

## IN VITRO CULTURE OF *Rhodiola rosea*L.

Khakilina O.N., Kupeshev Z.S., Danilova A.N., Kalendar R.N.

National Center for Biotechnology  
Kurgalzhyn road, 13/5, Astana, 010000, Kazakhstan  
hapilina@biocenter.kz

### ABSTRACT

We present the results of our study on *in vitro* culture of the valuable medicinal plant *Rhodiola rosea* (*Rhodiola rosea* L.). We collected sample plant materials from the Kazakh Altai territory. The essential stages of *in vitro* cultivation techniques for *R. rosea* were optimized. We determined the most effective sterilization protocol for different types of explants of *Rhodiola* and optimized stages of organogenesis and formation of adventitious shoots. We found that aseptic cultures of *Rhodiola* necessitate the use of multi-stage sterilization protocol using different types of antiseptics. Apexes of shoots and rhizome buds were the most effective explants. High concentration of exogenous cytokinin in the culture medium induced adventitious organogenesis in *R. rosea*. Maximum adventitious shoots (up to 34 explants) were observed using MSZ1 medium supplemented with zeatin, indole-3-acetic acid, and gibberellic acid at concentrations of 2, 0.1, and 0.5 mg/L, respectively. The formation of the root system was dependent on the agar concentration in the medium. Morphometric characteristics were higher in regenerated *Rhodiola* grown on a medium containing 0.6% agar.

Keywords: golden root, *Rhodiola rosea* L., *in vitro* culture, explants, adventitious organogenesis, micropropagation.

УДК 633.88:632.937.19:602.6:58

## КУЛЬТУРА РОДИОЛЫ РОЗОВОЙ (*RHODIOLA ROSEAL.*) IN VITRO

Хапилина О.Н., Купешев Ж.С., Данилова А.Н., Календарь Р.Н.

Национальный центр биотехнологии  
Кургальжинское шоссе, 13/5, Астана, 010000, Казахстан  
hapilina@biocenter.kz

### АБСТРАКТ

В статье представлены результаты исследований по введению в культуру *invitro* родиолы розовой (*Rhodiolarosea*L.). В качестве материала исследований были использованы растения родиолы розовой, собранные в местах ее естественного произрастания на территории казахстанского Алтая. В процессе выполнения исследований проведены эксперименты по введению в культуру *invitro* ценного лекарственного растения – родиолы розовой. Определены эффективные протокола стерилизации различных типов эксплантов родиолы, оптимизированы этапы органогенеза и образования адвентивных побегов. Установлено, что для получения асептических культур родиолы необходимо использовать многоэтапные протокола стерилизации с применением различных типов антисептиков. В результате исследований показано, что наиболее эффективным типом эксплантов являются апексы побегов, а также корневищные почки родиолы. В присутствии высоких концентраций экзогенных цитокининов происходит индукция адвентивных побегов. Максимальное количество адвентивных побегов (до 34 на эксплант) было зафиксировано при субкультивировании на среде MSZ1, содержащей 2 мг/л зеатина, 0,1 мг/л ИУК и 0,5 мг/л гибберелловой кислоты. Формирование корневой системы регенерантов зависело от концентрации агара в питательной среде. Морфометрические характеристики были лучше у тех регенерантов родиолы, которые выращивались на среде с 0,6% агара.

Ключевые слова: золотой корень, родиола розовая, *Rhodiolarosea*L., культура *invitro*, экспланты, адвентивный органогенез, микрклональное размножение.

## ВВЕДЕНИЕ

Сохранение природного биоразнообразия и рационального использования природных ресурсов является весьма актуальной проблемой. Флора Казахстана включает более 13 тыс. видов, в том числе: более 5754 вида высших сосудистых растений, около 5000 грибов, 485 лишайников, более 2000 водорослей, около 500 мохообразных. Среди растений 14% видов являются эндемиками, в их числе немало реликтов. В Красную книгу Республики Казахстан внесено 387 видов растений, в том числе и родиоларозовая (*Rhodiolarosea*L.) [1].

Родиола розовая является одним из ценных лекарственных растений, в корневищах которого содержатся различные биологически активные компоненты: фенилпропаноиды – розавин, розарин, розин; фенольные соединения – салидрозид, тирозол; флавоноиды – родионин, родиолин, родиозин, ацетилродальгин; фенольные кислоты, монотерпены, танины, глюкозиды и фенольные масла [2]. Препараты, созданные на основе корня родиолы, применяют в реабилитационном периоде после операций, травм, тяжелых инфекционных заболеваний в качестве общеукрепляющего средства. Экстракты родиолы розовой входят в состав общеукрепляющих и тонизирующих средств, которые находят все более широкое применение в восстановительной, спортивной медицине и гериатрии [3].

В пределах Республики Казахстан вид встречается в субальпийском и альпийском поясах в высотном пределе 1800-2400 м над уровнем моря на хребтах Казахстанского Алтая: Юго-Западный Алтай (хр. Ивановский, Ульбинский, Холзун, Западная Листвяга); Южный Алтай (хр. Курчумский, Нарымский, Сарым-Сакты, Южно-Алтайский Тарбагатай, Южный Алтай); Центральный Алтай (Чиндогатуйские горы, северо-западная оконечность плато Укок). К числу факторов, определяющих жизненный ритм этого вида, относятся суровый и недостаточно благоприятный метеорологический режим вегетационного периода (суточные перепады температур воздуха, понижение их до отрицательных значений, интенсивная солнечная радиация, сильные и постоянные холодные ветры, летние снегопады, вмерзание в лед, сдувание снега в зимний период и оголение почвы, маломощный, грубоскелетный, крайне бедный питательными веществами почвенный покров, мощно развитый напочвенный покров, препятствующий прогреванию почвы).

Рост популярности данного вида растений среди населения приводит к увеличению сбора подземной части растений и, как следствие этого, истощению природных популяций. Возобновление природных популяций лекарственных растений предполагает выращивание ценных видов в экспериментальных условиях. Микроразмножение считается одним из наиболее коммерчески и экономически важных подходов. Современные методы особенно подходят для видов, которые трудно возобновимы в естественных условиях [4].

На сегодняшний день культивирование *in vitro* и микрклональное размножение исчезающих видов ценных растений является одним из альтернативных источников получения лекарственного сырья, при этом способствует сохранению природных популяций и является актуальным направлением современной биотехнологии.

Технологии микрклонального размножения позволяют ускорить размножение редких и исчезающих видов растений, нуждающихся в охране, и рассчитаны на получение дополнительного источника сырья в виде каллусных тканей и/или суспензионных культур, а также растений-регенерантов для плантационного выращивания сырья ресурсных лекарственных растений. Растения, полученные методом микрклонального размножения, позволяют решить проблемы здоровья нации, сохраняют растительный мир планеты [5]. С использованием метода культивирования тканей и органов растений в настоящее время создан ряд клеточных технологий, позволяющих получать ценные вторичные продукты метаболизма растений, такие как гликозиды, алкалоиды, некоторые другие биологически активные вещества, имеющие широкое применение в качестве лекарственных препаратов, пищевых красителей, ароматизаторов и др. [3].

Первые сообщения о культивировании родиолы розовой в условиях *in vitro* были получены в 1980 г. В 1981 г. был получен патент на способ регенерации корней родиолы розовой, но не была представлена информация об условиях индукции каллусогенеза [6]. Из введенных в культуру *in vitro* нескольких видов родиолы (*R. crenulata*, *R. kirilowii*, *R. quadrifida*, *R. sachalinensis*) родиоларозовая является наиболее требовательной к условиям культивирования [7]. Это подтверждают последующие публикации, в которых были представлены довольно противоречивые результаты. Анализ литературы показывает, что для каждого конкретного случая оптимальные условия определяются экспериментально. Следует отметить, что успешные результаты по индукции органогенеза *in vitro* были получены при использовании всех органов растения родиолы розовой. Наибольшее предпочтение в большинстве работ отдается листовым эксплантам [8, 9] вследствие удобства стерилизации, а также апикальным и корневищным почкам [10]. Менее часто используются ствольные сегменты (междоузлия и листовые узлы), а также сегменты корневищ [11]. Практически в каждой отдельной работе по культивированию родиолы розовой *in vitro* предлагаются самостоятельные протоколы культивирования, определяющие состав и концентрацию регуляторов роста, из которых наиболее часто используются 6-бензиламинопурин (БАР), индол-3-уксусная кислота (IAA), L-нафтил уксусная кислота (НАА), индол-3-масляная кислота (ИВА), и 2,4-дихлорфенокси уксусная кислота (2,4-D) [12, 13]. В ряде работ была выявлена географически обусловленная потребность в определенных регуляторах роста. Так, например, индукция каллусообразования у трех экотипов родиолы розовой из южного Урала и Алтая (РФ) определялась БАП и ИУК, концентрация которых варьировала в пределах 0,1-0,2 мг/л [12]. В других исследованиях у экотипов родиолы Алтайского экотипа показана потребность в высоких концентрациях БАР (в 10-15 раз выше) в сравнении с эксплантами от тибетского экотипа золотого корня [14].

Резюмируя вышесказанное, можно отметить, что определенных требований к условиям культивирования *in vitro* родиолы розовой не имеется, в этой связи необходима разработка собственного протокола микрклонального размножения родиолы розовой, собранной на территории казахстанского Алтая.

В Казахстане исследования по введению родиолы розовой в культуру *in vitro* не проводились, хотя ареал распространения данного вида довольно широкий: значительные популяции родиолы выявлены на Алтае, Восточном Казахстане, а также в предгорьях Алатау. Проводимые исследования были направлены на изучение ареалов распространения и изучения их биологических особенностей [15, 16, 17].

Цель исследования – введение в культуру *in vitro* микрклональное размножение ценного лекарственного растения родиолырозовой (*Rhodiolarosea*L.).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала исследований были использованы растения родиолы розовой, собранные в местах ее естественного произрастания на территории казахстанского Алтая.

Маршруты экспедиций охватывали 2 географических района: территорию Южного и Западного (Юго-Западного) Алтая. Общее руководство экспедициями и разработкамаршрутных исследований осуществлялисьизвестным ботаником, кандидатом биологических наук Котуховым Ю.А. Координаты и абсолютная высота местонахождения ценопопуляции, из которой был взят материал живых растений для микрклонального размножения, были определены с помощьюGPS-навигатора. При определении видового состава растений, образующих фитоценоз с участием родиолы розовой, использованы фундаментальные сводки «Флора Казахстана» [18] и «Флора Сибири»[19]. Численность и проективное покрытие определяли методом пробных площадок размером 0,25-1м<sup>2</sup>.

Введение в культуру *in vitro* проводили в лабораторных условиях после поверхностной стерилизации в различных агентах – гипохлорите натрия, этаноле, марганцовокислом калие, сулеме. В качестве эксплантов были использованы листья, стебли, пазушные и корневищные почки, апексы стеблей.

Изолированные от донорных растений корневищные почки, апексы стеблейпосле поверхностной стерилизации помещали на питательные среды, содержащие фитогормоны – БАП, НУК, ИУК, зеатин в различных концентрациях, которые подбирались эмпирически. Помимо экзогенных фитогормонов, в состав питательных сред входили: сахароза (30 г/л), агар (5-7 г/л). Значение рН всех питательных сред составляло 5,7-5,8. Питательные среды стерилизовались автоклавированием при 121°С в течение 20 мин [20].

Культивирование корнесобственных регенерантовродиолы проводили в сосудах с почвой, торфом и перлитом (по отдельности или в комбинации). Температурно-влажностный режим культивирования регенерантовродиолы в почвогрунте был аналогичным культуре *in vitro*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Сбор донорных растений родиолырозовой (*Rhodiolarosea*L.)

В процессе скрининговых исследований на хребтах Казахстанского Алтая в зависимости от местообитаний и увлажнения почвы было выделено несколько групп ценопопуляцийродиолы розовой. Наиболее мощное развитие популяции родиолырозовой имеют в условиях благоприятного водно-температурного режима, на почвах с высоким содержанием гумуса в почве, что обуславливает пышное развитие растительности. С продвижением вглубь лесного пояса встречается все реже и постоянновыпадает из состава фитоценозов. Анализ за состоянием развития родиолырозовой в верхнем пределе ее распространения (2100-2300 м над ур.м.) дают основания считать эти местообитания экстремальными.

В результате экспедиционных исследований был проведен сбор исходного материала родиолы розовой для введения в культуру *in vitro*: в качестве доноров использовали растения родиолы розовой из популяции, расположенной на территории Западного Алтая (хр. Ивановский, вершина Вышеивановская верховья р. Татарка,около снежников). Географические координаты популяции N 50°18'58", E 83°52'12" (высота 1940 м над ур. м.) (рис. 1).



**Рис.1.** Растение родиолы розовой в фазу цветения (Западный Алтай, хр. Ивановский, верховья р. Татарка, 1940 м над ур.м.)

**Fig.1.** The plant of *Rhodiola rosea* in the flowering stage (Western Altai, m. Ivanovsky, r. Tatarka, 1940 m above sea level)

### **Протокол стерилизации эксплантов родиолы розовой**

Данный этап в технологии культивирования тканей является первоначальным и довольно проблематичным, поскольку важно сохранить жизнеспособность эксплантов при соблюдении их стерильности. Для индукции культуры *in vitro* родиолы розовой использовали различного типа экспланты: верхушки побегов, пазушные и корневищные почки, листья, стебли, зрелые листья, корни, стебли. Получение асептических культур из растений, взятых из природных популяций, всегда являлось довольно большой проблемой ввиду наличия скрытой инфекции. Для этого большинство исследователей рекомендуют использовать многоступенчатые протоколы стерилизации, включающие обработку несколькими антисептиками. Ввиду широкой специфичности действия используемых веществ многоступенчатые протоколы могут быть универсальными для стерилизации эксплантов различной органной принадлежности [21, 11].

Предварительно все экспланты были тщательно очищены от остатков земли, затем промыты под струей проточной воды в течение нескольких часов. На первом этапе введения в культуру *in vitro* нами были отработаны различные протоколы стерилизации, включающие использование этилового спирта, гипохлорита натрия, марганцовокислого калия, перекиси водорода в различных концентрациях. Протокол №1 предусматривал следующие агенты: этанол 70% – 3 мин, хлорамин 20% – 15 мин. Протокол №2: этанол 70% – 3 мин, перекись водорода 3% – 5 мин; протокол №3: этанол 70% – 5 мин, хлорамин 20% – 15 мин, сулема 0,1% – 10 мин; протокол №4: этанол 70% – 3 мин, сулема 0,1% – 20 мин; протокол №5: этанол 70% – 3 мин, сулема 0,1% – 30 мин; протокол №6: этанол 70% – 3 мин, сулема 0,1% – 40 мин; протокол №7: перманганат калия 0,01% – 15 мин, сулема 0,1% – 10 мин; протокол №8: перманганат калия 0,01% – 5 мин, перекись водорода 3% – 5 мин, сулема 0,1% – 15 мин. После экспозиции в стерилизующих агентах проводили 3-кратную отмывку в стерильной воде в течение 15 мин. Эффективность протокола стерилизации определяли по количеству инфицированных эксплантов на 7 день культивирования, а также по показателям жизнеспособности эксплантов.

Исследования выявили зависимость степени инфицированности различных эксплантов от протокола стерилизации. Так, например, стеблевые экспланты были значительно менее инфицированы, наблюдали полное отсутствие инфекции в сравнении с другими эксплантами. Наиболее сложным был процесс стерилизации корневищных почек, ввиду наличия инфекции в латентной форме. Для этих эксплантов эффективными оказались протоколы, предусматривающие использование 2-3 агентов, несмотря на то, что многоступенчатая стерилизация с использованием перманганата, сулемы снижает количество жизнеспособных эксплантов.

Стерилизацию семян родиолы проводили после предварительной стратификации в растворах гибберелловой кислоты (GA3) и тиомочевины, последняя, помимо ростостимулирующего действия, обладает еще и фунгицидной активностью. По данным ряда исследователей, тиомочевина в оптимальной ростостимулирующей дозе 0,1 мас.% увеличивает энергию прорастания семян, длину побегов и корней проростков, а также их массу на 18-30% [22, 23]. В наших исследованиях по стерилизации семян родиолы была показана эффективность 0,1% раствора сулемы при времени экспозиции не менее 30 мин.

Таким образом, выявлена различная специфика стерилизации различных эксплантов родиолы розовой: для стеблевых эксплантов эффективно использование 70% этанола и 0,1% сулемы (15 минут) для сохранения жизнеспособности стерильных культур. Богатые меристематическими тканями корневищные и стеблевые апексы нуждаются в более длительном экспонировании в 20% растворе хлорамина, жизнеспособность эксплантов составляет 67%. Для введения в культуру *in vitro* листовых эксплантов растений родиолы требуется многоступенчатый протокол с использованием нескольких стерилизующих агентов.

### **Выбор типа эксплантов родиолы розовой для культуры *in vitro***

Данный этап исследований также является критическим, поскольку должен обеспечить эффективный рост культуры тканей в условиях *in vitro*, потенциал органогенеза и даже генетическую стабильность микроклонов.

При выборе эксплантов ученые исследуют влияние различных факторов, таких как тканевая специфичность, возраст донорного растения, физиологический статус экспланта. Однако анализ научной литературы показывает, что наиболее распространен эмпирический подход при проведении экспериментов по выявлению факторов, инициирующих пролиферацию клеток в условиях *in vitro*. Для инициации роста культур родиолы розовой в условиях *in vitro* было использовано несколько типов эксплантов: верхушечные почки (10-12 мм), листовые узлы с двумя соседними листьями, сегменты ствольные (8-10 мм), корневище почки (10-12 мм), семядольные листья.

В данной серии экспериментов нами использовались несколько вариантов питательных сред, на основе среды Мурасиге и Скуга с добавлением экзогенных фитогормонов в различных концентрациях для индукции органогенеза *in vitro*. Реакция различных типов эксплантов родиолы зависела от типа и концентрации используемых фитогормонов. Образование каллусной ткани было инициировано только при использовании листовых эксплантов, при этом наиболее высокие показатели наблюдали при использовании 2,4-Д и бензиламинопурина-6 (таблица 1).

На стеблевых эксплантах при культивировании в присутствии НУК и зеатина отмечали индукцию каллусогенеза менее чем у 10% эксплантов, основная часть эксплантов была некротизирована. Наиболее эффективным является использование в качестве эксплантов апексов побегов и проростков, которые при культивировании на индукционных средах, содержащих цитокинины и ауксины в соотношении 10:1, активно пролиферировали с образованием почечных конгломератов (рис. 2).

**Таблица 1.** Выбор типа экспланта для микроклонального размножения родиолы розовой (через 30 дней культивирования)

**Table 1.** Select the type of explant for micropropagation of *Rhodiola rosea* (after 30 days of culture)

Тип экспланта Type of explant	Эффективная комбинация фитогормонов Effective combination of phytohormones	Частота новообразования, % The frequency of growths, %	Реакция эксплантов Reaction explants
Апексы стеблей и проростков Apexes of stems and seedlings	NAA–0,2 мг/л BAP – 2 мг/л	75-80%	Активация роста, удлинение междоузлий
	IAA–0,2 мг/л BAP – 2 мг/л	65-90%	Активация роста, формирование листовой розетки
Листья, семядольные экспланты Leaves, cotyledonary explants	2,4-D–0,5 мг/л BAP – 2 мг/л	10-30%	Индукция каллусов
Сегменты стеблей Segments of the stem	NAA–0,2 мг/л Зеатин – 2 мг/л	Менее 10%	Отсутствие роста, частичный некроз, индукция каллусогенеза у основания стебля
Корневищные почки Rhizomatous buds	NAA–0,2 мг/л Зеатин – 2 мг/л	25-30%	Активация роста почек
	IAA–0,2 мг/л Зеатин – 2 мг/л	30-40%	Индукция стеблеобразования

Аналогичные результаты получены и у других исследователей. Так, Ишмуратова М.М. экспериментально показала, что в качестве эксплантов родиолы могут быть использованы только семена и почки смешанного типа, поскольку использование только генеративных почек приводит к формированию измененных по габитусу ассимиляционных побегов и листьев [24].



**Рис.2.** Индукция адвентивного органогенеза из апексов родиолы розовой

**Fig.2.** The induction of adventitious organogenesis from the apices of *Rhodiola rosea*

По мнению [10], низкая активность пролиферации стеблевых сегментов не позволяет использовать их в качестве эксплантов при культивировании *in vitro*. В то же время апексы стеблей и листья вследствие высокой тотипотентности, достигающей 80% в присутствии зеатина, могут быть использованы для получения каллусных культур [21].

Наши эксперименты показали, что на апикальных эксплантах формирование конгломерата наблюдали и в отсутствии экзогенных регуляторов роста. Однако на безгормональной среде почечные конгломераты быстро теряли свою жизнеспособность, сформированные побеги были очень короткими, плотно расположенными. Побеги второго уровня не успевали сформировать достаточной длины стебель, часть вновь возникающих адвентивных почек была некротизирована вследствие нарушения гормональной регуляции процессов морфогенеза. На наш взгляд, именно повышенное содержание фитогормонов с цитокининовой активностью в сочетании с гибберелловой кислотой приводит к интенсивному адвентивному побегообразованию, хотя в ряде экспериментов показано, что повышенное содержание цитокининов, в частности ВАР (бензиламинопурина), приводит к формированию вытянутых ассимиляционных побегов с редуцированными листовыми пластинами [24].

#### **Микроклональное размножение родиолы розовой**

Наиболее успешные экспериментальные исследования по микроклональному размножению родиолы розовой дикого экотипа проведены в Болгарии, где была разработана целая система по получению каллусных культур, индукции органогенеза, микроклонирования и реинтродукции этого ценного растения в естественных местах обитания. Изучение различных типов эксплантов, индукционных сред и комбинаций фитогормонов показало, что апексы стеблей и проростков являются наиболее оптимальными эксплантами для микроклонального размножения [11, 25]. На эффективность микроклонирования родиолы оказывают влияние различные факторы, в т.ч. и время года. Так, максимальный коэффициент размножения наблюдали в мае-июне – 6,78, в холодное время года формировалось до 2,11 побегов на эксплант [12, 24]. Это были первые эксперименты с культивированием диких растений, и полученные регенеранты были успешно адаптированы к естественным высокогорным условиям обитания. Растения регенеранты родиолы розовой 2-3 года вегетации по данным фитохимического анализа содержали салидрозид, розавин, розацин и розарин, что подтверждает потенциал биотехнологических методов для сохранения и возобновления природных популяций лекарственных видов, находящихся под угрозой исчезновения [25, 26].

Однако большинство научных исследований показало, что доминирующую роль в регуляции процессов морфогенеза *in vitro* играют регуляторы роста. Как известно, биосинтез экзогенных фитогормонов зависит от тканевой принадлежности эксплантов: в апексах побегов образуются гормоны ауксинового ряда (ИУК), мезофильные ткани листьев являются донором ключевого продукта синтеза гиббереллинов – каурена, а также абсцизовой кислоты. В апексах корней синтезируется кинетин [22]. Учитывая этот факт, возможно подобрать оптимальную технологию клонирования определенных типов эксплантов. В наших исследованиях в качестве дополнительного источника цитокининов зеатин и БАП (бензиламинопурина) в сочетании с гибберелловой кислотой, которая также участвует в синтезе цитокининов [26, 27]. Максимальное количество адвентивных побегов (до 34 на эксплант) было зафиксировано при субкультивировании на среде MCZ1, содержащей 2 мг/л зеатина, 0,1 мг/л ИУК и 0,5 мг/л гибберелловой кислоты. На наш взгляд, именно двухэтапное культивирование эксплантов на среде с зеатином значительно повышает меристематическую активность почечных конгломератов, что позволяет увеличить рост побегов второго уровня и, тем самым, повысить коэффициент размножения (таблица 2, рисунок 2).

**Таблица 2.** Субкультивирование апикальных меристем родиолы розовой

**Table 2.** Subculturing of the apical meristem of *Rhodiola rosea*

Среда субкультивирования*	Количество меристем	Интенсивность органогенеза, %	Количество стеблей второго уровня, шт.	Длина стебля, см
Mediasubculture*	No. of meristems, pcs.	Intensity organogenesis, %	No. of shoots the second level, pcs.	Shootlength, cm
MCZ– MCZ1	34	88,3	20-34	0,5-4,5
MCZ–MCO	38	36,8	2-4	1,5-2,5
MCZ–MCIM	32	56,3	2-6	1,5-2,5
MCIM–MCIM-MCZ1	32	81,3	4-6	0,5-1,0
MCIM– MCO	32	37,5	2-6	2,0-5,5
MCO–MCO	36	66,7	10-18	0,5-2,5
MCO– MCZ–MCIM	26	24,3	4-8	0,5-2,5
MCO–MCZ1	24	41,7	2-4	1,5-2,2

\*Состав среды: MSZ1 –зеатин2 мг/л, IAA 0,1 мг/л, GA3 0,5 мг/л;  
MCO –GA3 0,5 мг/л; MCIM–BAР4 мг/л, IAA 0,1 мг/л



**Рис.2.** Индукция вторичного побегообразования и микроклональное размножение родиолы розовой

**Fig.2.** Induction of auxiliary shoot and shoot multiplication of *Rhodiola rosea*

В последующем регенерантные побеги длиной 2,5-4 см отсекались и помещались на среду для индукции ризогенеза, интенсивность которого зависела от комбинации регуляторов роста и плотности среды. Высокие значения формирования корневой системы у регенерантных побегов родиолы наблюдали при концентрации агара от 4 до 6%, однако морфометрические показатели регенерантов родиолы (количество и длина корней, длина побегов и количество междоузлий) были выше на средах, содержащих 0,6% агара.

После формирования корневой системы на безгормональной среде MC, содержащей половинную норму солей, регенеранты высаживались в сосуды с почвогрунтом для адаптации (рис. 3).



**Рис.3.** Адаптация растений родиолы розовой в сосудах с почвогрунтом

**Fig.3.** Adapting plant *Rhodiola rosea* in vessels with soils

Адаптационные характеристики регенерантов родиолы определялись прежде всего состоянием развития побегов и составом почвогрунта. Наиболее высокие показатели выживаемости наблюдали при использовании регенерантов, полученных из сегментов почечного конгломерата, которые в сравнении с одиночными регенерантными побегами обладали высокой регенеративной способностью, формируя адвентивные побеги второго порядка. Приживаемость растений регенерантов в почве в зависимости от состава почвогрунта была на уровне 30-70%.

Таким образом, нами были оптимизированы отдельные этапы культивирования *in vitro* родиолы розовой – стерилизация, культивирование и индукция органогенеза, а также адаптация регенерантов к культивированию в условиях почвогрунта. Разработанный протокол микроклонального размножения родиолы розовой казахстанских экотипов состоит из получения стерильных проростков на среде  $\frac{1}{2}$  МС, изоляции меристем у 14-дневных стерильных проростков, культивирование меристем на среде МС+2 мг/л зеатина и 0,2 мг/л ИУК в течение 6 недель, субкультивирование на аналогичной среде в течение 6 недель для увеличения коэффициента побегообразования, культивирование адвентивных регенерантных побегов на среде с половинной концентрацией минеральных солей и 0,6% агара, высадка корнесобственных регенерантов в почву.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вопросы сохранения биоразнообразия природной флоры становятся с каждым годом все более актуальными, это обуславливает необходимость разработки национальной стратегии сохранения и возобновления природных популяций лекарственных растений. Родиоларозовая или золотой корень являются ценным лекарственным растением, популяции которого значительно сокращаются вследствие неконтролируемых сборов населением. В этой связи для возобновления природных популяций важную роль играют методы биотехнологии, в частности, микроклональное размножение, позволяющие размножить *invitro* растительный материал и наработать основу для создания промышленных плантаций *exsitu* этого ценного лекарственного растения, находящегося под угрозой исчезновения. Полученные растения-регенеранты *invitro* можно использовать как исходный материал для интродукции и реинтродукции. Разработка технологии микроклонального размножения родиолы розовой с перспективой дальнейшей реинтродукции позволит сохранить генетическое разнообразие вида.

## Финансирование

Исследования выполнены при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан по проекту «Разработка технологии микроклонального размножения родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.) с целью получения сырья для создания лекарственных препаратов», выполняемому в рамках НТП «Промышленные биотехнологии» на 2014-2016 гг.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Охрана окружающей среды и устойчивое развитие Казахстана // Статистический сборник / Агентство по статистике РК.– Астана, 2008. – 269 с.
2. Krajewska-Patan A. Chemical investigation of sphenol glycosides formed *Rhodiola rosea* callus tissue // *Herbapolonica*. – 2007. – Vol. 53. – P. 77-87.



3. Canter P.H., Thomas H., Ernst E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology // Trends in biotechnology. – 2005. – Vol. 23, №4. – P.180-185.
4. Reed B., Sarasan M., Kane V. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools // In vitro cell developmental biology plant. – 2011. – №47. – P. 1-4.
5. Tripathi L., Tripathi J.N. Role of biotechnology in medicinal plants // Tropical journal of pharmaceutical research. – 2003. – Vol. 2, №2. – P.243-253.
6. Edison S., Unnikrishnan M., Vimala B., Santha V. Biodiversity of tropical tuber crops in India // NBA Scientific Bulletin. – 2006. – №7. – P.60.
7. Grech-Baran M., Sykłowska-Baranek K., Pietrosiuk A. Biotechnological approaches to enhance salidroside, rosin and its derivatives production in selected *Rhodiola* spp. in vitro cultures // Phytochemistry reviews. – 2015. – №14. – P. 657-674.
8. Kirichenko E.V., Rudenko S.S., Baglaj B.M., Masikevich U.G. Leaf culture from *in vitro* propagated *Rhodiolarosea* // Bulletin GBS. – 1994. – №169. – P. 50-54.
9. Hai-jun L., Bin G., Qiong Y., Yu-jun L., Chun-Zhao L. Tissue culture of four *Rhodiola* species // Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica. – 2006. – P. 207-210.
10. Tasheva K., Kosturkova G. Bulgarian golden root *in vitro* cultures for micropropagation and reintroduction // Central European Journal of Biology. – 2010. – Vol. 5, №6. – P. 853-863.
11. Tasheva K., Kosturkova G. Establishment of callus cultures of *Rhodiolarosea* Bulgarian ecotype // Acta Horticulture. – 2012. – Vol. 955. – P.129-136.
12. Ishmuratova M.M. Clonal micropropagation of *Rhodiolarosea* L. and *R. iremelica* Boriss. *in vitro* // Plant resources. – 1998. – Vol. 34. – P. 12-23.
13. Martin J. *In vitro* culture establishment of *Schizandrachinensis* (turz.) Baill. and *Rhodiolarosea* L., two adaptogenic compounds producing plants // Journal of Phytology. – 2010. – №2 (11). – P. 80-87.
14. Yin W.B., Li W., Du G.S., Huang Q.N. Studies on tissue culture of Tibetan *Rhodiolarosea* // Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica. – 2004. – Vol. 24. – P. 1506-1510.
15. Иващенко А.А., Котухов Ю.А. О редких видах лекарственных растений Западно-Алтайского заповедника // Ботаническое ресурсосведение: достижения и перспективы развития. – 2000. – С. 27-28.
16. Котухов Ю.А., Иващенко А.А., Лайман Дж. Флора сосудистых растений Западно-Алтайского заповедника. – Алматы: Tethys, 2002. – 108 с.
17. Айдарбаева Д.К., Кузьмин Э.В., Гемеджиева Н.Г. Ресурсное многообразие лекарственной флоры хребта Южный Алтай // Матер. науч. конф. «Проблемы обеспечения биологической безопасности Казахстана». – Алматы, 2008. – С. 82-85.
18. Флора Казахстана. – Алма-Ата: АН ССР, 1958-1966. – Т. 1-9.
19. Флора Сибири. – Новосибирск: Наука, 1990. – Т. 1-14.
20. Sarasan V., Kite G., Sileshi C. Applications of phytochemical and *in vitro* techniques for reducing over-harvesting of medicinal and pesticidal plants and generating income for the rural poor // Plant Cell Report. – 2011. – №30. – P. 1163-1172.
21. Liu H.J., Xu Y., Liu Y.J., Liu C.Z. Plant regeneration from leaf explants of *Rhodiola fastigiata*. *In vitro* cellular and developmental biology // Plant. – 2004. – Vol. 42. – P. 345-347.
22. Романов Г.А., Медведев С.С. Ауксины и цитокинины в развитии растений. Последние достижения в исследовании фитогормонов // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, №2. – С.309-319.
23. Глехусеж М.А., Тюхтенёва З.И., Ненько Н.И. Активаторы прорастания семян озимой пшеницы на основе амидов полизамещённой аминокислоты // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №1. – С. 6-13.
24. Ишмуратова М.М. Биологические и химические особенности, культура тканей *Rhodiolarosea* L. и *Rhodiola iremelica* и возможности их интродукции в Башкортостан (на примере г. Уфы): дис. ... канд. биол. наук: 03.00.05. – Уфа, 1996. – 168 с.
25. Tasheva K., Kosturkova G. The role of biotechnology for conservation and biologically active substances production of *Rhodiolarosea*: endangered medicinal species // The Scientific World Journal. – 2012. – Vol. 3. – 13 p.
26. György Z., Tolonen A., Pakonen M. et al. Enhancing the production of cinnamyl glycosides in compact callus aggregate cultures of *Rhodiolarosea* by biotransformation of cinnamyl alcohol // Plant Science. – 2004. – Vol. 166, №1. – P. 229-236.
27. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

## REFERENCES

1. OhranaokruzhajushhejsredyijustojchivoerazvitieKazahstana/Statisticheskijsbornik [Environmental protection and sustainable development in Kazakhstan / Statistical Yearbook. Agency of Statistics of RK]. Agentstvo o statistike RK, Astana, 2008, 269 p.
2. Krajewska-Patan A. Chemical investigations of biotransformed *Rhodiolarosea* callus tissue. *Herbapolonica*, 2007, vol. 53, pp. 77-87.

3. Canter P.H., Thomas H., Ernst E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 2005, vol. 23, no. 4, pp.180-185. DOI:10.1016/j.tibtech.2005.02.002.
4. Reed B., Sarasan M., Kane V. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In vitro cell developmental biology plant*, 2011, no. 47, pp. 1-4. DOI:10.1007/s11627-010-9337-0.
5. Tripathi L., Tripathi J.N. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 2003, vol. 2, no. 2, pp.243-253.
6. Edison S., Unnikrishnan M., Vimala B., Santha V. Biodiversity of tropical tuber crops in India. *NBA Scientific Bulletin*, 2006, no. 7, p.60.
7. Grech-Baran M., Sykłowska-Baranek K., Pietrosiuk A. Biotechnological approaches to enhance salidroside, rosin and its derivatives production in selected *Rhodiola* spp. in vitro cultures. *Phytochemistry reviews*, 2015, no. 14, pp. 657-674. DOI:10.1007/s11101-014-9368-y.
8. Kirichenko E.V., Rudenko S.S., Baglaj B.M., Masikevich U.G. Leaf culture from *in vitro* propagated *Rhodiolarosea*. *Bulletin GBS*, 1994, no. 169, pp. 50-54.
9. Hai-jun L., Bin G., Qiong Y. et al. Tissue culture of four *Rhodiola* species. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, pp. 207-210.
10. Tasheva K., Kosturkova G. Bulgarian golden root in vitro cultures for micropropagation and reintroduction. *Central European Journal of Biology*, 2010, vol. 5, no. 6, pp. 853-863. DOI:10.2478/s11535-010-0092-3.
11. Tasheva K., Kosturkova G. Establishment of callus cultures of *Rhodiolarosea* Bulgarian ecotype. *Acta Horticulture*, 2012, vol. 955, pp.129-136. DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.955.17.
12. Ishmuratova M.M. Clonal micropropagation of *Rhodiolarosea L.* and *R. iremelica Boriss.* *in vitro*. *Plant resources*, 1998, vol. 34, pp. 12-23.
13. Martin J. *In vitro* culture establishment of *Schizandrachinensis (turz.) Baill.* and *Rhodiolarosea L.*, two adaptogenic compounds producing plants. *Journal of Phytology*, 2010, no. 2 (11), pp. 80-87.
14. Yin W.B., Li W., Du G.S., Huang Q.N. Studies on tissue culture of Tibetan *Rhodiolarosea*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2004, vol. 24, pp. 1506-1510.
15. Ivashhenko A.A., Kotuhov Ju.A. O redkih vidah lekarstvennyh rastenij Zapadno-Altajskogo zapovednika // Botanichesko resursovedenie: dostizhenija i perspektivy razvitiya [Rare species of medicinal plants of the West Altay reserve/ *Botanical Resources study: achievements and prospects*], 2000, pp. 27-28.
16. Kotuhov Ju.A., Ivashhenko A.A., Lajman Dz. *Flora sosudistyh rastenij Zapadno-Altajskogo zapovednika* [Flora of vascular plants of the West Altay reserve]. Almaty: Tethys, 2002, 108 p.
17. Ajdarbaeva D.K., Kuz'min Je.V., Gemedzhieva N.G. Resursno mnogobrazie lekarstvennoj flory hrebta Juzhnyj Altaj [Resource diversity of medicinal flora mountain range Southern Altai] // *Mater. nauch. konf. "Problemy obespechenija biologicheskoy bezopasnosti Kazahstana"* [Proc. conf. "Problems of maintenance of biological safety in Kazakhstan"]. Almaty, 2008, pp. 82-85.
18. *Flora Kazahstana* [Flora of Kazakhstan]. Alma-Ata, AN SSR, 1958-1966, vol. 1-9.
19. *Flora Sibiri* [Flora Siberia]. Novosibirsk, Nauka, 1990, vol. 1-14.
20. Sarasan V., Kite G., Sileshi C. Applications of phytochemical and in vitro techniques for reducing over-harvesting of medicinal and pesticidal plants and generating income for the rural poor. *Plant Cell Report*, 2011, no. 30, pp. 1163-1172. DOI:10.1007/s00299-011-1047-5.
21. Liu H.J., Xu Y., Liu Y.J., Liu C.Z. Plant regeneration from leaf explants of *Rhodiola fastigiata*. *In vitro cellular and developmental biology. Plant*, 2004, vol. 42, pp. 345-347. DOI:10.1079/IVP2006773.
22. Romanov G.A., Medvedev S.S. Auksin i citokininy v razviti rastenij. Poslednie dostizhenija v issledovanii fitogormonov. [Auxins and cytokinins in plant development. Recent advances in the study of plant hormones]. *Fiziologija rastenij*, 2006, vol. 53, no. 2, pp. 309-319.
23. Tlehusezh M.A., Tjuhten'jova Z.I., Nen'ko N.I. Aktivatory prorastanija semjan ozimogo pshenicya osnove amido-polizameshchjonnogo aminomasljanojkisloty [Activators of germination of winter wheat seeds based on amide of a poly-substituted aminobutyric acid]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*, 2015, no. 1, pp. 6-13.
24. Ishmuratova M.M. *Biologicheskie i khimicheskie osobennosti, kulturatkaney Rhodiolarosea L. i Rhodiola iremelica Boriss. ivozmozhnosti ih intriduktsii v Bashkortostan (naprimere g. Ufa)*. [Biological and chemical characteristics, tissue culture *Rhodiolarosea L.* and *Rhodiola iremelica* and the possibility of their introduction into the Bashkortostan (for example, the city of Ufa). Kand. biol. sci. diss.]. Dis. cand. biol. nauk. Ufa, 1996, 20 p.
25. Tasheva K., Kosturkova G. The role of biotechnology for conservation and biologically active substances production of *Rhodiolarosea*: endangered medicinal species. *The Scientific World Journal*, 2012, vol. 3, 13 p. DOI: 10.1100/2012/274942.
26. György Z., Tolonen A., Pakonen M. et al. Enhancing the production of cinnamyl glycosides in compact callus aggregate cultures of *Rhodiolarosea* by biotransformation of cinnamyl alcohol. *Plant Science*, 2004, vol. 166, no. 1, pp. 229-236. DOI: 10.1016/j.plantsci.2003.09.011.
27. Butenko R.G. *Biologija i tekhnologija razvitiya in vitro i biotekhnologija in vivo* [Biology of cells of higher plants in vitro and Biotechnology based on their]. M., FBK-PRESS, 1999, 160 p.

## **IN VITRO ҚЫЗҒЫЛТ СЕМІЗОТТЫҢ КУЛЬТУРАСЫ (RHODIOLA ROSEA L.)**

**Хапилина О.Н., Купешев Ж.С., Данилова А.Н., Календарь Р.Н.**

*Ұлттық биотехнология орталығы*

*Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана, 010000, Қазақстан*

### **ТҮЙІН**

Мақалада қызғылт семізотты (*Rhodiola rosea L.*) *in vitro* культурасына енгізу жөнінен зерттеу жұмыстары көрсетілген. Зерттеу нысаны ретінде қазақстандық Алтай аумағында табиғи жағдайда өсетін қызғылт семізоттың өсімдіктері пайдаланылды. Зерттеу жұмыстарын орындау барысында *in vitro* культурасына құнды дәрілік өсімдік - қызғылт семізотты енгізу жөнінен тәжірибелер жүргізілді. Семізоттың әртүрлі экспланттар үлгілерін зарасыздандырудың тиімді хаттамалары анықталды. Семізоттың асептикалық культураларын алу үшін антисептиктердің әртүрлі типтерін пайдалану арқылы зарасыздандырудың көп кезеңді хаттамаларын пайдалану қажет екендігі анықталды. Зерттеу нәтижесінде экспланттардың ең тиімді типтері өркендер апексі мен семізоттың тамырсабақтық бүршіктері болатыны көрсетілді. Экзогенді цитокининдердің жоғарғы концентрациялары кезінде адвентивті өркендердің индукциясы болады. Адвентивті өркендердің неғұрлым көп саны құрамында 2 мг/л зеатин, 0,1 мг/л ИСК және 0,5 мг/л гибберелл қышқылы бар MCZ1 ортасына субкультивтендіру кезінде (эксплантқа 34 -ке дейін) болды. Регенеранттардың тамыр түзу қабілеттілігі қоректік ортадаға ағардың концентрациясына байланысты. Қоректік ортада 0,6% ағар болған кезде семізот регенеранттарының морфометрикалық сипаттамалары ең жоғары болды.

Негізгі сөздер: алтын тамыр, қызғылт семізот, *Rhodiola roseaL.*, *in vitro* культурасы, экспланттар, адвентивті органогенез, микроклональды көбею