стратификацию. Кроме того, для этих образцов провели проращивание семян в культуре *in vitro* на питательной среде Кнопа и проращивание в культуре *in vitro* зародышей. В результате лабораторная всхожесть плохо прораставших образцов барбариса после стратификации при температуре 4°C в течение 8 недель во влажном перлите увеличилась в среднем до 78,8%. На среде Кнопа было отмечено в среднем 53,4% прорастания, у зародышей отмечали в среднем 73,3% образования побегов (рисунок 3).



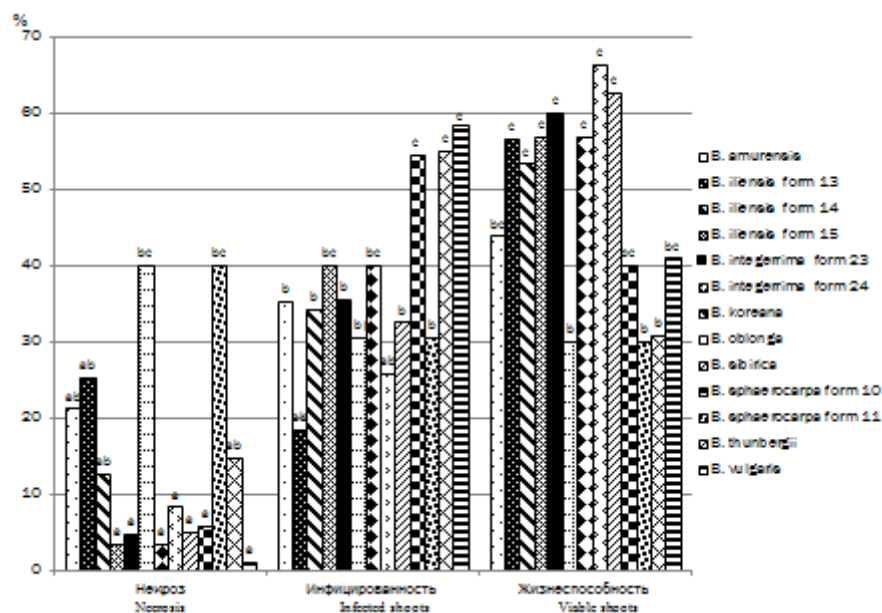
a, b, c – значения, которые различаются достоверно между собой при $p < 0,05$

Рис. 3. Результаты прорастания семян и зародышей барбариса

a, b, c – values that differ significantly between themselves at $p < 0,05$

Fig. 3. Results of germination of barberry seeds and embryos

Полученные нестерильные побеги из семян и черенков вводили в культуру *in vitro*. В среднем по образцам наиболее оптимальной является обработка эксплантов в 0,1% растворе $HgCl_2$ в течение 8 мин. При данной длительности стерилизации отмечен наименьший процент некроза побегов – 16,6% и инфицированности – 37,0%, процент регенерации составил – 46,4% (рисунок 4 и 5)[15]. При обработке в $HgCl_2$ длительностью 3 мин отмечен высокий процент инфицированности – 78,9%, 10-минутная обработка дает высокий процент некроза – 59,4%.

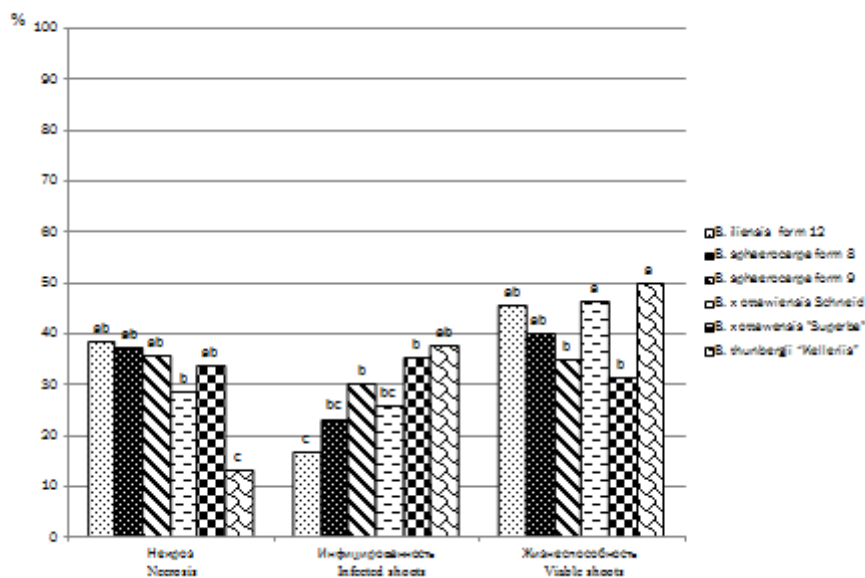


a, b, c – значения, которые различаются достоверно между собой при $p < 0,05$

Рис. 4. Результаты введения в культуру *in vitro* побегов барбариса, полученных из семян, длительность обработки в $HgCl_2$ – 8 мин

a, b, c – values that differ significantly between themselves at $p < 0,05$

Fig. 4. Results of introduction of barberry shoots from seeds into *in vitro* culture, treatment time in $HgCl_2$ – 8 min



a, b – значения, которые различаются достоверно между собой при $p < 0,01$

Рис. 5. Результаты введения в культуру *in vitro* побегов барбариса, полученных из черенков, длительность обработки в $HgCl_2$ – 8 мин

a, b – values that differ significantly between themselves at $p < 0,01$

Fig. 5. Results of introduction of barberry shoots from cuttings into *in vitro* culture, treatment time in $HgCl_2$ – 8 min

Следующим наиболее важным этапом для успешного микроклонального размножения побегов *in vitro* служил контроль чистоты пробирочных растений на специализированной среде 523 для детекции бактерий и грибов. Проверка показала, что в среднем 44,5% побегов, введенных в культуру *in vitro*, у всех исследуемых образцов были поражены эндофитной инфекцией. При этом у барбариса круглоплодного – 54,7% побегов были поражены бактериальной инфекцией, у барбариса сибирского – 62,4%, когда как у барбариса илийского – 22,3%, у барбариса цельнокрайнего – 19,2%. Побег, полученный из семян барбариса илийского формы 11, собранных в пойме реки Или в ущелье Кербулак, наличие инфекции не подтвердили, тогда как побег, полученный из семян барбариса илийского формы 9, привезенные из АО «Лесной питомник», показали 38,8% заражения бактериальной инфекцией. В результате этих исследований можно сделать вывод, что наибольший процент инфицированности был обнаружен у побегов, полученных из семян, произрастающих на освоенных человеком территориях, и, например, о полном отсутствии или небольшой инфицированности растений, произрастающих в трудно доступных местах. В дальнейшем для создания маточника, не пораженного бактериальной и грибной инфекцией, желательно подбирать места, удаленные от проживания и мест посещения человека.

Большое значение при введении в культуру *in vitro* и микроклональном размножении растений имеет состав питательной среды. Основным требованием к питательной среде является обеспечение высокого коэффициента размножения, т.е. максимальной регенерации растений из микрочеренков в минимальные сроки [12-13, 23-25]. В основном большое значение имеет соотношение фитогормонов и минеральных веществ в питательной среде. Были протестированы 26 вариантов состава питательных сред для барбариса илийского и барбариса цельнокрайнего, коэффициент размножения на этих вариантах питательных сред представлен в таблице 2.

Таблица 2. Влияние состава питательной среды на коэффициент размножения барбариса в культуре *in vitro*

Table 2. Influence of nutrient medium composition on *in vitro* barberry multiplication factor

Вариант питательной среды Nutrient medium variants	Кол-во культивированных эксплантов, шт. Number of cultivated explants, pcs.	Кол-во регенерировавшихся побегов через 3 пассажа, шт. Number of regenerated shoots through 3 passages, pcs.	Среднее значение Коэффициент размножения, $P=a/bc$ Mean Multiplication factor, $P=a/bc$	Кол-во культивированных эксплантов, шт. Number of cultivated explants, pcs.	Кол-во регенерировавшихся побегов через 3 пассажа, шт. Number of regenerated shoots through 3 passages, pcs.	Среднее значение Коэффициент размножения, $P=a/bc$ Mean Multiplication factor, $P=a/bc$
	<i>Berberis siliensis</i> Form 4			<i>Berberis integerrima</i> Form 7		
1	15	52	1,1±0,3 ^a	15	64	1,4±0,2 ^a
2	15	43	0,9±0,3 ^a	15	52	1,2±0,2 ^{ac}
3	15	54	1,5±0,6 ^{abc}	15	66	1,5±0,4 ^{ab}
4	15	47	1,0±0,3 ^a	15	55	1,2±0,2 ^{ac}
5	15	48	1,1±0,2 ^a	15	44	1,0±0,2 ^{ac}
6	15	69	1,5±0,4 ^{abc}	15	89	2,0±0,2 ^b
7	15	64	1,4±0,3 ^{ac}	15	68	1,5±0,3 ^{ab}
8	15	54	1,2±0,1 ^a	15	66	1,5±0,4 ^{ab}
9	15	45	1,2±0,1 ^a	15	52	1,1±0,2 ^{ac}
10	15	47	1,1 ±0,2 ^a	15	67	1,5 ±0,3 ^{ab}

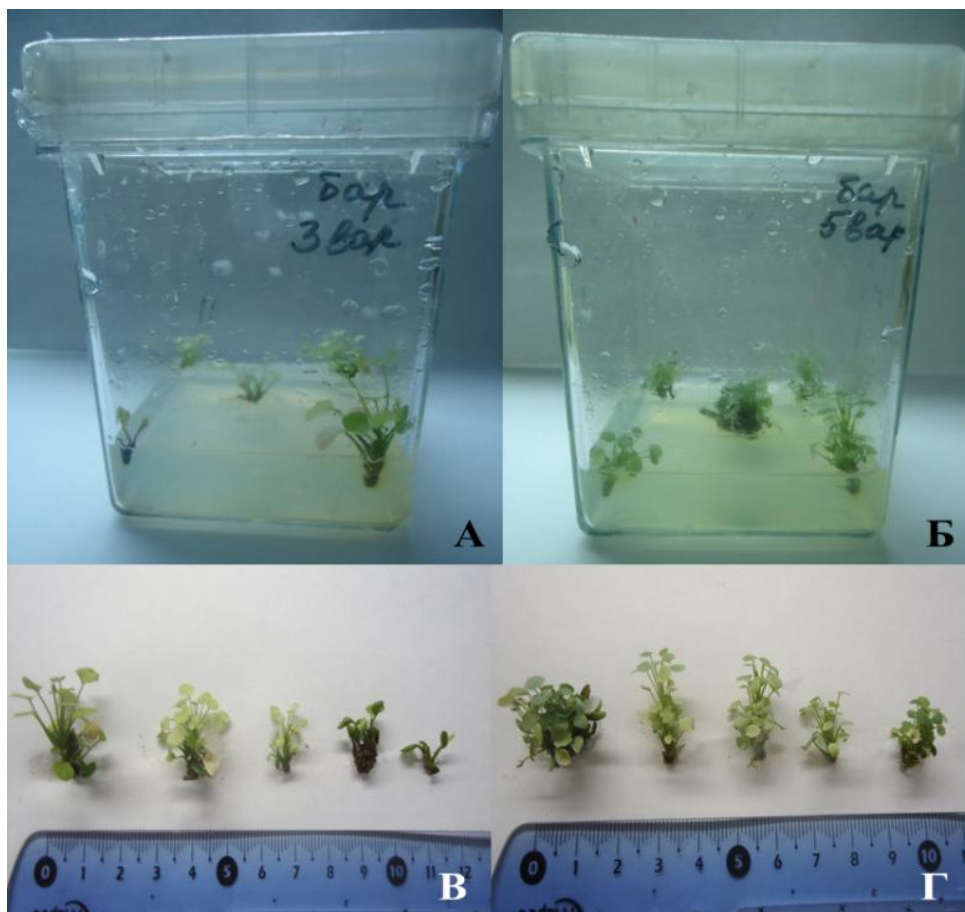
11	15	40	0,9±0,2a	15	43	1,0±0,1 ^c
12	15	98	2,2±0,3b	15	107	2,4±0,2 ^{bd}
13	15	85	1,9±0,3bc	15	105	2,3±0,2 ^{bd}
14	15	77	1,7±0,0c	15	89	2,0±0,4 ^b
15	15	109	2,4±0,1b	15	123	2,8±0,3 ^d
16	15	114	2,5±0,1b	15	125	2,8±0,3 ^d
17	15	103	2,3±0,9bd	15	123	2,8±0,1 ^d
18	15	152	3,4±0,1de	15	158	3,5±0,2 ^e
19	15	122	2,7±0,4d	15	152	3,4±0,4 ^{de}
20	15	157	3,5±0,2 ^e	15	167	3,7±0,2 ^{ef}
21	15	166	4,3±0,3 ^f	15	188	4,2±0,3 ^f
22	15	170	3,8±0,4 ^{ef}	15	178	4,3±0,3 ^f
23	15	101	2,6±0,5 ^e	15	121	2,7±0,5 ^{de}
24	15	109	2,7±0,5 ^{de}	15	119	2,6±0,4 ^{de}
25	15	90	2,4±0,3 ^e	15	110	2,4±0,4 ^{bd}
26	15	130	3,1 ±0,5 ^{bd}	15	120	2,7±0,3 ^{bd}
Примечание – значения P, обозначенные разными буквами, достоверно различаются между собой при p ≤ 0,01 Note – P values marked with various letters differ significantly between themselves at p ≤ 0,01						

В результате показано, что оптимальная концентрация ИМК в питательной среде составляет 0,02 мг/л. Увеличение концентрации ИМК до 0,05 мг/л приводило к набуханию оснований микропобегов, а на отдельных образцах происходил каллусогенез и ризогенез.

Испытано три концентрации БАП – 0,5 мг/л, 0,8 мг/л и 1,0 мг/л в питательной среде. Было выявлено, что уже незначительное увеличение этого фитогормона до 0,8 мг/л способствует появлению дополнительных побегов. Увеличение концентрации хелата железа, а также добавление в питательную среду АК и пантотената кальция благоприятно повлияло на внешнее состояние растений, интенсивность их окраски, уменьшало количество выделяемых фенольных веществ, витрифицированных побегов и некрозов.

В результате выявлено, что для барбариса илийского и барбариса цельнокрайнего наиболее высокий Кр был на питательных средах: №18, 20, 21, 22. Наиболее оптимальной является питательная среда №21, коэффициент размножения на которой был максимальным для обоих образцов.

Кроме того, было проведено сравнение качества регенерировавших растений на всех вариантах питательных сред. Для этого побеги культивировали по 5 штук на определенном варианте питательной среды (рисунок 6А, 6Б). Учитывали по баллам качество растений: количество, цвет, длина, ширина листьев и побегов, а также наличие некроза, каллуса, фенолов, выделяемых в среду (рисунок 6В, 6Г).



А – побеги в мадженте на питательной среде №17; Б – побеги в мадженте на питательной среде №22;
 В – изолированные побеги на питательной среде №17; Г – изолированные побеги на питательной среде №22

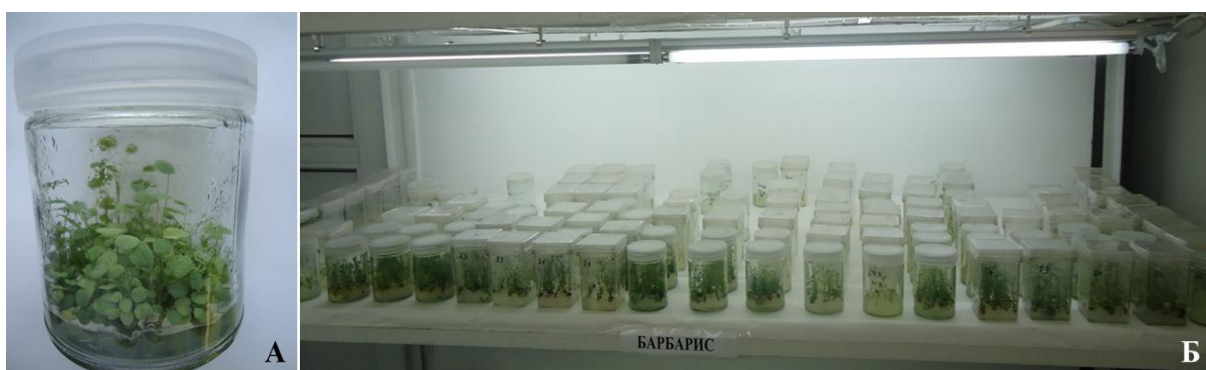
Рис. 6. Оптимизация состава питательных сред для *Berberis iliensis* форма 4 (растения 3-недельного срока культивирования)

А – shoots in a box on №17 nutrient medium; Б – shoots in a box on №22 nutrient medium; В – isolated shoots on №17 nutrient medium; Г – isolated shoots on №22 nutrient medium

Fig. 6. Optimization of the nutrient media composition for *Berberis iliensis* Form 4 (3 weeks cultivation plants)

В результате максимально качественными растениями по сумме баллов были побеги барбариса илийского, культивируемого на питательной среде: №20, 21, 22, 23; и барбариса цельнокрайнего, культивированного на питательных средах: №18, 20, 21, 22. Статистический анализ не выявил достоверных различий между вариантами питательных сред: №21 (Кр 4,3), №22 (Кр 4,2), которые оптимальны для обоих образцов, однако Кр несколько выше на питательной среде №21.

В результате проведенной работы создана коллекция растений барбариса *in vitro*, состоящая из 51 образца (рисунок 7) и разработан биотехнологический регламент получения коллекции растений барбариса *in vitro* (рисунок 8).



А – растения *Berberis integerrima*; Б – коллекция асептических растений барбариса *in vitro*

Рис. 7. Развитие барбариса в светокультуральной комнате (24°C, освещенность 40 $\mu\text{мол}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, фотопериод 16/8 ч)

А – *Berberis integerrima* plants; Б – *in vitro* collection of barberry aseptic plants

Fig. 7. Development of barberry in a growth room (24°C, light 40 $\mu\text{мол}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, photoperiod 16/8 h)

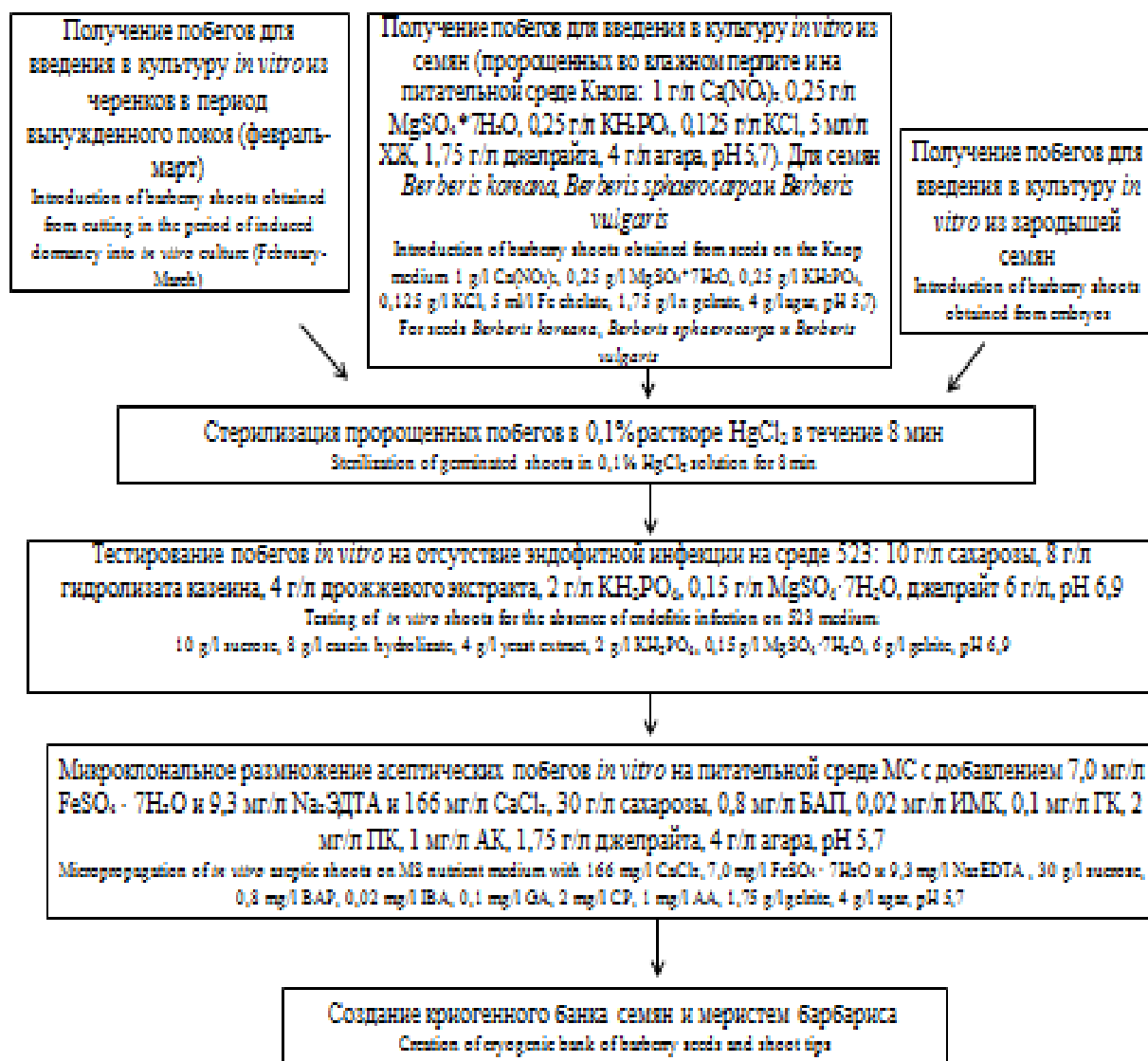


Рис. 8. Биотехнологический регламент получения коллекции растений барбариса *in vitro*

Fig. 8. Biotechnological regulation for *in vitro* barberry plant collection

Полученная коллекция послужит основой для создания криобанка гермоплазмы барбариса Казахстана при температуре -196°C , коллекция может быть также использована в селекционном процессе по улучшению существующих и созданию новых сортов и для международного обмена растительными ресурсами.

ВЫВОДЫ

1. Для получения проростков барбариса можно использовать: 1) семена, пророщенные в перлите, и в условиях *in vitro* на среде Кнопа; 2) зародыши, пророщенные в условиях *in vitro* на питательной среде МС; 3) черенки, пророщенные в воде. Лабораторная всхожесть семян в среднем по образцам составила 66,6%. Для трудно прорастаемых семян рекомендовано дополнительно провести скарификацию и стратификацию.

2. Для стерилизации растительного материала при введении в культуру *in vitro* оптимальна обработка эксплантов в 0,1% растворе HgCl_2 в течение 8 мин. При данной длительности стерилизации отмечен высокий процент регенерации побегов – 46,4%.

3. Для получения асептической коллекции *in vitro* требуется контроль чистоты пробирочных растений на специализированной среде 523 для детекции бактерий и грибов. Проверка показала, что в среднем 44,5% побегов, введенных в культуру *in vitro*, визуальную инфицированность которых не проявлялась, были поражены эндофитной инфекцией.

4. Оптимизирован состав питательной среды для микроклонального размножения побегов барбариса, наиболее оптимальной является среда МС+166 мг/л CaCl_2 , 3,7 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 г/л сахаразы, 0,8 мг/л БАП, 0,02 мг/л ИМК, 0,1 мг/л ГК, 2 мг/л ПК, 1 мг/л АК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7. На этом варианте питательной среды были получены качественные растения и максимальный коэффициент размножения.

5. Разработан биотехнологический регламент получения коллекции растений барбариса *in vitro*, создана коллекция, состоящая из 51 образца.

Финансирование

Работа выполнена в рамках проекта 1783/ГФ4 «Разработка технологии криогенного сохранения гермоплазмы ценных видов и форм барбариса – источника биологически активных веществ». По бюджетной программе: 217 «Развитие науки», подпрограмме 102 «Грантовое финансирование научных исследований».

ЛИТЕРАТУРА

1. Иллюстрированный определитель растений Казахстана.– Алма-Ата: Наука, 1969. – Т. 1. – 644 с.
2. Кулик К.Н. Агролесомелиоративное картографирование и фитоэкологическая оценка аридных ландшафтов. – Волгоград: Изд-во ВНИАЛМИ, 2004. – 248 с.
3. Мухитдинов Н.М., Аметов А.А., Абидкулова К.Т., Ыдырыс А. Некоторые фитоценоотические особенности популяций *Berberisiliensis* М.Рор // Вестник Иссык-Кульского университета. – 2010. – №27. – С. 233-237.
4. Красная книга Казахской ССР. – Т. 2(1). Растения.– Изд.2, исправл. и дополн. – Астана, 2014. – 452 с.
5. http://www.wwf.ru/about/where_we_work/asia/kazakh/eng.
6. Ибрагимов И.И., Джумабаев Т.З. Стимулирующее действие на систему свертывания крови барбариса продолговатого и барбариса монетного, произрастающих в Узбекистане. – Ташкент: Фан, 1971. – 186 с.
7. Mokhber-Dezfuli N., Saeidnia S., Gohari A.R., Kurepaz-Mahmoodabadi M. Phytochemistry and Pharmacology of *Berberis Species* // Pharmacogn Rev. – 2014. – Vol. 8(15). – P. 8-15.
8. Hosseinzadeh H., Ramezani M., Shafaei H., Taghiabadi E. Anticonvulsant effect of *Berberisintegerrima* L. root extracts in mice // Journal Acupunct Meridian Stud. – 2013. – Vol. (1). – P. 12-7.
9. Попов А.С. Криогенное хранение культур клеток растений // Культура клеток растений. – М: Наука, 1981. – С. 150-162.
10. Reed B.M. The basics of *in vitro* storage and cryopreservation // National Clonal Germplasm Repository, Corvallis, O.R. USA. – 2002. – P. 34-46.
11. Seeds for Our Future. The U.S. National Plant Germplasm System // United States Department of Agriculture, Agricultural Research Serv. – 1996. – 20 p.

12. Dhar S., Sharma Y.P., Wakhlu A.K. *In Vitro* Plant Regeneration System for *Berberis lycium* using cotyledonary node explant // *Journal of Tropical Medicinal Plants*. – 2012. – Vol. 13, I. 1. – P. 51-55.
13. Шорников Д.Г., Брюхина С.А., Муратова С.А., Янковская М.Б., Папихин Р.В. Оптимизация условий культивирования *in vitro* ягодных и декоративных культур // *Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки*. – 2010. – Т. 15(2). – С. 640-645.
14. Ромаданова Н.В., Мишустина С.А., Карашолакова Л.Н., Аралбаева М.М., Кабулова Ф.Д., Абидкулова К.Т., Кушнарченко С.В. Введение культуры *in vitro* дикорастущих видов *Berberis* флоры Казахстана и Узбекистана // *Вестник КазНУ им. аль-Фараби. Серия биологическая*. – 2015. – №3 (65). – С. 346-354.
15. Ромаданова Н.В., Мишустина С.А., Карашолакова Л.Н., Аралбаева М.М., Рахимбаев И.Р., Кушнарченко С.В. Создание коллекции *in vitro* дикорастущих видов *Berberis* spp. // *Бюллетень ГНБС*. – 2016. – Вып. 121. – С. 69-76.
16. Lynch P.T., Benson E.E., Harding K. Climate change: the role of ex situ and cryo-conservation in the future security of economically important, vegetatively propagated plants // *J. Horticultural Science & Biotechnology*. – 2007. – Vol. 82, №2. – P. 157-160.
17. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. – 2011. – Vol. 47, №1. – P. 5-16.
18. Knop W. Quantitative untersuchungen über den ernährungsprozess der pflanze // *Landw. Versuchssat.* – 1865. – Vol. 7. – P. 93.
19. Murashige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473-479.
20. Viss P.R., Brooks E.M., Driver J.A. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture // *In Vitro Cell. Development Biol.* – 1991. – Vol. 27. – P. 42.
21. Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для биол. спец. вузов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.
22. SYSTAT (2007) SYSTAT 12.0, SYSTAT Software, Inc, San Jose, CA, pp. Statistics software.
23. Трускинов Э.В. Культура *in vitro* как современный способ воспроизведения, сохранения и интродукции вегетативно размножаемых растений // *Биолог. разнообразие. Интродукция растений*. – СПб., 2007. – С. 85.
24. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук Е.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наук. думка, 1980. – 88 с.
25. Arena M.E., Pastur G.M., Vater G. In vitro propagation of *Berberis buxifolia* Lam. // *Biocellissn*. – 2000. – Vol. 24 (1). – P. 73-80.

REFERENCES

1. *Illyustrirovannyi opredelitel' rasteniy Kazakhstana*. [Illustrated determinant of Kazakhstan plants]. Alma-Ata: Nauka, 1969, vol. 1, 644 p.
2. Kulik K.N. Agrolesomeliativnoyey kartografirovaniye fitoekologicheskaya otsenka aridnykh landshaftov [Agroforestry mapping and phytocological evaluation of arid landscapes]. Volgograd, 2004, 248 p.
3. Mukhitdinov N.M., Ametov A.A., Abidkulova K.T., Ydyrys A. Nekotorye fitotsenoticheskiye osobennosti populyatsiy *Berberis siliensis* M. Pop. [Some phytocenotic features of populations of *Berberis siliensis* M. Pop.]. Reporter of the Issyk-Kul University, 2010, no. 27, pp. 233-237.
4. *Krasnaya kniga Kazakhskoy SSR*. [Red Book of the Kazakh SSR]. Part 2: Plants. Alma-Ata, 1981, 284 p.
5. http://www.wwf.ru/about/where_we_work/asia/kazakh/eng.
6. Ibragimov I.I., Dzhumabayev T.Z. Stimuliruyushcheyeystviye nasistem usvertvyvaniy akrovibarbarisaprodolgovatogo ibarbarisamonetnogo, proizrastayushchikh v Uzbekistane [Stimulating effect of *Berberis oblonga* and *Berberis nummularia* on the blood clotting system growing in Uzbekistan]. Tashkent, 1971, 186 p.
7. Mokhber-Dezfuli N., Saeidnia S., Gohari A.R., Kurepaz-Mahmoodabadi M. Phytochemistry and Pharmacology of *Berberis Species*. *Pharmacogn Rev.*, 2014, vol. 8(15), pp. 8-15. doi:10.4103/0973-7847.125517.
8. Hosseinzadeh H., Ramezani M., Shafaei H., Taghiabadi E. Anticonvulsant effect of *Berberis integerrima* L. root extracts in mice. *Journal Acupunct Meridian Stud.*, 2013, vol. (1), pp. 12-7. PMID:23433050, DOI: 10.1016/j.jams.2012.07.018.
9. Popov A.S. Kriogennoyey khraneniye kul'tur letok rasteniy [Cryogenic storage of plant cell cultures]. *Kulturakletok rasteniy*. – M., Nauka, 1981, pp. 150-162.

10. Reed B.M. The basics of *in vitro* storage and cryopreservation. National Clonal Germplasm Repository, Corvallis, O.R. USA, 2002, pp. 34-46. doi: 10.17660/ActaHortic.2002.596.66.
11. Seeds for Our Future. The U.S. National Plant Germplasm System. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Serv, 1996, 20 p.
12. Dhar S., Sharma Y.P., Wakhlu A.K. *In Vitro* Plant Regeneration System for *Berberis lycium* using cotyledonary node explant. *Journal of Tropical Medicinal Plants.*, 2012, vol. 13, I. 1, pp. 51-55.
13. Shornikov D.G., Bryukhina S.A., Muratova S.A., Yankovskaya M.B., Papikhin R.V. Optimizatsiya usloviy kul'tivirovaniya *in vitro* yagodnykh i dekorativnykh kul'tur. *Vestnik Tambovskogo universiteta. Seriya: Yestestvennyye i tekhnicheskiye nauki*, 2010, vol. 15(2), ss. 640-645.
14. Romadanova N.V., Mishustina S.A., Karasholakova L.N., Aralbayeva M.M., Kabulova F.D., Abidkulova K.T., Kushnarenko S.V. Vvedeniye kul'turu *in vitro* dikorastushchikh vidov *Berberis* flory Kazakhstana i Uzbekistana [Introduction of wild *Berberis* species of Kazakhstan and Uzbekistan flora into *in vitro* culture]. *Vestnik Kaz NU named after al-Farabi, seriyabiologicheskaya*, 2015, №3(65), pp. 346-354. doi: 10.13140/RG.2.1.2178.0243.
15. Romadanova N.V., Mishustina S.A., Karasholakova L.N., Aralbayeva M.M., Rakhimbayev I.R., Kushnarenko S.V. Sozdaniye kolleksi *in vitro* dikorastushchikh vidov *Berberis* sp. *Byulleten' GNBS*, 2016, vyp. 121, pp. 69-76.
16. Lynch P.T., Benson E.E., Harding K. Climate change: the role of ex situ and cryo-conservation in the future security of economically important, vegetatively propagated plants. *J. Horticultural Science & Biotechnology*, 2007, vol. 82, no. 2, pp. 157-160. doi: 10.1080/14620316.2007.11512213.
17. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 2011, vol. 47, no. 1, pp. 5-16. doi: 10.1007/s11627-010-9327-2.
18. Knop W. Quantitative untersuchungen über den ernährungsprozess der pflanze. *Landw. Versuchssat*, 1865, vol. 7, pp. 93.
19. Murashige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 1962, vol. 15, pp. 473-479.
20. Viss P.R., Brooks E.M., Driver J.A. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture. *In Vitro Cell. Development Biol.*, 1991, vol. 27, pp. 42.
21. Lakin G.F. Biometriya: Uchebnoyeposobiyyedlya biol. spets. vuzov [Textbook for Biological Specialized Institutes of Higher Education]. 4-ye izd., pererab. idop. M., Vyssh. shkola, 1990, 352 p.
22. SYSTAT (2007) SYSTAT 12.0, SYSTAT Software, Inc, San Jose, CA, pp. Statistics software.
23. Truskinov E.V. *Kultura *in vitro* kak sovremennyy sposob vosproizvedeniya, sokhraneniya i introduktsii vegetativno razmnozhayemykh rasteniy* [In vitro culture as a modern method to reproduce, preservation and the introduction of vegetatively propagated plants]. Biol. divers. Introduction of plants. St. Petersburg, 2007, pp. 85.
24. Kalinin F.L., Sarnatskaya V.V., Polishchuk Ye. Ye. *Metody kultury tkaney v fiziologii i biokhimiirasteniy* [Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry]. Kiyev, Nauk. Dumka, 1980, 88 p.
25. Arena M.E., Pastur G.M., Vater G. *In vitro* propagation of *Berberis buxifolia* Lam. *Biocellissn.*, 2000, vol. 24 (1), pp. 73-80. PMID: 10893802.

БӨРІҚАРАҚАТТЫ МИКРОКЛОНДЫ КӨБЕЙТУ ӘДІСІН ЖЕТІЛДІРУ

Ромаданова Н.В., Махмутова И.А., Қарашолақова Л.Н., Христенко А.А.,
Кушнаренко С.В.

Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты
Тимирязев к-сі, 45, Алматы, 050040
nata_romadanova@mail.ru

ТҮЙІН

Бөріқарақаттың генетикалық алуантүрлілігін криобанкте сақтау және табиғи өсу ортасында аналық жатындарын құру үшін бірінші сатысында *in vitro* асептикалық өсімдіктер коллекциясын алу қажет. Алға қойылған міндетті орындау үшін биотехнологиялық әдістермен бөріқарақаттың тұқымдары мен өркендерінен өскіндер алынды. Бұлғалды перлитте қиын өнетін кейбір түрлердің тұқымдары үшін қосымша скарификация және стратификация жүргізілуі қажет. *In vitro* культурасына экспланттарды енгізу үшін регенерация 46,4% құраған HgCl₂ 0,1% ерітіндісінде 8 мин бойы өңдеу оптималды болды. *In vitro* культурасындағы өсімдіктер бактериялар мен

саңырауқұлақтарды анықтауға арналған арнайы 523 қоректік ортасында тексеруден өткізілді. Тексеру *in vitro* культурасына енгізілген барлық зерттелген үлгілердің орта есеппен 44,5% өркендері эндофитті инфекциямен зақымдалғанын көрсетті. Көбеюдің ең жоғары коэффициенті – 4,3 және регенерацияға ұшыраған жоғары сапалы өсімдіктер алынған қоректік ортаның құрамы таңдалды: 166 мг/л CaCl₂, 3,7 г/л MgSO₄·7H₂O, 30 г/л сахароза, 0,8 мг/л 6-бензиламинопурин, 0,02 мг/л индолил май қышқылы, 0,1 мг/л гибберелл қышқылы, 2 мг/л кальций пантотенаты, 1 мг/л аскорбин қышқылы, 1,75 г/л джелрайт, 4 г/л агар қосылған, рН 5,7 болатын Мурасиге-Скуг қоректік ортасы. Бөріқарақаттың *in vitro* өсімдіктер коллекциясын алудың биотехнологиялық регламенті жасалды, 51 үлгіден тұратын өсімдіктер коллекциясы құрылды. Коллекция Қазақстанның бөріқарақатының гермоплазма криобанкін құруда және өсімдік ресурстарымен халықаралық алмасуда негіз болады.

Негізгі сөздер: бөріқарақат, тұқымдар, өркендер, микроклонды көбейту, коллекция *in vitro*