

¹А.Б.Мырзагалиева, ²А.Е.Оразов, ¹Б. Қайрат

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* (*HEDYSARUM ALPINUM L.*) КОПЕЕЧНИКА АЛЬПИЙСКОГО

¹ВКГУ им. С. Аманжолова, г Усть-Каменогорск, Казахстан

²КазНУ им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

В последнее время в сохранение биологического разнообразия растений получает широкое применение метод микроклонального размножения. Этот метод имеет ряд преимуществ перед традиционными способами размножения, так как благодаря микроклональному размножению получают генетически однородный посадочный материал, свободный от вирусов, кроме того, с помощью данного метода может получить высокий коэффициент размножения трудновоспроизводимых традиционными методами растений [1].

Целью нашей работы явилось изучение особенностей введения в культуру *in vitro Hedysarum alpinum L.*

Для достижения цели поставлены следующие задачи: получить первичный стерильный растительный материал для введения в культуру *in vitro* и микроклонального размножения вида *Hedysarum alpinum L.*, разработать методику введения в культуру семян; подобрать и оптимизировать состав питательных сред для культивирования эксплантов.

Копеечник альпийский – это многолетнее травянистое, ценное и хозяйственно полезное растение. Имеет толстое разветвленное корневище и многочисленные прямостоячие стебли. Соцветия представлены длинными густыми кистями. Плоды – прижато-волосистые или голые бобы. Период цветения растения – июль-август, плоды созревают в конце августа и начале сентября [2].

В лекарственных целях используется надземная часть растения, собираемая в период бутонизации и цветения. Из травы копеечника альпийского выделен ксантоновый гликозид мангиферин, который обладает высокой биологической активностью. В траве копеечника установлено также наличие флавоноидов (гиперсида, хедизарида и др.). В листьях обнаружена аскорбиновая кислота. В корневищах и корнях найдено до 30-40% полисахаридов - производных галактозы, ксилозы, галактуроновой кислоты и рамнозы. В медицине препараты из этой травы применяются как седативное и отхаркивающее средство, а также как противовирусное – при герпесе. Наличие таких полезных свойств у растения приводит к сокращению его ареала в природе [3].

Для ведения в стерильную культуру данного вида растения и получения первичного материнского материала в качестве экспланта были использованы плоды (семена). Семена являются оптимальным видом экспланта данного растения. Они хорошо переносят транспортировку, хранение и не требуют постоянного и длительного ухода. Масса семян незначительная (рис. 1).



Рисунок 1 - Работа с созревшими семенами

В качестве питательной среды была использована питательная среда по прописи Мурасиге-Скуга с добавками регуляторов роста. Приготовление и стерилизацию питательных сред для культивирования эксплантов растений проводили согласно общепринятым методикам. Для постановки эксперимента в качестве питательной среды, была использована модифицированная среда по прописи Мурасиге-Скуга с добавлениями регуляторов роста, таких как индолилуксусная кислота, бензиламинопурин, кинетин и гибберелловая кислота (таблица 2). В качестве эксплантов были использованы семена. На основе литературных данных было приготовлено пять разновидностей оптимальных питательных сред по прописи [4].

Протокол стерилизации производился по зарекомендованной и отработанной схеме (таблица 1) с применением гипохлорита натрия. В качестве схемы стерилизации использовалась схема, опубликованная нами в предыдущих трудах по данной теме исследования [5].

Таблица 1 – Схемы стерилизации

Схемы	Предковый номер применения	Стерилизующее вещество	Время контакта	Количество всаженных семян, шт.	Из них – инфицировано, шт.	Из них – без признаков инфекции, шт.
1	1	Промывка проточной водой	20 мин	10	1	9
	2	Промывка мыльной раствор	30 мин			
	3	97% этанол	5 мин			
	4	5% гипохлорит натрия	20 мин			
	5	Промывка в 4 порциях дистиллированной воды	10 мин			
2	1	Промывка проточной водой	20 мин	10	4	6
	2	Промывка мыльной раствор	30 мин			
	3	10 % раствор пероксида водорода – 20 мин	5 мин			
	4	95% этанол 5 мин	20 мин			
	5	Промывка в 4 порциях	10 мин			

дистиллированной воды

Семена прошли промывку проточной водой, следом мыльным раствором 20 мин, затем в асептических условиях ламинар бокса обрабатывали последовательно 95% этанолом 5 мин, 5% гипохлоритом натрия 20 мин и трижды ополаскивали стерильной дистиллированной водой. Количество посаженных семян в пробирках составило по 10 штук в разные по составу среды. Количество инфицированных пробирок указано в таблице 1.



Рисунок 2 - Работы в стерильных условиях



Рисунок 3 – Проросшие семена *Hedysarum alpinum L.* в стерильной среде на 8 день культивирования

Семена культивировались при температуре 25-30 °С, при фотопериодизме 16 часов в сутки. На 60 день культивирования было замечено произрастание семян на среде под номером 3 с добавлением кинетина 1 мг/л. Произрастание семян на других питательных средах, под номером 1 и 2, было замечено чуть позже, с задержкой на 3-5 суток (таблица 2).

Таблица 2 – Состав питательных сред для введения в культуру

№	Состав среды
1	MS + БАП 2 мг/л
2	MS + ИУК 0,1 мг/л, БАП 2 мг/л и пониженное содержание сахарозы 15 г/л
3	MS + ИУК 1 мг/л, БАП 1 мг/л, кинетин 1 мг/л, гибберелловая кислота 0,1 мг/л
4	MS + БАП 1 мг/л, кинетин 1 мг/л, гибберелловая кислота 0,1 мг/л
5	MS + ИУК 1 мг/л, кинетин 1 мг/л, гибберелловая кислота 0,1 мг/л

На 80 день культивирования было замечено появление настоящих листьев, что позволило перейти к дальнейшему этапу микроклонального размножения (рис. 4).



Рисунок 4 – Проросшие семена *Hedysarum alpinum* L. на 80 день культивирования

Серия экспериментов с регуляторами роста цитокининам и ауксином должны привести к активному росту изолированных семян *Hedysarum alpinum* L. Количество жизнеспособных эксплантов *in vitro* оценивалось на 8 день культивирования (рис. 5).

Таблица 3 – Количество жизнеспособных эксплантов

№	Вид	Тип питательной среды (таблица 1)	Число эксплантов	Из них жизнеспособных эксплантов	
				Численное соотношение	Процентное соотношение
1	<i>Hedysarum alpinum</i> L.	1	20	4	20 %
2		2	18	17	94,4 %
3		3	31	21	67,7 %
4		4	60	44	73,3 %
5		5	58	53	91,3%

На количество жизнеспособных эксплантов оказывает существенное влияние сочетание и концентрация регуляторов роста ауксинового и цитокининового ряда, а также концентрация сахарозы так, содержание в среде только БАП негативно влияет на жизнеспособность эксплантов (рисунок 5). Тогда как, сочетание БАП 2 мг/л и ИУК 0,1 мг/л, кинетина 1 мг/л, ГА₃ 0,1 мг/л с содержанием сахарозы 15 мг/л позволяет получить значительное число жизнеспособных эксплантов – 94,4 %. Применение питательной среды без БАП, с добавлением ИУК 1 мг/л, кинетина 1 мг/л, ГА₃ 0,1 мг/л с содержанием сахарозы 20 мг/л дало наибольшее число жизнеспособных эксплантов у *Hedysarum alpinum* L. (98,4 %). Это позволяет нам отказаться от применения БАП на этапе введения в культуру *in vitro* изолированных зародышей семян бобовых.

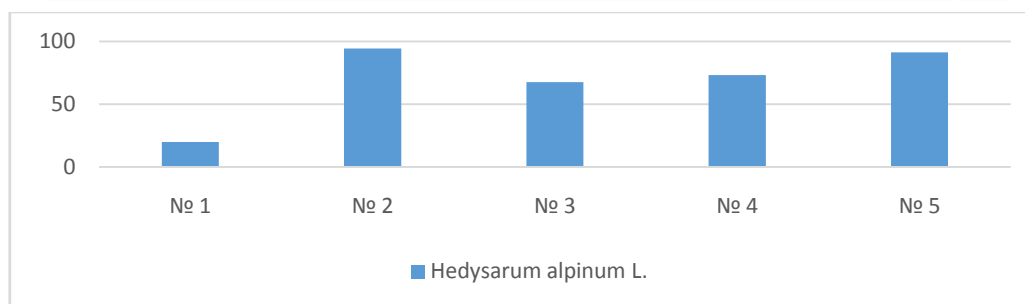


Рисунок 5 - Жизнеспособность семян

Таким образом, добавление ИУК 0,1 мг/л, БАП 2 мг/л и пониженное содержание сахарозы 15 г/л в питательную среду и культивирование при определенных условиях позволяет получить первичный материнский материал. Разработка приемов получения первичного материнского материала для микрклонального размножения *Hedysarum alpinum L. in vitro* имеет большое значение для сохранения генофонда данного вида. Исходя из этого, будет продолжен поиск и отработка оптимальных приемов и методов дальнейшего размножения в больших масштабах. Разработанные приемы получения материнского растения *Hedysarum alpinum L.* для последующего размножения во флоре Восточного Казахстана методами биотехнологии будут использованы для сохранения генофонда в коллекциях *in vitro*; полученные растения путем клонального микроразмножения будут адаптированы к открытому грунту, исследования будут продолжаться с дальнейшей интродукцией и реинтродукцией в природные популяции.

Список литературы

1. Преимущества микрклонального размножения перед традиционными способами размножения растений. История метода// http://www.biotechnolog.ru/pcell/pcell6_1.htm
2. Флора Казахстана. Том 4. – Алма-Ата: Изд-во АН КазССР, 1958. – С. 104.
3. «Флора Сибири. Fabaceae (Leguminosae)» под ред. А.В. Положий, Л.И. Малышева. – Новосибирск: Наука, 1994. – С. 280 с.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* - 1962. - Vol. 15, N 13. - P. 473-497.
5. Мырзагалиева А.Б., Акзамбек А.М., Оразов А.Е. Особенности развития *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) при микрклональном размножении в условиях культуры *in vitro* // Международная научно-практическая конференция «Современные проблемы биотехнологии: от лабораторных исследований к производству». – Алматы: КазНУ имени аль-Фараби, 2016. – 79 с.