

IN VITRO КУЛЬТУРАСЫНА МАРАЛ ТАМЫРЫН (*RHAPONTICUM CARTHAMOIDES*) ЕНГІЗУРайзер О. *^{id}, Тагиманова Д. ^{id}, Нагметова Г. ^{id}, Хапилина О. ^{id}

Ұлттық биотехнология орталығы, Қорғалжын тас жолы 13/5, Астана, 010000, Қазақстан

* Correspondence: 2008olesya@mail.ru

ТҮЙІН

Мақалада қазақстандық Алтай аумағында өсетін бағалы дәрілік өсімдік марал тамырын (*Rhaponticum carthamoides*) *in vitro* культураны енгізу жөніндегі зерттеулердің нәтижелері келтірілген. Сафлор тәрізді левзея немесе марал тамыры әртүрлі биологиялық белсенді қосылыстардың (флавоноидтар, полисахаридтер, сапониндер, куманиндер) көзі болып табылады. Бұл түр гепатопротекторлық және гипогликемиялық әсерге ие, адаптоген ретінде әрекет ететін экидистероидтардың өте жоғары мөлшерін өндіруші ретінде ерекше құндылыққа ие. Қазіргі уақытта бұл түрдің табиғи қорлары сұраныстың артуына байланысты күрт азайып келеді және соның салдарынан табиғи популяциялардың сарқылуына әкеледі. Заманауи биотехнологиялық әдістер ауыл шаруашылығының, медицинаның және тамақ өнеркәсібінің қажеттіліктерін қанағаттандыратын жемдік және дәрілік дақылдардың ассортиментін кеңейту және интродукциялау үшін марал тамырын көбейту мен сақтаудың жоғары тиімді тәсілдерін әзірлеуге мүмкіндік береді.

Зерттеу материалы ретінде табиғи өсетін жерлерден жиналған тұқымдар пайдаланылды. Тұқымдарды зарарсыздандыру протоколы әзірленді, асептикалық көшеттерді алу үшін әртүрлі зарарсыздандыру агенттерін қолдана отырып, көп сатылы зарарсыздандыру протоколын қолдану қажет екендігі анықталды. Зарарсыздандырылған тұқымдар гормоналды құрамы әртүрлі ½ минералды тұздары бар МС және МС орталарына отырғызылды. Нәтижелер тұқымның өну пайызы қоректік ортаның гормоналды күйіне байланысты 42,9-дан 85,5% - ке дейін өзгеретінін көрсетті. Сонымен, өнудің ең аз пайызы В0 (½ МС) қоректік орта нұсқасында - 42,9% болды. Өнудің ең жоғары пайызы тұқымда В3 қоректік орта нұсқасында (МС+3мг/л БАП+3МГ/л кинетин) -85,5% болды.

Кілтті сөздер: *Rhaponticum carthamoides*, дәрілік өсімдіктер, *in vitro*, фитогормондар, зарарсыздандыру, эксплант, микрокөбейту.

КІРІСПЕ

Марал тамыры (*Rhaponticum carthamoides*) - экидистероидтардың ультра жоғары деңгейлерін синтездеу қабілеті және айтарлықтай өнімділігі бар әлемдік флораның маңызды ірі шөпті түрі. Қазақстанда дақыл тек Батыс және Шығыс Алтайдың таулы аймақтарында субальпілік және альпілік шалғындардың құрамында өседі [1, 2].

Қазіргі уақытта табиғи өсімдік ресурстары өнеркәсіп, ауыл шаруашылығы және медицина үшін көптеген шикізат береді. Алайда, жыл сайын бұл шикізат азайып келеді. Өйткені шөптің ботаникалық құрамы кедейленіп, қоршаған ортаның абиотикалық және биотикалық факторларының тұрақсыздығына байланысты жемшөптік құнды түрлер жойылуда [3].

Негізгі міндеттердің бірі - жойылып кету қаупі төнген өсімдіктердің сирек түрлерін сақтау, әсіресе бұл элементтік-экономикалық маңызы бар өсімдіктерге қатысты. Бұған, ең алдымен, дәрілік шикізат үшін қарқынды түрде ұшырайтын дәрілік өсімдіктер жатады, бұл олардың санының азаюына және популяциялардың толық жойылуына әкеледі [4, 5].

Дәрілік және ресурстық маңыздылығына байланысты *R. carthamoides* Қазақстанның Қызыл кітабына енгізілді [6]. Бұл түр адаптогендер ретінде әрекет ететін гепатопротекторлық және гипогликемиялық әсері бар [7, 8] экидистероидтардың өте жоғары мөлшерін өндіруші ретінде ерекше құнды [9]. Фитоэкидистероидтардың допинг агенттері және диабетке қарсы әсер ететін препараттар ретіндегі анаболикалық қасиеттері де белгілі [10, 11]. Алайда, соңғы жылдардағы зерттеулер көрсеткендей, оның жемдік қасиеттері де аз емес. *R. carthamoides* - құнды ақуыз

дақылы: ақуыздардың мөлшері – 27-31%, оның ішінде маңызды аминқышқылдары - 14-16% дейін (лизин – 16.5 мг / г; треонин-10.8 мг/г; лейцин-19.3 мг/г; изолейцин – 9.5 мг / г; фенилаланин-11.5 мг / г; гистидин – 4.5 мг/г; тирозин – 12.5 мг / г; валин-13.9 мг/ г; аргинин-11.0 мг/г). Ол су-алкоголь сығындылары, тұнбалар мен қайнатпалар, пермикстер және комбикорм құрамында қолданылады [12, 13]. Жайылымдарда марал тамырын ірі қара, қой, жылқы және жабайы жануарларлар жақсы жейді. Жасыл масса силос, сенаж, шөп ұнын дайындау үшін жақсы шикізат болып табылады, ол жануарлардың барлық түрлеріне биологиялық белсенді зат ретінде қолданылады [14,15]. Бүршіктену кезеңінде-гүлденудің басталу кезеңінде ондағы ақуыздың мөлшері бұршақ тұқымдас шөптермен бірдей, ал молибденнен басқа микроэлементтердің мөлшері жануарларға деген қажеттіліктен асып түседі. Оның ақуыздарында 17 аминқышқылы бар, әсіресе лизин, аргинин, гистидин және триптофан көп [16]. *R. carthamoides* -ті дәрілік шикізат көзі ретінде кеңінен қолдану экологиялық-климаттық жағдайлары осы түрдің табиғи өсу орындарынан ерекшеленетін аймақтарда дәстүрлі әдістерді қолдану арқылы оны тарату қиындығымен шектелген.

Тұқымның көбею тиімділігін анықтау кезінде өсімдіктердің дамуы өте баяу жүретіні анықталды, нәтижесінде марал тамырының вегетативті көбеюі плантацияларды құрудың мүмкін әдістерінің бірі болып табылады [3].

Дәрілік өсімдіктердің тұрақты, жыл сайын жаңартылатын шикізат базасын құру үшін табиғи өсетін жерлерде түрлердің биоәртүрлілігін сақтауға, сондай-ақ жаңа өңірлерге табысты енгізуге бағытталған кешенді зерттеулер жүргізу қажет.

Қазіргі уақытта *in vitro* биотехнологиялық әдістер

қиын өсетін өсімдіктердің көбею мәселесін шешуге, сондай-ақ осы түрді аймақ жағдайына қысқа мерзімде енгізу үшін отырғызу материалын жасауға мүмкіндік береді. Жасуша мен ұлпа культурасы әдістерін қолдану көбеюі қиын түрлердің көбеюі үшін де, ботаникалық бақтар мен жергілікті өсу орындарының коллекцияларынан бағалы өсімдік генотиптерін жаппай өндіру үшін де оңтайлы болып табылады. Биотехнологиялық тәсіл өсімдік түрлерін сақтаудың дәстүрлі әдістеріне қарағанда бірқатар артықшылықтарға ие: аналық және өсіп жатқан өсімдіктер алып жатқан үлкен аумақтардың қажеті жоқ, отырғызуға үнемі күтім жасау, өсімдік аурулары және соның салдарынан материалдың жоғалуы алынып тасталынады [17].

In vitro культурасына енгізу, құнды өсімдіктердің жасушалық культурасын зерттеу және алу табиғи өсу орындарына зиян келтірместен жабайы флора өкілдерінің ге-

нетикалық әлеуетін пайдаланудың жаңа мүмкіндіктерін береді [18].

МАТЕРИАЛДАР МЕН ӘДІСТЕР

Зерттеу нысаны ретінде Қазақстандық Алтай аумағындағы Проходной белок жотасының солтүстік-шығыс көлбеуіндегі табиғи өсу жерлерінен жиналған *Rhaponticum carthamoides* тұқымдары пайдаланылды. Популяция 1710 м.т.д.ж. биіктікте орналасқан (сурет 1).

Тұқымдар бөгде қоспалардан тазартылып, содан кейін сабын ерітіндісімен өңделіп, 20 минут бойы ағынды судың астында жуылды. Әртүрлі антисептиктерді - этанол, натрий гипохлориті, сынап (сулем) хлориді, калий перманганаты, сутегі асқын тотығының әртүрлі концентрациясы мен экспозиция уақытын қолдану арқылы экспланттарды зарарсыздандыруды жүргізді. Жалпы 6 за-



Сурет 1 – Табиғи өсетін жерлерінен *Rhaponticum carthamoides* тұқымын жинау

Кесте 1 - *R.carthamoides* тұқымдарын зарарсыздандыру сұлбасы

№	Зарарсыздандыру агенті (%) мен экспозиция уақыты (мин)				
	Этанол 70%	Калия перманганаты 0,1%	Сынап хлориді 0,1%	Сутегінің асқын тотығы 3%	Натрий гипохлориді 10%
1	1	-	20	-	-
2	1	-	-	10	-
3	1	20	-	-	-
4	1	-	-	-	20
5	1	-	10	-	10
6	1	20	20	-	10

Кесте 2 – *R. carthamoides* тұқымының өміршеңдігін анықтауға арналған қоректік ортаның құрамы

Орта нұсқасы	Минералды құрам	Өсу реттегіші/концентрация				Сахароза концентрациясы, г/л
		БАП, мг/л	Кинетин, мг/л	ИСК, мг/л	GA3, мг/л	
B0	½ МС	-	-	-	-	30
B1	½ МС	-	-	1,0	10,0	30
B2	МС	-	-	-	-	30
B3	МС	3,0	3,0	-	-	30
B4	МС	2,0	-	2,0	-	30

рарсыздандыру сұлбасы қолданылды (кесте 1).

Әрбір дезинфекциялаушы заттан кейін тұқымдар зарарсыз сумен жуылды.

Өміршеңдігін зерттеу мақсатымен *Rhaponticum carthamoides* тұқымдарын әртүрлі өсу реттегіштері қосылған Мурасиге мен Скуг (МС) минералды құрамы бар орта және оның жартылай құрамы (½ МС) бар қоректік ортаға орналастырылды (кесте 2).

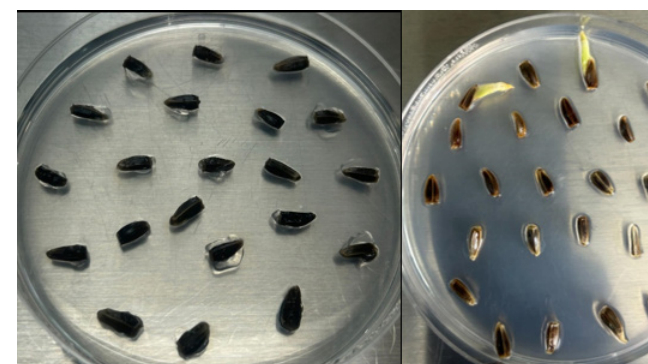
Тұқымның өнуі үшін Петри шыны табақшалары климаттық камераға 26°C температурада орналастырылды, жарығы – 3000 люкс, 16 сағаттық фотопериод.

ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ

Жұмыстың бірінші кезеңінде өсімдік материалы асептикалық өңдеуден өткізілді. *In vitro* жағдайында *R. carthamoides* зарарсыз өміршең көшеттерін алу мүмкіндігі тұқым биологиясының (тығыз тұқым қабығы) ерекшелігіне байланысты қиын, сондықтан зарарсыздандыру әдісін оңтайландыру қажеттілігі *in vitro* культурасына енгізудің маңызды кезеңі болып табылады.

Бұл мәселені шешу үшін марал тамырының тұқымдарын зарарсыздандыру кезеңін оңтайландыру бойынша зерттеулер жүргізілді. Зерттеу барысында 6 зарарсыздандыру сұлбасы әзірленді. Зерттеуде қолданылған зарарсыздандырығыш тұқымның өміршеңдігіне және көшеттердің кейінгі дамуына әртүрлі әсер етті. Зарарсыздандырылған тұқымдар гормоналды құрамы әртүрлі МС және минералды тұздардың жартылай құрамы бар ½ МС қоректік орталарына отырғызылып, 25°C, 16-сағаттық жарықтандыру жағдайында өсірілді [19].

Көп жағдайда цитокининдер тұқымның өнуі үшін пайдаланылатын қоректік ортаға қосылады, олар жасушалық созылу және митоздар санының көбеюі арқылы көшеттердің өсуін ынталандырады, ауксиндердің тікелей қатысуымен жасуша қабырғаларының құрылымы босатылады және вакуоль көлемінің ұлғаюынан кейін олардың пластикалық созылуы жүреді [20]. Кейбір микроорганизмдер баяу өсетіндіктен, бірнеше апта ішінде пайда болмауы мүмкін, сондықтан зарарсыздандыру тиімділігі 25 күннен кейін бағаланды. Өсірудің осы кезеңінен кейін жаңадан инфицирленген көшеттердің пайда болуы байқалмады, бұл инфекцияның жасырын түрлерінің жоқтығын көрсетті және зарарсыздандыру протоколының тиімділігін бағалауға мүмкіндік берді (сурет 2).



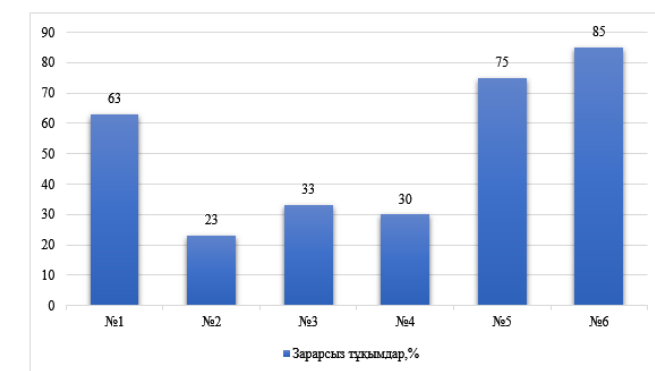
Сурет 2 - *In vitro* жағдайында *Rhaponticum carthamoides* тұқымдарын зарарсыздандырудың протоколын әзірлеу

Ең тиімді зарарсыздандыру режимін таңдау критерийлері жұқтырған экспланттардың саны (%) және тірі қалған көшеттердің саны (%) болып есептелді. Зерттеу нәтижелері контаминация деңгейі қолданылатын антисептиктердің түріне, олардың әсер ету уақытына, сондай-ақ зарарсыздандырығыштардың бірлескен әсеріне байланысты екенін көрсетеді.

Зарарсыздандыру агенттері дезинфекциялық әсер ету дәрежесі бойынша шартты түрде күшті, орташа және әлсіз дезинфекциялық әсері бар заттарға бөлінеді. Біз таңдаған натрий гипохлориді мен сутегінің асқын тотығы орташа және әлсіз дезинфекциялық әсері бар қосылыстарға жатады. Сынап хлориді мен калий перманганаты күшті әсер ететін қосылыстар қатарында [21]. Біздің мақсатымыз тұқымдарды зақымдамайтын, олардың өнгіштігін тежемейтін, сондай-ақ максималды зарарсыздандыруды қамтамасыз ететін зарарсыздандыратын агенттердің концентрациясы мен экспозиция уақытын таңдау болды.

70% этанол мен 10% натрий гипохлоридінің ерітіндісін қолдану (№4 сұлба) жеткіліксіз болып шықты, өсірудің 3-5 күні экспланттар патогендік микрофлорамен зақымдалған болатын. Төмен концентрацияда 3% сутегінің асқын тотығын, сондай-ақ 0,1% калий перманганатын (№2, №3 сұлба) пайдалану тиімсіз болды, өйткені микрофлораға зарарсыздандырығыш зат тиісінше әсер етпеді, осы нұсқалардағы барлық тұқымдар патогендермен ластанған. №1 және №5 зарарсыздандыру сұлбасын пайдаланған кезде, зарарсыз тұқымдардың пайызы жоғарыда сипатталған сұлбалармен салыстырғанда көбірек (63%, 75%) болды, бұл күшті әсер ететін зарарсыздандыру агенттерін қолданумен байланысты болуы мүмкін.

6 зарарсыздандыру сұлбасы жеңіл салмақты тұқымдардан арылу үшін зарарсыз дистилденген суда екі күн бойы бұқтыру мен 0,1% калий перманганатының ерітіндісінде алдын-ала зарарсыздандыру қосымша кезеңін қамтыды. Ал зарарсыздандыру кезеңінің өзі кезекпен 10% натрий гипохлориді ерітіндісінде және 0,1% сынап хлориді ерітіндісінде тұқымдарды өңдеуден тұрды. Нәтижесінде экспланттардың 85% зарарсыздығына қол жеткізілді. Саңырауқұлақ/бактериялық инфекцияның пайда болуынсыз көшеттердің өнуі сәтті зарарсыздандырудың белгісі болып табылады (сурет 3).

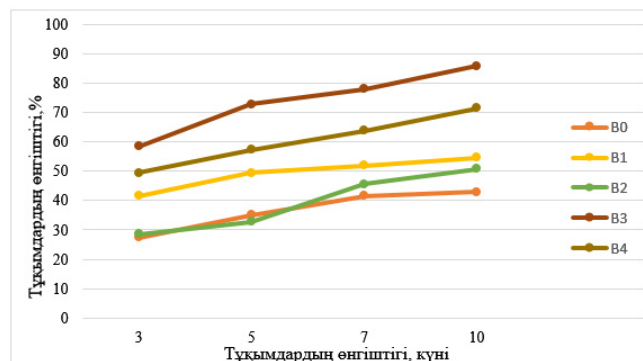


Сурет 3 - *R. carthamoides* тұқымын зарарсыздандырудың оңтайлы сұлбасын таңдау

R.carthamoides тұқымының өне бастау белгілері өсірудің 3-5 күнінен кейін пайда бола бастады, тұқымның өміршеңдігі зарарсыздандыру схемасына да, қоректік ортаның

гормоналды құрамына да байланысты болды. Зерттеулер көрсеткендей, ісіну кезеңінде тұқымда фитогормондардың қажетті балансы болмайды, олардың қажетті концентрациясы өну процесі басталғаннан кейін ғана белгіленеді. Осыған байланысты экзогендік фитогормондар құрғақ тұқымдарға қарағанда ісінген тұқымдардың өнуін айтарлықтай арттырады [22, 23].

Осу реттегіштерінің тұқымның өміршеңдігіне әсер ету нәтижелері 4 суретте көрсетілген.



Сурет 4 - Қоректік ортаның фитогормоналды құрамына байланысты *R. carthamoides* тұқымдарының өміршеңдігі

Зерттеу нәтижелері тұқымның өну пайызы қоршаған ортаның гормоналды жағдайына байланысты өзгеріп, 42,9-85,5% аралығында екенін көрсетті. Осылайша, ең төменгі өну пайызы B0 қоректік орта нұсқасында (½ MS) - 42,9% болды. Ең жоғары өну пайызы B3 орта нұсқасындағы тұқымдарда болды (MS + 3 мг/л ВАР + 3 мг/л кинетин), бұл нұсқада 3-ші күнде өну пайызы 58,5% құрады. Өсіру мерзімі ұлғайған сайын тұқымның өнгіштігі де жоғарылады. Қоректік ортаның барлық нұсқаларында өсірудің 10-шы күні бұл мән максималды болды.

B4 нұсқасында MS қоректік орта құрамына 2,0 мг/л концентрацияда ИСК қосқанда және ВАР концентрациясын 2,0 мг/л дейін төмендеткенде тұқымның өміршеңдігі 71,5% құрады, бұл да *R. carthamoides* тұқымы өнуінің оңтайлы нұсқасы болып табылады. MS және ½ MS бақылау нұсқаларында ең төмен нәтижелер алынды. Қоректік ортаның барлық нұсқаларында әр түрлі фитогормондарды бір-бірімен сәйкестендіру *R. carthamoides* өскіндерінің морфологиялық сипаттамаларына (өсу мен даму)



1-эмбриональды тамырдың пайда болуы; 2 - гипокотильдің жарып шығуы;

3 - гипокотильдің ұзаруы және тұқымжарнақ жапырақтарын сыртқа шығуы; 4 - тұқымжарнақ жапырақтарының ашылуы; 5 - шынайы жапырақтардың бірінші жұбының пайда болуы

Сурет 5 - *R. carthamoides* тұқымының өну биологиясы

әсер еткен жок. Тұқымның тарылған жерінде ақ эмбриональды тамырдың пайда болуымен өну процесі басталды. Содан кейін тамыр қалпақшасы жақсы көрінген ақ түсті гипокотильдің бөлінуі байқалды. Осыдан кейін бір-біріне бүктелген тұқымжарнақ жапырақтары жарылып, ал ашық жасыл гипокотиль сәл ұзарады. Жапырақтары эллипс тәрізді, жасыл, тегіс. Одан кейін тұқымжарнақ жапырақтарының ашылуы болды. Гипокотильдің түсі жасылдан қызылға дейін өзгерді, тамыры да қызғылт реңкке ие болды (сурет 5).

ТАЛҚЫЛАУ

Сирек кездесетін *Rhaponticum carthamoides* (сафлор тәрізді рапонтикум, марал тамыры) халықтық және ғылыми медицинада үлкен сұранысқа ие. Шикізатты үлкен көлемде қарқынды және реттелмейтін түрде жинау нәтижесінде олардың қорлары таусылуда, сондықтан биоәртүрлілікті ұтымды пайдалану және сақтау мәселесі өте өзекті мәселе. *In vitro* культураны енгізу, құнды өсімдіктерді зерттеу және сақтау жабайы флора өкілдерінің генетикалық әлеуетін пайдаланудың жаңа мүмкіндіктерін ұсынады және ол табиғи өсі орындары бұзылуы мен фитосеноздардың жойылуына жол бермейді.

R. carthamoides in vitro культураны енгізу шикізат базасын кеңейтуге мүмкіндік береді және сирек кездесетін, ресурстық өсімдік түрлерін сақтау үшін өзекті мәселесі болып табылады.

In vitro культураны енгізудің сәтті өтуі көбінесе бастапқы материалды зарарсыздандыру тиімділігімен анықталады. Зарарсыздандыру режимі саңырауқұлақтар мен бактериялардың спораларымен ластанбаған экспланттардың жоғары пайызын алу үшін әр нысанға жеке-жеке таңдалады.

Дезинфекциялаушы зат пен экспозиция уақытын таңдау зарарсыздандырылатын материалдың сезімталдығына байланысты. Өсімдік шикізатын зарарсыздандыру үшін химиялық реагенттердің кең спектрі жеке-жеке, сонымен бірге бір-бірімен үйлестіріліп қолданылады.

Сонымен қатар, зарарсыздандыру агентін таңдаудың негізгі мәселесі экспланттарды одан әрі өсу мен даму қабілетін жоғалтпай зарарсыздандыру болып табылады. Экспланттардың өзіне зиян келтірмейтін және максималды зарарсыздандыруды қамтамасыз ететін зарарсыздан-

дыратын агенттердің осындай концентрациясын таңдау керек [24, 25, 26, 27].

Біздің тәжіребемізде антисептиктер ретінде этанол, натрий гипохлориді, сынап (сулема) хлориді, калий перманганаты, сутегінің асқын тотығының әртүрлі концентрациясы және экспозиция уақыты қолданылды. Нәтижесінде зарарсыз ғана емес, өміршең тұқым алуға мүмкіндік беретін оңтайлы зарарсыздандыру протоколы таңдалды.

Өміршеңдікті зерттеу үшін әртүрлі өсу реттегіштері қосылған орталар қолданылады, көбінесе цитокининдер мен ауксиндер әртүрлі комбинациялары мен концентрациялары пайдаланылады [28, 29, 30].

Тұқымның өнуіне арналған қоректік орталарда цитокининдер көбінесе көшеттердің өсуін ынталандыру мақсатында қосылады. Бұл процесс жасушалардың созылуы және митоздар санының көбеюі арқылы жасуша көлемін ұлғайту арқылы жүзеге асырылады. Екінші жағынан, ауксиндер вакуоль көлемін ұлғайту арқылы жасуша қабырғаларының құрылымын босатуға және олардың пластикалық созылуына ықпал етеді.

Біз өміршең *R. carthamoides* тұқымдарының максималды санын алу үшін қоректік ортада фитогормондардың оңтайлы комбинациясын таңдадық, бұл осы өсімдікті өсіруді оңтайландырудағы маңызды кезең. Тұқымның өміршеңдігінің ең төменгі көрсеткіштері өсу реттегіштерін қоспай, Мурасиге-Скуг қоректік ортасында және минералды тұздардың жарты концентрациясы қосылған MS ортасында өсіру кезінде болатыны анықталды.

Өсіп келе жатқан ортада өсу реттегіштерінің болмауы тұқымның өміршеңдігін айтарлықтай төмендетеді. Бұл өсімдіктерді өсіру жағдайларын оңтайландыруда фитогормондардың болуының немесе болмауының маңыздылығын көрсетеді.

Өсіп келе жатқан ортадағы фитогормондардың оңтайлы комбинациясы *R. carthamoides* тұқымының өнімділігі мен сапасын арттыру үшін пайдалануы мүмкін, бұл өз кезегінде өсімдіктің осы түріне тән биологиялық белсенді заттардың өндірісін арттыруға әсер етеді.

Әр түрлі фитогормондардың бір-бірімен үйлесуі *R. carthamoides* көшеттерінің өсуі мен дамуының морфологиялық ерекшеліктеріне әсер етпеді. Зерттелетін қоректік ортаның барлық нұсқаларында өсірудің 10-шы күнінде тұқымжарнақ жапырақтарының ашылуы болды. Өну пайызы өсіру ұзақтығымен тікелей байланысты болды: өсіру процесі неғұрлым ұзақ болса, алынған өміршең тұқымдардың пайызы соғұрлым жоғары болды.

R. carthamoides өсірудің бастапқы кезеңдерін әзірлеу болашақта түрді сақтау мәселесін шешу үшін оның клондық микрокөбейтуінің толық технологиясын жүзеге асыруға мүмкіндік береді. Нәтижесінде, дәстүрлі түрде көбейту қиын өсімдіктерді алуға, жыл бойы жұмыс істеуге, сонымен бірге аумақты үнемдеуге және өсіру процесін автоматтандыруға болады.

ҚОРЫТЫНДЫ

Жүргізілген зерттеулердің нәтижесінде *in vitro* жағдайында *R. carthamoides* өсірудің жекелеген кезеңдері оңтайландырылды - тұқымдарды зарарсыздандыру, зарарсыз көшеттерді алу.

Детергент пен калий перманганатының ерітіндісінде зарарсыздандыруды, 48 сағат бойы жібітуді, содан кейін 10% натрий гипохлориді ерітіндісінде және 0,1% сынап хлориді ерітіндісінде тұндырылған тұқымдарды зарарсыздандыруды қамтитын көп сатылы зарарсыздандыру протоколы *R. carthamoides* зарарсыз экспланттарын алу үшін ең оңтайлы болып табылатыны анықталды. Осы зарарсыздандыру сұлбасын қолданған кезде экспланттардың зарарсыздығы 85% деңгейіне жетті.

Тұқымның өну белгілері *R. carthamoides* өсірудің 3-5 күнінде пайда болды, тұқымның өміршеңдігі зарарсыздандыру сұлбасына да, қоректік ортаның гормоналды құрамына да байланысты болды.

Өнудің ең жоғары пайызы B3 қоректік орта нұсқасындағы тұқымдарда болды (MS+3мг/л ВАР+3МГ/л кинетин), бұл нұсқада өну пайызы - 85,8% құрады. Қоректік ортаның барлық нұсқаларында әртүрлі фитогормондардың үйлесуі *R. carthamoides* көшеттерінің морфологиялық ерекшеліктеріне (өсуі мен дамуына) әсер етпеді.

ҚАРЖЫЛАНДЫРУ

Жұмыс Қазақстан Республикасы ғылым және жоғары білім министрлігінің қолдауымен № АР19679407 «Солтүстік Қазақстанда бағалы дәрілік және азықтық өсімдік сафлор тәрізді левзеяны (*Rhaponticum carthamoides*) интродукциялау үшін агробиотехнологияларды әзірлеу» гранттық жобасы шеңберінде орындалды.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТ

1. Волошин, В.А., Печенкина, Ю.Ю. Левзея сафлоровидная – новый подход к кормовым культурам / В. А. Волошин, Ю. Ю. Печенкина // Край земли. – 2010. – №12. – с.38.
2. Волкова, Г. А. Введение в культуру и сохранение на Севере коллекций полезных растений / Г. А. Волкова. - Екатеринбург, уро РАН. –2001. – С.25 - 26.
3. Корелина, В.А., Батакова, О.Б., Забонина, И.В. Интродукция кормовых культур для расширения видового разнообразия, укрепления кормовой базы животноводства в условиях субарктической зоны Российской Федерации // Эффективное животноводство. – 2018. - №4 (143). – С. 32-35.
4. Backs, J., Hoban, S. Genetic diversity assessment of ex situ collections of endangered *Quercus hinckleyi* // International Journal of Plant Sciences. – 2021. – No. 3. – P. 220-228. doi.org/10.1086/712783
5. Abeli, T., Dalrymple, S., Godefroid, S., Mondoni, A., Müller, J. V., Rossi, G., Orsenigo, S. Ex situ collections and their potential for the restoration of extinct plants // Conservation Biology. – 2020. – Vol. 34, No.2. – P.303-313. doi.org/10.1111/cobi.13391
6. The List of Rare and Threatened Plant Species (Red List) Approved by the RK Government Decree N1034 of Oct. 31. Astana. – 2006.
7. Мамырова, С.А. Изучение количественного содержания экидистерона в экстрактах *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin. // Химический журнал Казахстана. – 2017. – №2 (58). – С.332-339.

8. Garmaeva, L. L., Nikolaeva, I. G., Nikolaeva, G. G., Tsybiktarova, L. P. Vitamin B Content in *Rhaponticum uniflorum* // Chemistry of Natural Compounds. – 2015. – Vol.51(5). – P.978-979. doi.org/10.1007/s10600-015-1468-4
9. Tarkowská, D., Strnad, M., Plant ecdysteroids: plant sterols with intriguing distributions, biological effects and relations to plant hormones // Planta. – 2016. – Vol.244. – P.545-555. doi.org/10.1007/s00425-016-2561-z
10. Parr, M. K., Botrè, F., Naß, A., Hengevoss, J., Diel P., Wolber, G., Ecdysteroids: A novel class of anabolic agents // Biology of Sport. – 2015. – Vol.32. – P.169-173. doi.org/10.5604/20831862.1144420
11. Głazowska, J., Kamiński, M., Kamiński, M. Chromatographic separation, determination and identification of ecdysteroids: Focus on Maral root (*Rhaponticum carthamoides*, *Leuzea carthamoides*) // Journal of Separation Science. – 2018. – Vol.41, No.23. – P. 4304-4314. doi.org/10.1002/jssc.201800506
12. Yessimbekov, Z., Dey, T. Chemical Composition and Organoleptic Properties of a Tincture made from *Echinacea* and *Leuzea* // Medbiotech Journal. – 2021. – Vol. 5, No. 4. – P. 31-36. doi.org/10.22034/MBT.2021.305379.1005
13. Yang, Y., Moser, M., Physicochemical properties and biological activity of extracts of dried biomass of callus and suspension cells and in vitro root cultures // Food Processing: Techniques and Technology. – 2020. – Vol. 58, No. 3. – P. 480-492.
14. Морозков, Н. А., Терентьева, Л. С., Суханова, Е. В., Волошин, В. А. Витаминно-травяная мука из левзеи сафлоровидной в рационах молочных коров // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2021. – №22(4). – С.570-580. doi.org/10.30766/2072-9081.2021.22.4.570-580
15. Zhdanova, I.N. The effect of vitamin-herbal flour from *R. carthamoides* on the blood parameters of young cattle // Agrarian science. – 2022. – No. 2. – P. 28-31 doi.org/10.32634/0869-8155-2022-356-2-28-31
16. Ворошилин, Р. А., Рассолов, С. Н. Экстракт левзеи сафлоровидной в кормлении сельскохозяйственных животных // Инновационный конвент Кузбасс: образование, наука, инновации. – 2019. – С. 415-416.
17. Cordeiro, S. Z., Simas, N. K., Henriques, A. B., Sato A. *In vitro* conservation of *Mandevilla moricandiana* (*Apocynaceae*): short-term storage and encapsulation–dehydration of nodal segments // In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2014. – Vol. 50. – P. 326-336. doi.org/10.1007/s11627-014-9600-x
18. Engelmann, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2011. – Vol. 47. – P. 5-16. doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2
19. Полубоярова, Т.В., Новикова, Т.И. Проращивание семян дикорастущих видов луков рода *Allium L.* подрода *Melanocrommium WEBB ET BERTH.* в условиях *in vitro* // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2009. – № 1(51). – С.22-26.
20. Нефедьева, Е.Э., Белопухов, С.Л., Верхотуров, В.В., Лысак, В.И. Роль фитогормонов в регуляции прорастания семян // Прикладная химия и биотехнология. – 2013. – № 1(51). – С.22-26.
21. Bronskih, E.D., Pivovarova, N.S. Обзор методов предпосевной стимуляции семян и стерилизации растительных объектов в условиях выращивания *in vitro* // Сборник научных трудов IX Международная научная конференция молодых учёных «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения». М.: ФГБНУ ВИЛАР. – 2021. – С. 103-109. doi.org/10.52101/9785870191027_2021_103
22. Лутай, С.С., Осипова, Л.П. Покой семян и условия его преодоления с использованием стимуляторов роста // Инновационные процессы и технологии в современном мире. – 2013. – С.118-120.
23. Тиманн, К., Джен, Р., Амен, Р., Кан, А. и др. Физиология и биохимия покоя и прорастания семян. – М.: Колос, 1982. – 495 с.
24. Bombarely, A., Moser, M., Amrad, A., Bao, M., Bapaume, L., Barry, CS, Insight into the evolution of the *Solanaceae* from the parental genomes of *Petunia hybrid* // Nature Plants. – 2016. – No.2(6). – P.16074. pmid:27255838 doi.org/ 10.1038/NPLANTS.2016.74
25. Cuba-Díaz, M., Rivera-Mora, C., Navarrete, E., Klagges, M. Advances of native and non-native Antarctic species to *in vitro* conservation: improvement of disinfection protocols // Scientific Reports. – 2020. –No.10(1). – P.3845. pmid:32123221 doi.org/10.1038/s41598-020-60533-1
26. Hesami, M., Naderi, R., Tohidfar, M. Modeling and Optimizing *in vitro* Sterilization of Chrysanthemum via Multilayer Perceptron-Non-dominated Sorting Genetic Algorithm-II (MLP-NSGAI) // Frontiers in Plant Science. – 2019. – No.10.- P.282. pmid:30923529 doi.org/ 10.3389/fpls.2019.00282
27. da Silva, JAT., Kulus, D., Zhang, X., Zeng, S., Ma, G., Piqueras, A. Disinfection of explants for saffron (*Crocus sativus*) tissue culture // Environmental and Experimental Biology. –2016. – No.14(4). – P.183-98. doi.org/10.22364/eeb.14.25
28. Amiri, S., Mohammadi, R. Establishment of an efficient *in vitro* propagation protocol for *Sumac* (*Rhus coriaria L.*) and confirmation of the genetic homogeneity // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11, No. 1. – P. 173. doi.org/10.1038/s41598-020-80550-4
29. Rout, G. R., Samantaray, S., Das, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants // Biotechnology advances. – 2000. – Vol.18, No.2. – P. 91-120. doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00026-9
30. Жигунов, А. В., Чанг, Н. К. Введение *Eucommia ulmoides Oliv.* в культуру *in vitro* // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал. – 2020. – №. 5 (377). – С. 38-50.
21. Korelina, V.A., Batakova, O.B., Zabolina, I.V. Introdukcija kormovyh kul'tur dlja rasshirenija vidovogo raznoobrazija, ukreplenija kormovoj bazy zhivotnovodstva v uslovijah subarkticheskoj zony Rossijskoj Federacii // Jefferktivnoe zhivotnovodstvo. – 2018. – №4 (143). – S. 32-35.
22. Bacs, J., Hoban, S. Genetic diversity assessment of *ex situ* collections of endangered *Quercus hinckleyi* // International Journal of Plant Sciences. – 2021. – No.3. – P.220-228. doi.org/10.1086/712783
23. Abeli, T., Dalrymple, S., Godefroid, S., Mondoni, A., Müller, J. V., Rossi, G., Orsenigo, S. *Ex situ* collections and their potential for the restoration of extinct plants // Conservation Biology. – 2020. – Vol. 34, No.2. – P.303-313. doi.org/10.1111/cobi.13391
24. The List of Rare and Threatened Plant Species (Red List) Approved by the RK Government Decree N1034 of Oct. 31. Astana. – 2006.
25. Mamyrova, S.A. Izuchenie kolichestvennogo sodержanija jekdisterona v jekstraktah *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin. // Himicheskij zhurnal Kazahstana. – 2017. – №2 (58). – S.332-339.
26. Garmaeva, L. L., Nikolaeva, I. G., Nikolaeva, G. G., Tsybiktarova, L. P. Vitamin B Content in *Rhaponticum uniflorum* // Chemistry of Natural Compounds. – 2015. – Vol.51(5). – P.978-979. doi.org/10.1007/s10600-015-1468-4
27. Tarkowská, D., Strnad, M., Plant ecdysteroids: plant sterols with intriguing distributions, biological effects and relations to plant hormones // Planta. – 2016. – Vol.244. – P.545-555. doi.org/10.1007/s00425-016-2561-z
28. Parr, M. K., Botrè, F., Naß, A., Hengevoss, J., Diel P., Wolber, G., Ecdysteroids: A novel class of anabolic agents // Biology of Sport. – 2015. – Vol.32. – P.169-173. doi.org/10.5604/20831862.1144420
29. Głazowska, J., Kamiński, M., Kamiński, M. Chromatographic separation, determination and identification of ecdysteroids: Focus on Maral root (*Rhaponticum carthamoides*, *Leuzea carthamoides*) // Journal of Separation Science. – 2018. – Vol.41, No.23. – P. 4304-4314. doi.org/10.1002/jssc.201800506
30. Yessimbekov, Z., Dey, T. Chemical Composition and Organoleptic Properties of a Tincture made from *Echinacea* and *Leuzea* // Medbiotech Journal. – 2021. – Vol. 5, No. 4. – P. 31-36. doi.org/10.22034/MBT.2021.305379.1005
31. Yang, Y., Moser, M., Physicochemical properties and biological activity of extracts of dried biomass of callus and suspension cells and in vitro root cultures // Food Processing: Techniques and Technology. – 2020. – Vol. 58, No. 3. – P. 480-492.
32. Морозков, Н. А., Терентьева, Л. С., Суханова, Е. В., Волошин, В. А. Витаминно-травяная мука из левзеи сафлоровидной в рационах молочных коров // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2021. – №22(4). – С.570-580. doi.org/10.30766/2072-9081.2021.22.4.570-580
33. Zhdanova, I.N. The effect of vitamin-herbal flour from *R. carthamoides* on the blood parameters of young cattle // Agrarian science. – 2022. – No. 2. – P. 28-31 doi.org/10.32634/0869-8155-2022-356-2-28-31
34. Ворошилин, Р. А., Рассолов, С. Н. Экстракт левзеи сафлоровидной в кормлении сельскохозяйственных животных // Инновационный конвент Кузбасс: образование, наука, инновации. – 2019. – С. 415-416.
35. Cordeiro, S. Z., Simas, N. K., Henriques, A. B., Sato A. *In vitro* conservation of *Mandevilla moricandiana* (*Apocynaceae*): short-term storage and encapsulation–dehydration of nodal segments // In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2014. – Vol. 50. – P. 326-336. doi.org/10.1007/s11627-014-9600-x
36. Engelmann, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2011. – Vol. 47. – P. 5-16. doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2
37. Полубоярова, Т.В., Новикова, Т.И. Проращивание семян дикорастущих видов луков рода *Allium L.* подрода *Melanocrommium WEBB ET BERTH.* в условиях *in vitro* // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2009. – № 1(51). – С.22-26.
38. Нефедьева, Е.Э., Белопухов, С.Л., Верхотуров, В.В., Лысак, В.И. Роль фитогормонов в регуляции прорастания семян // Прикладная химия и биотехнология. – 2013. – № 1(51). – С.22-26.
39. Bronskih, E.D., Pivovarova, N.S. Обзор методов предпосевной стимуляции семян и стерилизации растительных объектов в условиях выращивания *in vitro* // Сборник научных трудов IX Международная научная конференция молодых учёных «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения». М.: ФГБНУ ВИЛАР. – 2021. – С. 103-109. doi.org/10.52101/9785870191027_2021_103
40. Лутай, С.С., Осипова, Л.П. Покой семян и условия его преодоления с использованием стимуляторов роста // Инновационные процессы и технологии в современном мире. – 2013. – С.118-120.
41. Timann, K., Dzhen, R., Amen, R., Kan, A. i dr. Физиология и биохимия покоя и прорастания семян. – М.: Колос, 1982. – 495 с.
42. Bombarely, A., Moser, M., Amrad, A., Bao, M., Bapaume, L., Barry, CS, Insight into the evolution of the *Solanaceae* from the parental genomes of *Petunia hybrid* // Nature Plants. – 2016. – No.2(6). – P.16074. pmid:27255838 doi.org/ 10.1038/NPLANTS.2016.74
43. Cuba-Díaz, M., Rivera-Mora, C., Navarrete, E., Klagges, M. Advances of native and non-native Antarctic species to *in vitro* conservation: improvement of disinfection protocols // Scientific Reports. – 2020. –No.10(1). – P.3845. pmid:32123221 doi.org/10.1038/s41598-020-60533-1
44. Hesami, M., Naderi, R., Tohidfar, M. Modeling and Optimizing *in vitro* Sterilization of Chrysanthemum via Multilayer Perceptron-Non-dominated Sorting Genetic Algorithm-II (MLP-NSGAI) // Frontiers in Plant Science. – 2019. –No.10.- P.282. pmid:30923529 doi.org/ 10.3389/fpls.2019.00282
45. da Silva, JAT., Kulus, D., Zhang, X., Zeng, S., Ma, G., Piqueras, A. Disinfection of explants for saffron (*Crocus sativus*) tissue culture // Environmental and Experimental Biology. –2016. – No.14(4). – P.183-98. doi.org/10.22364/eeb.14.25

REFERENCES

28. Amiri, S., Mohammadi, R. Establishment of an efficient *in vitro* propagation protocol for *Sumac* (*Rhus coriaria* L.) and confirmation of the genetic homogeneity // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11, No. 1. – P. 173. doi.org/10.1038/s41598-020-80550-4

29. Rout, G. R., Samantaray, S., Das, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants // Biotechnology advances. – 2000. – Vol.18, No.2. – P. 91-120. doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00026-9

30. Zhigunov, A. V., Chang, N. K. Vvedenie *Eucommia ulmoides* Oliv. v kul'turu *in vitro* // Izvestija vysshih uchebnyh zavedenij. Lesnoj zhurnal. – 2020. – №. 5 (377). – S. 38-50.

INTRODUCTION TO IN VITRO CULTURE OF *RHAPONTICUM CARTHAMOIDES*

Raizer O.*, Tagimanova D., Nagmetova G., Khapilina O.

National Center for Biotechnology, 13/5 Korgalzhynskoye Road, Astana, 010000

*2008olesya@mail.ru

ABSTRACT

The article presents the results of studies on the introduction into *in vitro* culture of the valuable medicinal plant *Rhaponticum carthamoides*, growing in the territory of the Kazakhstan Altai. *R. carthamoides* - or maral root is a source of various biologically active compounds (flavonoids, polysaccharides, saponins, cumanins). This species is of particular value as a producer of ultra-high quantities of ecdysteroids, which have a hepatoprotective and hypoglycemic effect, acting as adaptogens. Currently, natural reserves of this species are sharply reduced due to increasing demand and, as a consequence, lead to the depletion of natural populations. Modern biotechnology methods make it possible to develop highly effective approaches for the propagation and preservation of *R. carthamoides* for subsequent introduction and expansion of the range of fodder and medicinal crops that meet the needs of agriculture, medicine and the food industry.

Seeds collected from their natural habitats were used as research material. A seed sterilization protocol has been developed; it has been established that to obtain aseptic seedlings it is necessary to use a multi-stage sterilization protocol using various sterilizing agents. Surface-sterilized seeds were placed on MS and MS media containing ½ mineral salts with different hormonal compositions. The results showed that the percentage of seed germination varied depending on the hormonal status of the environment and ranged from 42.9 to 85.5%. Thus, the lowest percentage of germination was noted on the B0 medium option (½ MS) - 42.9%. The highest percentage of germination was in seeds on the B3 medium option (MS + 3 mg/l BAP + 3 mg/l kinetin) - 85.5%.

Keywords: *Rhaponticum carthamoides*, medicinal plant, *in vitro*, phytohormones, sterilization, explant, micropropagation.

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ЛЕВЗЕИ САФЛОРОВИДНОЙ (*RHAPONTICUM CARTHAMOIDES*)

Райзер О.*, Тагиманова Д., Нагметова Г., Хапилина О.

Национальный центр биотехнологии, Кургальжинское шоссе 13/5, Астана, 010000

*2008olesya@mail.ru

АННОТАЦИЯ

В статье представлены результаты исследований по введению в культуру *in vitro* ценного лекарственного растения левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides*), произрастающего на территории казахстанского Алтая. Левзея сафлоровидная - или маралий корень является источником различных биологически активных соединений (флавоноиды, полисахариды, сапонины, куманины). Особую ценность этот вид представляет, как продуцент сверхвысоких количеств экидистероидов, которые обладают гепатопротекторным и гипогликемическим эффектом, действуя как адаптогены. В настоящее время природные запасы данного вида резко сокращаются вследствие из-за возрастающего спроса и, как следствие этого, приводят к истощению природных популяций. Современные методы биотехнологии позволяют разработать высокоэффективные подходы для размножения и сохранения левзеи сафлоровидной для последующей интродукции и расширения ассортимента кормовых, лекарственных культур, удовлетворяющих потребности сельского хозяйства, медицины и пищевой промышленности.

В качестве материала для исследований использовали семена, собранные в местах их естественного произрастания. Отработан протокол стерилизации семян, установлено, что для получения асептических проростков необходимо использовать многоэтапный протокол стерилизации с применением различных стерилизующих агентов. Поверхностно-стерилизованные семена помещали на среды MS и MS содержащую ½ минеральных солей с различным гормональным составом. Результаты показали, что процент всхожести семян варьировал в зависимости от гормонального статуса среды и составил от 42,9 до 85,5%. Так наименьший процент всхожести был отмечен на варианте среды B0 (½ MS) – 42,9%. Наиболее высокий процент всхожести был у семян на варианте среды B3 (MS+3мг/л БАП+3мг/л кинетин) -85,5%.

Ключевые слова: *Rhaponticum carthamoides*, лекарственное растение, *in vitro*, фитогормоны, стерилизация, explant, микроразмножение.