

В.К. Мурсалиева^{1*}, Б.Т. Сәрсенбек^{1,2}, А.Т. Алғазы¹, С.К. Турашева²,
Т.М. Муханов¹, Т.Ш. Мурзатаева³, Г.Т. Ситпаева³

¹Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан;

²Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан;

³Институт ботаники и фитоинтродукции, Алматы, Казахстан

*Автор для корреспонденции: gen_mursal@mail.ru

Введение *in vitro* и регенерационная способность реликтового эндемика недзвецкия семиреченская *Niedzwedzka semiretschenskia* В. Fedtsch

В статье приведены экспериментальные данные по получению асептической культуры редкого реликтового вида недзвецкия (инкарвиллея) семиреченская *Niedzwedzka semiretschenskia* от исходных семян из природных популяций на юге Казахстана. Изучено влияние гормонального состава питательной среды Мурасиге и Скуга на всхожесть семян, адвентивное побегообразование и укоренение *in vitro*. Проведена оценка коэффициента размножения в ходе многократного микрочеренкования асептических побегов. Установлено, что *in vitro* всхожесть семян не превышала 25 % на среде Кнопа, максимальная всхожесть отмечалась при их посадке в почвенный субстрат. Внесение в среду цитокинина 6-бензиламинопурина (БАП) приводило к образованию каллуса из тканей семядолей, к адвентивному побегообразованию у апикальных эксплантов проростков с настоящими листьями. Выявлено, что оптимальной средой для микроклонального размножения является среда с внесением 0,5 мг/л БАП с максимальным коэффициентом размножения 7,84 на втором пассаже. Установлено, что при депонировании в условиях низкой положительной температуры в течение 6 месяцев пробирочная культура инкарвиллеи сохраняет жизнеспособность и восстанавливает рост при переносе в стационарные условия световой комнаты. В результате работы проведено введение в культуру тканей, микроклональное размножение и создана депонированная коллекция *in vitro* реликтового вида *N. semiretschenskia*.

Ключевые слова: *Niedzwedzka semiretschenskia*, регенерация, культура *in vitro*, оценка коэффициента размножения.

Введение

Недзвецкия семиреченская *Niedzwedzka semiretschenskia* В. Fedtsch (инкарвиллея семиреченская (*Incarvillea semiretschenskia* (В. Fedtsch.) Grierson) относится к древнейшим палеогеновым реликтам пустынной флоры Средней Азии и является единственным представителем тропических растений семейства *Bignoniaceae* во флоре Казахстана [1]. Вид *N. semiretschenskia*, впервые описанный Б.А. Федченко в 1915 году в Чу-Илийских горах, занесен в Красную книгу РК и в Список Международного союза охраны природы и природных ресурсов со статусом очень редкого, узкоэндемичного и исчезающего реликтового вида [2, 3]. Следует отметить, что, согласно литературным данным [4], ранее самостоятельный род *Niedzwedzka*, эндемичный для гор бассейна рек Чу и Или (ныне Шу-Илейские горы), позднее стали относить к роду *Incarvillea* Juss, включающий 16 видов, произрастающих в основном в юго-западных районах Китая и Непала, в Цинхай-Тибетском нагорье [5].

По жизненной форме *N. semiretschenskia* — декоративное многолетнее растение до 30 см высотой с густолиственными стеблями при основании древеснеющие, с очередными, перисто- или пальчато-рассеченными листьями, с крупными одиночными цветками, расположенными на верхушках ветвей с пурпуровым, трубчато-воронковидным с пятью закругленными лопастями венчиком и плодом коробочкой с четырьмя крылатыми жесткими ребрами [6].

Современный ограниченный ареал распространения вида занимает разреженными популяциями всего три участка общей площадью 7 га с численностью не более 25–28 тысяч разновозрастных кустов на глинистых и щебнистых склонах пустынных низкогорий в Шу-Илейских горах [4]. В настоящее время естественные заросли редкого вида в значительной степени подвержены антропогенному воздействию (выпас скота), в результате чего малочисленные дикорастущие популяции реликта *N. semiretschenskia* находятся под угрозой деградации [7].

Вид *N. semiretshenskia* рекомендуется как высоко-декоративное растение для озеленения на юге Казахстана и Средней Азии. Взрослые растения отличаются обильным цветением (более 300 цветков) и плодоношением, обладают высокой устойчивостью к засухе и морозу. Впервые вид *N. semiretshenskia* был введен в культуру в Ташкентском, а затем в Главном (Алматы) ботанических садах [8].

Обзор литературы по близкородственным видам *Incarvillea* показал, что дикорастущие представители рода являются традиционными лечебными травами и издревле использовались местными жителями Китая народности «Wabuyou» для лечения пневмонии, малярии, гепатита и отита [9–11]. Современные химические исследования *Incarvillea ssp.* выявили высокое содержание в растениях биологически активных метаболитов, которые обладают противовоспалительным, антимикробным, антигепатитным и другими эффектами [12]. Высокое содержание алкалоидов в растениях *Incarvillea* связывают с их обезболивающим действием [13]. В настоящее время из растительного сырья инкарвиллеи выделены несколько структурно разнообразных монотерпеноидных алкалоидов актинидинового типа (изоинкарвиллин, инкаргранин А, инкарвиллатин и др.) с выраженной антипролиферативной активностью [14–16], свыше 12 фенилэтановидных гликозидов, оказывающих гепатопротекторное действие [17, 18]. Выявлена высокая антирадикальная активность и цитотоксическая активность экстрактов *I. Emodi* против эпидермальных опухолевых клеток человека Нер-2 [19].

Уникальность вида *N. semiretshenskia* и актуальность его всестороннего изучения подчеркивал видный ученый-ботаник И.О. Байтулин «как редчайший, крайне малочисленный, с ограниченным и узко-локализованной площадью распространения, чудом сохранившийся древний палеогеновый реликт, да еще и красиво цветущий декоративный вид, перспективный для введения в культуру Нездзевкиа семиречинская заслуживает особого отношения...» [4]. Отсутствие полноценной научной информации и крайне слабая изученность среднеазиатских видов инкарвиллеи *I. semiretshenskia* и *I. olgae* из Казахстана и Киргизии отмечаются в исследованиях китайских ученых [20].

Целью наших исследований являлось введение *in vitro* и оценка регенерационной способности *N. semiretshenskia* для сохранения уникального вида и его дальнейшего научного изучения, интродукции, реинтродукции и практического использования перспективной засухоустойчивой морозоустойчивой декоративной и лекарственной культуры.

Материалы и методы

В качестве исходного материала *N. Semiretshenskia* использовали семена сбора 2016 г из природных популяций в Шу-Илейских горах, полученные из генбанка Института ботаники и фитодатологии (Алматы, Казахстан). Для повышения всхожести после хранения проводили предобработку семян 0,001 % раствором гибберелловой кислоты (ГК), а также антистрессовым биостимулятором WORMic&BioZZ (ТОО «BioInvest, Казахстан), представляющий собой смесь комплексных микробиологических органо-минеральных жидких удобрений.

В экспериментах *in vitro* использовали общепринятую методику культивирования эксплантов [21] и питательные среды: для проращивания семян — среда Кнопа; для микроразмножения — среда Мурасиге-Скуга с половинной концентрацией макро-микроэлементов ($\frac{1}{2}$ МС) с повышенным уровнем агара 8 г/л, 30 г/л сахарозы и с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП) и гибберелловой кислоты (ГК); для индукции корнеобразования — среду $\frac{1}{2}$ МС с внесением α -нафтиуксусной кислоты (НУК) или индолилмасляной кислоты (ИМК).

Стерилизацию исходного материала проводили путем последовательной обработки 70 % этанолом в течение 1 мин и 0,1 % раствором сулемы в течение 5–10 мин. Проращивание семян проводили различными способами: 1) *in vitro* на среде Кнопа, в отсутствие освещения; 2) *in vivo*, в почвенном субстрате — торф : почва : перлит (1:1:2) в комнатных условиях. Культуральные сосуды с вегетативными эксплантами содержали в световой комнате с 16-часовым фотопериодом и температурой 26–28°C. Рост и развитие оценивали по количеству эксплантов с развившимися побегами и количеству побегов на экспланте. Коэффициент размножения (Кр) рассчитывали, как общее количество образующихся побегов в варианте, деленное на число первичных эксплантов или пассированных микропобегов.

Для создания резервной коллекции *in vitro* образцов *N. semiretshenskia* часть растительного материала переводили на режим депонирования путем сохранения пробирочных растений на безгормональной $\frac{1}{2}$ МС среде в холодильной камере при температуре +2°C и интенсивностью освещения око-

до 200 лк. Результаты депонирования оценивали через 6 месяцев по темпам восстановления роста у асептических побегов после из переноса в условия световой комнаты. Все результаты исследований обрабатывались стандартными биометрическими методами с использованием программы Microsoft Excel [22].

Результаты

По литературным данным растение инкарвиллея крайне негативно реагирует на застой жидкости в корневой системе, поэтому при выращивании рекомендуется выбирать возвышенный участок [8].

В предварительных опытах нами выявлено, что *N. semiretschenskia* сохраняет высокую чувствительность к избыточной влажности в условиях *in vitro*. Для активного развития пробирочной культуры требуется поддержание в световой комнате температурного режима в пределах 28–30°C и влажности не выше 50 %. В стационарных условиях выращивания при температуре 24–26°C и влажности 70 % экспланты слабо развивались, побеги темнели и, в конечном итоге, погибали.

Установлено, что для стерилизации семян инкарвиллеи семиреченской эффективна последовательная обработка 70 % этанолом и 0,1 % раствором сулемы в течение 5 мин, при которой средняя приживаемость составила 77 %. В ходе дальнейшего культивирования не были выявлены визуальные признаки патогенности, что свидетельствует об отсутствии у исходных депонированных семян внутренней грибковой и бактериальной инфекции.

Данные по всхожести семян *in vitro* и *in vivo* в зависимости от сроков посадки и от длительности их обработки стимуляторами роста приведены в таблице 1.

Таблица 1

Семенная всхожесть недзвецкия семиреченская *Niedzwedzkia semiretschenskia* в условиях *in vitro* и *in vivo*

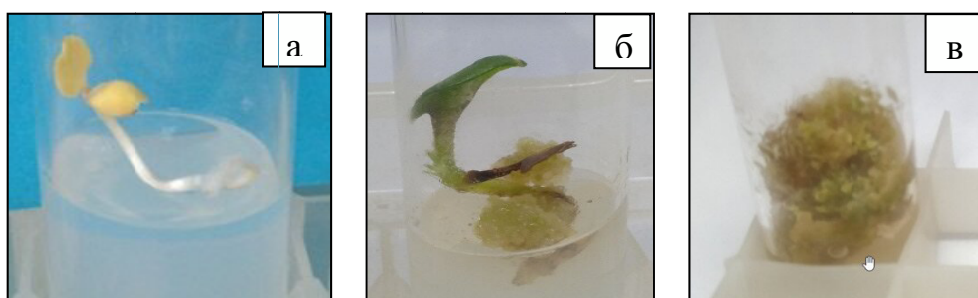
Условия и сроки посадки		Предобработка	Длительность обработки, часы	Всхожесть, %
<i>in vitro</i> (среда Кнопа)	Май	ГК	2–6	10
	Июнь	ГК	24	25
<i>in vivo</i> (почвенный субстрат)	Апрель	ГК	4	40
	Июнь	W&B	12	90
	Октябрь	-	-	40

Примечание. ГК, 0,001% раствор гибберелловой кислоты, W&B, биостимулятор WORMic&BioZZ.

Максимальная 90 % всхожесть *N. semiretschenskia* выявлена при посадке исходных семян в почвенный субстрат (*in vivo*) при их предобработке препаратами Wormic & Biozz в июне месяце. Всхожесть семян после обработки ГК в течение 4 ч составила 40 % в конце апреля. Аналогичная всхожесть отмечалась при осенней посадке в субстрат контрольных семян (без обработки). Следует отметить, что полевая всхожесть инкарвиллеи была значительно ниже: из 10 семян, высаженных в конце апреля на участок, взошел один проросток, у которого через 2 месяца развились настоящие листья.

Морфогенетическая реакция в ходе *in vitro* культивирования семян, первичных апикальных эксплантов проростков и результаты микрклонального размножения *N. Semiretschenskia* приведены на рисунке 1.

Установлено, что *in vitro* максимальная всхожесть 25 % на среде Кнопа и ранний срок появления всходов (на 3 день после посадки) отмечались в июне месяце при обработке семян раствором ГК в течение суток. Культивирование жизнеспособных семян на среде Кнопа приводило к развитию семядольных листьев и первичного корешка на 20 день культивирования (рис. 1 а).



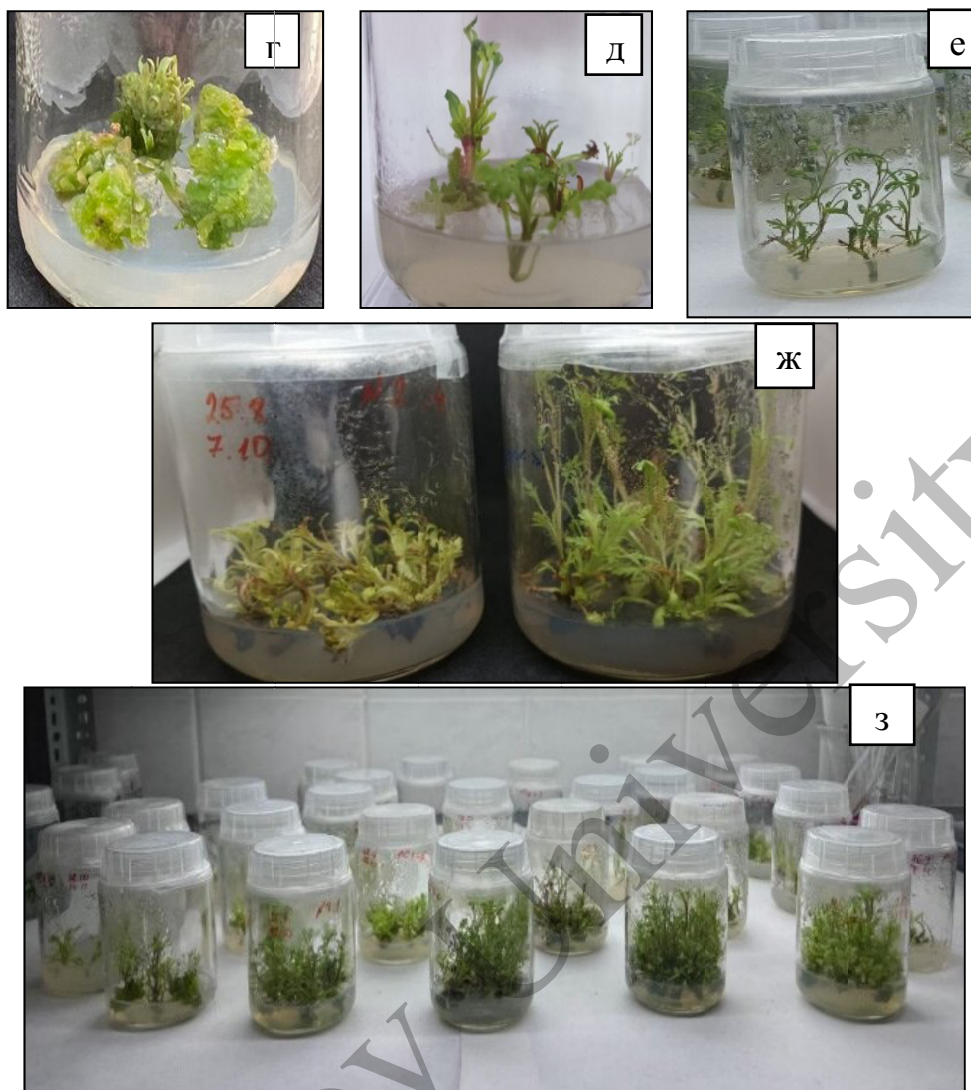


Рисунок 1. Регенерационная способность *in vitro* недзвецкия семиреченская *Niedzwedzka semiretschenskia*: а — проросток на среде Кнопа, 20 день после посадки; б — каллус на среде с 0,5 мг/л БАП, 20 день после посадки; в — неморфогенный каллус, месяц культуры; г — морфогенный каллус на среде ½ МС с 0,5 мг/л БАП; д — активация роста пазушных почек на среде ½ МС с 1 мг/л БАП; е — пассированные микропобеги на среде для укоренения с 0,5 мг/л ИМК; ж — депонированные побеги при +2°C (слева) и восстановление их роста после 6-месячного холодного хранения (справа); з — микротиражирование пробирочной культуры на безгормональной среде

При посадке семян на среду ½ МС с БАП в концентрации 0,5 мг/л отмечалось отрастание семядольных листьев через две недели после посадки. Наряду с этим отмечалось утолщение тканей семядолей и образование рыхлого, обводненного каллуса (рис. 1 б), который далее в течение месяца разрастался, увеличивался в массе без дифференцировки новых побегов и, в конечном итоге, некротизировался (рис. 1 в).

Для микроклонального размножения использовали семенные проростки, полученные *in vivo*. Для этого от двухнедельных проростков срезали апикальную часть с первыми настоящими листьями, стерилизовали 0,1 % сулемой и высаживали на питательные среды для адвентивного побегообразования. Результаты оценки влияния гормонального состава среды МС на регенерационную способность апикальных эксплантов приведены в таблице 2.

Таблица 2

Влияние гормонального состава питательной среды МС на регенерационный потенциал *in vitro* недзвецкия семиреченская *Niedzwedzka semiretschenskia*

Гормональный состав ½ МС, мг/л	Количество эксплантов	Регенерация, %	Количество побегов от одного экспланта
БАП 0,5	11	50,0*	3,5
БАП 1,0	5	100,0	2,0
БАП 1,0 + ГК 1,0	4	50,0	1,2
БАП 0,8 + 0,5 ГК	9	66,6	1,0

Примечание. БАП, 6-бензиламинопурин, ГК гибберелловая кислота; * одновременно с формированием каллуса.

На среде ½ МС с 0,5 мг/л БАП у 50 % эксплантов отмечалась регенерация побегов с одновременным образованием каллуса первично у основания побега, который далее разрастался по всей поверхности первичного побега. В отличие от каллуса, полученного из семядолей на аналогичной среде, индуцированный каллус обладал морфогенным потенциалом. При последующем пассировании каллуса на свежие среды отмечалась регенерация новых побегов (рис. 1 г).

При посадке верхушек проростков на среду ½ МС с внесением 1 мг/л БАП у всех эксплантов отмечалась активация роста пазушных почек и отрастание дополнительных побегов (адвентивное побегообразование) в течение месяца культивирования (рис. 1 д).

Далее полученные развитые побеги длиной 4–5 см делили на отдельные узловые сегменты длиной 1,5–2 см (микрочеренкование) и пассировали на контрольную (без регулятора роста) и опытные среды с внесением БАП для микроразмножения.

Влияние гормонального состава питательной среды на эффективность микрочеренкования и ростовые параметры полученных микропобегов представлены в таблице 3.

Таблица 3

Влияние гормонального состава среды на побегообразование *in vitro* недзвецкия семиреченская *Niedzwedzka semiretschenskia*

Параметры роста за один пассаж	Гормональный состав ½ МС, мг/л		
	контроль	0,5 БАП	1 БАП
Количество исходных черенков	6,43±0,53 ^a	5,43±0,79 ^a	4,8±1,64 ^a
Количество полученных побегов	10,14±1,05 ^a	13,29±1,15 ^b	9,4±1,3 ^a
Максимальная длина побега, см	6,50±0,82 ^a	3,0±0,26 ^b	1,40±0,35 ^b
Количество узлов на побеге	3,29±0,8 ^a	2,00±0,58 ^{ab}	1,20±0,45 ^b
Коэффициент размножения	1,57±0,31 ^a	2,48±0,21 ^b	2,12±0,14 ^{ab}

Примечание. БАП, 6-бензиламинопурин; а, б, в — достоверные отличия между вариантами в строке при $p \leq 0,05$.

Наибольший показатель Кр 2,48 достигался на среде ½ МС с 0,5 мг/л БАП. Увеличение концентрации БАП до 1 мг/л не повышало интенсивность побегообразования в контроле, показатель был минимальным, Кр1,57.

Для дальнейшего микротиражирования использовали среду с 0,5 мг/л БАП, которая обеспечивала максимальную скорость тиражирования побегов со средними параметрами роста. Результаты оценки регенерационной способности *N. semiretschenskia* в ходе четырехкратного пассирования на индуцирующей среде представлены на рисунке 2.

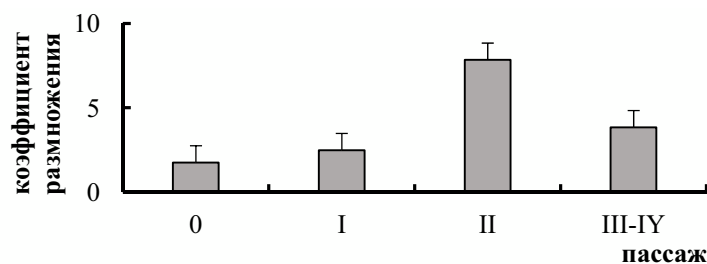


Рисунок 2. Интенсивность размножения *in vitro* в ходе пассирования микропобегов *N. semiretschenskia* на среде ½ МС с 0,5 мг/л БАП

Проведенное микрочеренкование и четырехкратное пассирование полученных побегов позволили провести тиражирование культуры *N. semiretschenskia* для проведения дальнейших экспериментов.

Для индукции ризогенеза размноженные побеги высотой 3–4 см с 4–5 листьями пересаживали на 1/2 МС среду с 0,3 мг/л - 0,5 мг/л ИМК или НУК (рис. 2 е). Через месяц культивирования на месте среза побега формировался плотный каллус, но дифференцировки корешков не отмечали на протяжении двух месяцев инкубации на индуцирующих средах. При этом у основания побега продолжалось отрастание новых побегов, что связано, вероятно, с пролонгированным действием экзогенного БАП. По литературным данным, для снятия эффекта цитокина необходимо проводить многократное пассирование материала на безгормональную среду [23, 24].

Результаты опытов по депонированию показали, что депонированные растения значительно отставали в развитии от растений, культивируемых в стационарных условиях, отличались отсутствием развития новых побегов (рис. 1 ж). Выявлено, что для депонирования лучше всего отбирать побеги не менее 2 см высотой, поскольку процесс восстановления у маломерных растений протекает значительно медленнее, чем у более рослых растений.

В результате проведенной работы создана асептическая коллекция реликтового вида (рис. 1 з), полученная от исходных семян из природных популяций *N. semiretschenskia*.

Обсуждение

Известно, что микроклонирование *in vitro* основано на способности регуляторов роста цитокининового ряда стимулировать адвентивное побегообразование. Использование данного подхода позволяет значительно увеличить коэффициент размножения и сохранять ценные признаки исходного генотипа [25].

Установлено, что способность апикальных эксплантов проростков *N. Semiretschenskia* к регенерации побегов и закладке дополнительных почек варьировала в зависимости от гормонального состава питательной среды. Морфогенетический эффект экзогенного цитокинина БАП зависел от его концентрации. При дозе 0,5 мг/л у первичных эксплантов отмечалось отрастание побега у 50 % эксплантов, одновременное образование морфогенного каллуса и максимальное количество полученных *de novo* побегов. При увеличении концентрации до 1 мг/л БАП развитие побега наблюдалось у всех первичных эксплантов без каллусогенеза. Комбинация БАП с ГК уменьшало эффективность регенерации в два раза, среднее количество полученных побегов не превышало 1–1,2 от одного экспланта.

Гормональный состав 1/2 МС среды существенно влиял на интенсивность побегообразования и ростовые параметры полученных побегов при их дальнейшем пассировании. Установлена обратная зависимость между эффективностью размножения и качественными параметрами полученных микропобегов. Показатели длины побегов и количества узлов на контрольной среде с минимальным коэффициентом размножения были достоверно выше, чем на среде с внесением БАП. На безгормональной среде формировались длинные побеги до 6,5 см, имеющие 3–4 узла на побеге. На среде с повышенным уровнем 1 мг/л БАП формировались укороченные побеги не выше 1,2 см с 1–2 узлами. Средние параметры роста в сочетании с максимальным показателем побегообразования отмечались на среде с 0,5 мг/л БАП, которая является оптимальной для микротиражирования первичной культуры.

Установлено, что регенерационная способность *N. semiretschenskia* меняется в ходе пассирования на индуцирующей среде с 0,5 мг/л БАП. На протяжении двух пассажей, начиная от введения первичных эксплантов (0 пассаж), показатель постепенно повышается от 1,75 до 2,48. Максимальная интенсивность размножения отмечалась на втором пассаже (Кр 7,84) с последующим двукратным снижением в ходе дальнейшего пассирования на свежие среды. Полученные данные свидетельствуют о том, что регенерационный потенциал после достижения максимума в ходе многократного пассирования снижается до определенного уровня.

Обнаружено, что длительное культивирование на среде с БАП отрицательно повлияло на способность асептических побегов к укоренению. Внесение в индуцирующую среду ауксинов НУК и ИМК вызывало образование каллуса у основания побега, но не приводило к развитию корешков. Для устранения пролонгированного эффекта цитокинина проводится регулярное пассирование побегов на безгормональную среду для дальнейших экспериментов.

В мировой практике для сохранения редких и эндемичных видов природной флоры в качестве дополнительного к традиционным полевым маточникам и семенным банкам в последние годы широко создают коллекции *in vitro* [26]. Результаты опытов показали, что пробирочная культура *N.*

semiretschenskia хорошо переносит условия депонирования при низкой положительной температуре и восстанавливает рост после 6 месяцев хранения.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой регенерационной способности эндемичного вида инкарвиллеи семиреченской и о эффективности применения метода культуры тканей для сохранения и воспроизводства генетических ресурсов ценного декоративного и лекарственного растения *N. semiretschenskia*.

Заключение

1. Оптимальным эксплантом для введения *N. Semiretschenskia* в условия *in vitro* является апикальная часть проростка с первыми настоящими листьями.
2. Для микрклонального размножения *N. semiretschenskia* эффективно применение методов адвентивного побегообразования и микрочеренкования на среде ½ МС с 0,5 мг/л -1 мг/л БАП.
3. Среднесрочное депонирование пробирочной культуры при низкой положительной температуре позволяет создать депонированную коллекцию уникальных образцов реликтового вида *N. semiretschenskia* для дальнейшего научно-практического использования.

Работа выполнена в рамках программы OR12065492-OT-21 при поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан.

Список литературы

- 1 Winterholler B. *Incarvillea semiretschenskia* (B. Fedtsch) Grierson as an object of Kazakhstan flora biodiversity saving / B. Winterholler, A. Winterholler, A.K. Auelbekova // Bulletin of the Karaganda University. Biology. Medicine. Geography series. — 2015. — No 4 (80). — P. 4-10.
- 2 Красная книга Казахстана. — 2-е изд., перераб. и доп. — Т. 2. Растения. — Астана: ТОО «АртPrintXXI», 2014. — 452 с.
- 3 IUCN Red List of Threatened Plants. IUCN – The World Conservation Union / K.S. Walter, H.J. Gillett (Eds.). <https://doi.org/10.5962/bhl.title.44833> (Accessed: 22.02.2023).
- 4 Байтулин И.О. К вопросу о методах оценки динамического состояния сообществ редких и эндемичных видов растений на фоне влияния глобальных изменений климата / И.О. Байтулин // Докл. НАН РК. Биология. — 2014. — № 4. — С. 61–68.
- 5 Rana S. Molecular phylogeny, biogeography and character evolution of the montane genus *Incarvillea* Juss. (Bignoniaceae) / S. Rana, D. Luo, H. Rana, S. Cheng, H. Sun // Plant Diversity. — 2021. — Vol. 43. — P. 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2020.09.002>.
- 6 Байтенов М.С. Флора Казахстана. Т.1: Иллюстрированный определитель семейств и родов / М.С. Байтенов. — Алматы: Гылым, 1999. — 400 с.
- 7 Кокорева И.И. Современная флора Шу-Илейских гор (Северный Тянь-Шань) / И.И. Кокорева, И.Т. Отрадных, И.А. Съедина // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. — 2018. — № 1. — С. 418–426.
- 8 Уварова Е.И. Биологическое обоснование интродукции травянистых многолетников семейства Бигнониевых (*Bignoniaceae* Juss.) в Алма-Ату: автореф. дис. ... канд. биол. наук. / Е.И. Уварова. — Алма-Ата, 1984. — 25 с.
- 9 Rahmatullah M. An ethno medicinal, pharmacological, and phytochemical review of some Bignoniaceae family plants and a description of *Bignoniaceae* plants in folk medicinal uses in Bangladesh / M. Rahmatullah, W. Samarri, R. Jahan et al. // Advances in Natural and Applied Sciences. — 2010. — Vol. 4(3). — P. 236-253.
- 10 Guo J. Phytochemical analysis, antioxidant and analgesic activities of *Incarvillea compacta* Maxim from the Tibetan plateau / J. Guo, D. Zhang, C. Yu, L. Yao, Z. Chen, Y. Tao, W. Cao // Molecules. — 2019. — No 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24091692>.
- 11 Zhang J. *Incarvillea compacta* Maxim ameliorates inflammatory response via inhibiting PI3K/AKT pathway and NLRP3 activation / J. Zhang, Y. Feng, S. Han, X. Guan, Z. He, C. Song, L. Lv, Q. Luo // Front. Pharmacol. — 2022. — Vol. 13. — 1058012. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1058012>.
- 12 Fu J. Chemical constituents of plants from the genus *Incarvillea* / J. Fu, Y. Shen, J. Qin, Y. Wang, Y. Huang, Q. Zeng, W. Zhang // Chemistry & Biodiversity. — 2009. — Vol. 6(6). — P. 818-826. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800166>.
- 13 Nakamura M. Antinociceptive substances from *Incarvillea delavayi* / M. Nakamura, K. Kido, J. Kinjo, T. Nohara // Phytochemistry. — 2000. — No 53. — P. 253–256. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(99\)00536-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(99)00536-1).
- 14 Shen Y. A unique indolo-[1,7] naphthyridine alkaloid from *Incarvillea mairei* var. *grandiflora* (Wehrn.) Grierson / Y. Shen, Y. Su, J. Tian, S. Lin, H. Li, J. Tang, W. Zhang // Chemistry & Biodiversity. — 2010. — Vol. 93. — P. 2393-2396.
- 15 Su Y.Q., S Two new alkaloids from *Incarvillea mairei* var. *grandiflora* / Y.Q. Su, Y.H. Shen, L. Sheng, T. Jian, J.M. Tian, X.H. Liu, W.D. Zhang // Helv. Chim. Acta. — 2009. — № 92. — P. 165–170.

- 16 Shen X. Monoterpene alkaloids from *Incarvillea delavayi* Bureau et Franchet and their inhibition against LPS induced NO production in BV2 cells / X. Shen, H. Chen, Sh. Li, J. Li, X. Zu, X. Xu, X. Li, Y. Shen // Chemistry & Biodiversity. — 2021. — Vol. 19. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202101013>.
- 17 Shen T. Hepatoprotective effect of phenylethanoid glycosides from *Incarvillea compacta* against CCl4-induced cytotoxicity in HepG2 cells / T. Shen, X. Li, W. Hu, L. Zhang, X. Xu, H. Wu, L. Ji // J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. — 2015. — No 58. — P. 617–625. <https://doi.org/10.1007/s13765-015-0076-0>.
- 18 Wu H.F. A new phenylethanoid glycoside from *Incarvillea compacta* / H.F. Wu, Y. Di Zhu, L.J. Zhang, Q.Y. Zou, L. Chen, T. Shen, X.F. Wang, G.X. Ma, B.R. Hu, W.C. Hu, X.D. Xu // J. Asian Nat. Prod. Res. — 2016. — No 18. — P. 596–602. <https://doi.org/10.1080/10286020.2015.1096931>.
- 19 Ihtesham Y. Evaluation of some biological effects of *Incarvillea emodi* (Royle ex Lindl.) Chatterjee and determination of its active constituents / Y. Ihtesham, U. Khan, Z. Dogan, V.M. Kutluay, I. Saracoglu // Kafkas Univ Vet Fak Derg. — 2019. — Vol. 25 (2). — P. 171-178. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2018.20557>.
- 20 Chen S.T. Biodiversity conservation of the genus *Incarvillea* Juss. (*Bignoniaceae*) based on molecular diversity and species richness assessment / S.T. Chen, J. Gong, K.Y. Guan, Z.K. Zhou // Journal of Plant Biology. — 2010. — Vol. 53(6). — P. 387-394. <https://doi.org/10.1007/s12374-010-9127-6>.
- 21 Калинин Ф. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Калинин, В. Сарнацкая, В. Полищук. — Киев: Наук. думка, 1980. — 487 с.
- 22 Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
- 23 Novorka T. Micropropagation of *Incarvillea delavayi* Bureau et Franchet (*Bignoniaceae*) / T. Novorka, I. Viehmannova, J. Vitamvas, P. Sepkova, E. Fernander // Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. — 2019. — Vol. 67 (6). — P. 1453-1456.
- 24 Hu Z. High efficiency *in vitro* plant regeneration from cotyledon explant of *Incarvillea sinensis* / Z. Hu, W. Li // In vitro cellular & Developmental Biology. Plant. — 2005. — Vol. 41(5). — P. 662-665.
- 25 Бутенко Р.Г. Культура изолированных органов и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. — М.: Наука, 1964. — 270 с.
- 26 Высоцкая О.Н. Длительное сохранение *in vitro* коллекции растений земляники / О.Н. Высоцкая // Физиология растений. — 1994. — Т. 41, № 6. — С. 935–941.

В.К. Мурсалиева, Б.Т. Сәрсенбек, А.Т. Алғазы, С.К. Турашева,
Т.М. Муханов, Т.Ш. Мурзатаева, Г.Т. Ситпаева

Недзвецкия семиреченская *Niedzwedzka semiretschenskia*

В. Fedtsch реликті эндемигінің регенерациялық қабілеті және *in vitro* енгізу

Мақалада Қазақстанның оңтүстігіндегі табиғи популяцияның бастапқы тұқымдарынан недзвецкия (инкарвиллея) семиреченская *Niedzwedzka semiretschenskia* сирек кездесетін реликті түрінің асептикалық дақпын алу бойынша тәжірибелік деректер келтірілген. Мурасиге-Скут коректік ортасының гормоналды құрамының тұқымның өнуіне, адвентивті өркендердің түзілуіне және *in vitro* тамырлануына әсері зерттелді. Асептикалық өркендерді көп реттік микроқалемшелеу кезінде көбею коэффициентін бағалау жүргізілді. *In vitro* тұқымның өнгіштігі Кноп ортасында 25%-дан аспағандығы анықталды, олардың максималды өнгіштігі топырақ субстратына әдеттегі отырғызу кезінде байқалды. Ортаға 6-бензиламинопурин цитокининін енгізу тұқым жарнағы ұлпаларынан каллус түзілуіне, нағыз жапырақтары бар өскіндердің апикальды экспланттарында адвентивті өркендердің түзілуіне әкелді. Микроклональды көбею үшін оңтайлы орта құрамына 0,5 мг/л 6-бензиламинопурин қосылатын орта болып табылатындығы анықталды, екінші пассажда максималды көбею коэффициенті 7,84 құраған. Алты ай бойы төмен оң температура жағдайында сақтау кезінде инкарвиллеяның шыны түтіктегі дақпылы өміршең болатындығы және жарық бөлмесінің стационарлық жағдайына ауыстырған кезде өсуін қалпына келтіретіндігі айқындалды. Жұмыс нәтижесінде ұлпа дақпылына енгізу, микроклональды көбею жүргізілді және *N.semiretschenskia* реликті түрінің *in vitro* депонирленген коллекциясы жасалды.

Кілт сөздер: *Niedzwedzka semiretschenkia*, регенерация, *in vitro* дақпылы.

V.K. Mursaliyeva, B.T. Sarsenbek, A.T. Algazy, S.K. Turasheva,
T.M. Mukhanov, T.Sh. Murzataeva, G.T. Sitpaeva

Establishment of *in vitro* and regeneration ability of the relict endemic *Niedzwedzka semiretschenska* B. Fedtsch

The experimental data of obtaining *in vitro* culture of the rare relict species *Niedzwedzka (Incarvillea) semiretschenska*, from the initial seeds collected in natural population in the south of Kazakhstan were presented. The influence of plant growth regulators in Murashige and Skoog nutrient mediums on seed germination, adventitious shoot formation and rooting *in vitro* was studied. The propagation coefficient for micro-cutting was estimated during four passages. It was shown, that *in vitro* germination did not exceed 25% on Knopp medium, and the maximum of germination was during seed planting in the soil substrate. The addition of 6-benzylaminopurine to the nutrient medium induced the callus formation from cotyledon's tissue and adventitious shoots from apical explants of seedlings with native leaves. It was found that the optimal for clonal propagation is the MS medium, containing 0.5 mg/l 6-benzylaminopurine; in this case, a maximum propagation coefficient of 7.84 was at the second passage. It was found during conservation at a low positive temperature for 6 months; the tube-culture plants of *Incarvillea* retain their viability and restore their growth when transferred to the stationer conditions of the light room. As a result of research the *in vitro* establishment and micropropagation of endemic species were carried out and deposited *in vitro* collection of *N. semiretschenska* was created.

Keywords: *Niedzwedzka semiretschenkia*, regeneration, *in vitro* culture.

References

- 1 Winterholler, B., Winterholler, A., Auelbekova, A.K. (2015). *Incarvillea semiretschenska* (B. Fedtssh) Grierson as an object of Kazakhstan flora biodiversity saving. *Bulletin of the Karaganda University. Biology. Medicine. Geography series*, 4(80), 4-10.
- 2 (2014). Krasnaia kniga Kazahstana. — 2-e izdanie, pererabotannoe i dopolnennoe [Red Data Book of Kazakhstan. 2nd edition, revised and supplemented]. Vol. 2: *Rasteniia* — Vol. 2: *Plants*. Astana: TOO «ArtPrintXXI [in Russian].
- 3 Walter, K.S., & Gillett, H.J. (Eds.). IUCN Red List of Threatened Plants. IUCN — The World Conservation Union. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.44833> (Accessed: 22.02.2023).
- 4 Baitulin, I.O. (2014). K voprosu o metodakh otsenki dinamicheskogo sostoianiia soobshchestv redkikh i endemichnykh vidov rastenii na fone vliianiia globalnykh izmenenii klimata [To the question about methodology approach to studying the state of the rare, endemic specie's communities with the connection of the global climatic changes]. *Doklady natsionalnoi shkademii nauk Respubliki Kazakhstan. Biologiya — Reports of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Biology*, 4, 61–68 [in Russian].
- 5 Rana, S., Luo, D., Rana, H., Cheng, S., & Sun, H. (2021). Molecular phylogeny, biogeography and character evolution of the montane genus *Incarvillea* Juss. (*Bignoniaceae*). *Plant Diversity*, 43, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2020.09.002>.
- 6 Baitenov, M.S. (1999). Flora Kazahstana. T.1: Illiustrirovanniy opredelitel semeistv i rodov [Flora of Kazakhstan. Vol. 1: An illustrated determinant of families and genera]. Almaty: Gylym [in Russian].
- 7 Kokoreva, I.I., Otradnykh, I.T., & Sedina, I.A. (2018). Sovremennaia flora Shu-Ileiskikh gor (Severnyi Tyan-Shan) [Modern flora of the Shu-Ili Mountains (Northern Tien Shan)]. *Problemy botaniki Yuzhnoi Sibiri i Mongolii. Sbornik nauchnykh statei po materialam XVIII Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii — Problems of botany in Southern Siberia and Mongolia. Collection of scientific articles based on the materials of the XVIII International Scientific and Practical Conference*, 1, 418–426 [in Russian].
- 8 Uvarova, E.I. (1984). Biologicheskoe obosnovanie introduktsii travianistykh mnogoletnikov semeistva Bignoniyevykh (*Bignoniaceae* Juss.) v Alma-Atu [Biological substantiation of the introduction of herbaceous perennials of the Bignoniaceae family (*Bignoniaceae* Juss.) in Alma-Ata]. *Extended abstract of candidate's thesis*. Almaty [in Russian].
- 9 Rahmatullah, M., Samarri, W., & Jahan, R., et al. (2010). An ethno medicinal, pharmacological, and phytochemical review of some Bignoniaceae family plants and a description of Bignoniaceae plants in folk medicinal uses in Bangladesh. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 4(3), 236-253.
- 10 Guo, J., Zhang, D., Yu, C., Yao, L., Chen, Z., Tao, Y., & Cao, W. (2019). Phytochemical analysis, antioxidant and analgesic activities of *Incarvillea compacta* Maxim from the Tibetan plateau. *Molecules*, 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24091692>.
- 11 Zhang, J., Feng, Y., Han, S., Guan, X., He, Z., Song, C., Lv, L., & Luo, Q. (2022). *Incarvillea compacta* Maxim ameliorates inflammatory response via inhibiting PI3K/AKT pathway and NLRP3 activation. *Front. Pharmacol.*, Vol. 13, 1058012. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1058012> (Accessed: 23.02.2023).
- 12 Fu, J., Shen, Y., Qin, J., Wang, Y., Huang, Y., Zeng, Q., & Zhang, W. (2009). Chemical constituents of plants from the genus *Incarvillea*. *Chemistry & Biodiversity*, 6(6), 818-826.
- 13 Nakamura, M., Kido, K., Kinjo, J., & Nohara, T. (2000). Antinociceptive substances from *Incarvillea delavayi*. *Phytochemistry*, 53, 253-256.

- 14 Shen, Y., Su, Y., Tian, J., Lin, S., Li, H., Tang, J., & Zhang, W. (2010). A unique indolo-[1,7] naphthyridine alkaloid from *Incarvillea mairei* var. *grandiflora* (Wehrn.) Grierson. *Chemistry & Biodiversity*, 93, 2393-2396.
- 15 Su, Y.Q., Shen, Y.H., Sheng, L., Jian, T., Tian, J.M., Liu, X.H., & Zhang, W.D. (2009). Two new alkaloids from *Incarvillea mairei* var. *grandiflora*. *Helv. Chim. Acta*, 92, 165-170.
- 16 Shen, X., Chen, H., Li, Sh., Li, J., Zu, X., Xu, X., Li, X., & Shen, Y. (2021). Monoterpene alkaloids from *Incarvillea delavayi* Bureau et Franchet and their inhibition against LPS induced NO production in BV2 cells. *Chemistry & Biodiversity*, 19.
- 17 Shen, T., Li, X., Hu, W., Zhang, L., Xu, X., Wu, H., & Ji, L. (2015). Hepatoprotective effect of phenylethanoid glycosides from *Incarvillea compacta* against CC14-induced cytotoxicity in HepG2 cells. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 58, 617-625.
- 18 Wu, H.F., Zhu, Y.Di., Zhang, L.J., Zou, Q.Y., Chen, L., Shen, T., Wang, X.F., Ma, G.X., Hu, B.R., Hu, W.C., & Xu, X.D. (2016). A new phenylethanoid glycoside from *Incarvillea compacta*. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 18, 596-602.
- 19 Ihtesham, Y., Khan, U., Dogan, Z., Kutluay, V.M., & Saracoglu, I. (2019). Evaluation of some biological effects of *Incarvillea emodi* (Royle ex Lindl.) Chatterjee and determination of its active constituents. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 25(2), 171-178. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2018.20557>.
- 20 Chen, S.T., Gong, J., Guan, K.Y., & Zhou, Z.K. (2010). Biodiversity conservation of the genus *Incarvillea* Juss. (Bignoniaceae) based on molecular diversity and species richness assessment. *Journal of Plant Biology*, 53(6), 387-394. <https://doi.org/10.1007/s12374-010-9127-6>.
- 21 Kalinin, F., Sarnackaya, V., & Polishchuk, V. (1980). Metody kultury tkanei v fiziologii i biokhimii rastenii [Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry]. Kiev: Naukova dumka [in Russian].
- 22 Lakin, G.F. (1990). Biometriia [Biometrics]. Moscow: Vysshiaia shkola [in Russian].
- 23 Hovorka, T., Viehmannova, I., Vitamvas, J., Cepkova, P., & Fernander, E. (2019). Micropropagation of *Incarvillea delavayi* Bureau et Franchet (Bignoniaceae). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 67(6), 1453-1456.
- 24 Hu, Z., & Li, W. (2005). High efficiency *in vitro* plant regeneration from cotyledon explant of *Incarvillea sinensis*. *In vitro cellular & Developmental Biology – Plant*, 41(5), 662-665.
- 25 Butenko, R.G. (1964). Kultura izolirovannykh organov i fiziologiya morfogeneza rastenii [Culture of isolated organs and physiology of plant morphogenesis]. Moscow: Nauka [in Russian].
- 26 Vysotskaya, O.N. (1994). Dlitelnoe sokhranenie *in vitro* kolektsii rastenii zemliani [Long-term preservation *in vitro* collection of strawberry plants]. *Fiziologiya rastenii — Plant Physiology*, 41 (6), 935-941 [in Russian].