

УДК 574; 582.4; 581.4;
МРНТИ 34.35.01; 34.29.25; 34.31.33

СОХРАНЕНИЕ IN VITRO МЯГКОПЛОДНИКА КРИТМОЛИСТНОГО MALACOCARPUS CRITHMIFOLIUS – РЕЛИКТОВОГО ВИДА МАНГЫШЛАКА

В.К. МУРСАЛИЕВА¹, А.А. ИМАНБАЕВА²

¹Институт биологии и биотехнологии растений

²Мангышлакский экспериментальный ботанический сад

Аннотация: Приведены результаты введения в культуру *in vitro* и микроклонального размножения эндемичного вида *Malacocarpus crithmifolius*, произрастающего на территории полуострова Мангышлак. Установлено, что оптимальным эксплантом для культивирования является сегмент генеративного побега с незрелыми соцветиями. При культивировании первичного экспланта на индуцирующей среде отмечается прямая регенерация адвентивных побегов из пазухи прилистника. Массовое тиражирование исходного растительного материала со средней эффективностью 1:8 достигается путем пассирования побегов на индуцирующую среду с цитокинином и ауксином с последующим укоренением отдельных побегов на среде с индолмасляной кислотой. Разработанный биотехнологический способ ускоренного размножения мягкоплодника критмолистного *in vitro* рекомендован для сохранения и дальнейшего научно-практического использования уникальных генетических ресурсов реликтового вида в нефтедобывающем регионе.

Ключевые слова: мягкоплодник критмолистный, *Malacocarpus crithmifolius*, реликтовый вид, *in vitro*, микроклональное размножение, Мангышлак

IN VITRO CONSERVATION OF MALACOCARPUS CRITHMIFOLIUS - RELICT SPECIES OF MANGYSHLAK

Abstract: The results of *in vitro* cultivation and micropropagation of *Malacocarpus crithmifolius* - endemic species from the Mangyshlak Peninsula in Western Kazakhstan are given. Generative shoot segment with an immature inflorescence is the optimal explant for cultivation. Direct regeneration of axillary shoots from primary explant is induced on the nutrient medium supplemented by cytokinin and auxin. Multiplication with average efficiency 1:8 during cultivation is achieved. Rooting of shoots on the medium with indole butyric acid is received. The developed technique *in vitro* is recommended for the conservation and scientific and practical using genetic resources of *Malacocarpus crithmifolius* in the oil producing region.

Keywords: *Malacocarpus crithmifolius*, relict species, culture *in vitro*, micropropagation, Mangyshlak

МАНГЫШЛАҚТЫҚ IN VITRO КӘДІМГІ ЖҰМСАҚ ЖЕМІС MALACOCARPUS CRITHMIFOLIUS – РЕЛИКТІК ТҮРІН САҚТАУ

Аңдатпа: Маңғышлақ түбегінің аумағында өсетін *Malacocarpus crithmifolius* эндемиялық түрінің *in vitro* әдісімен микроклоналдық көбеюінің нәтижелері келтірілген. Өсіру үшін оңтайлы экспланттар – жетілмеген генеративті өскіндер сегменттері болып табылатыны анықталды. Жетілмеген гүл шоғыры бар генеративті өскін сегменттерін өсіру үшін тиімді эксплант болып табылатыны анықталды. Индуциялаушы ортада бастапқы эксплант өсіру кезінде жапырақты бұтақшалардың қуыстарынан адвентивті өскіндердің тікелей регенерациясы байқалады. Орташа тиімділігі 1:8 болатын бастапқы өсімдік материалын жаппай тираждауға цитокининмен және ауксинмен индуцирлеуші ортаға өскіндерді пассаждаумен, кейіннен индолмай қышқылы бар ортада әжекелеген өскіндерді тамырлау арқылы қол жеткізіледі.

Тездетін көбейтудің әзірленген In vitro биотехнологиялық тәсілі реликті түрдің бірегей генетикалық ресурстарын сақтау және мұнай өндіру аймағында одан әрі ғылыми-практикалық пайдалану үшін ұсынылады.

Түйінді сөздер: кәдімгі жұмсақ жеміс, *Malacocarpus crithmifolius*, реликті түр, *in vitro*, микрোকлоналды көбею, Маңғышлақ

Введение

В настоящее время проблема сохранения биологического разнообразия имеет глобальный характер и отражена в международных и национальных стратегических документах, которые являются законодательной основой для устойчивого использования биоресурсов [1, 2].

Важнейшей частью биоразнообразия являются растения – незаменимый источник жизненно важных для человека природных веществ и материалов. Согласно Международной Конвенции ООН о биологическом разнообразии две трети видов растений в мире находятся под угрозой исчезновения вследствие антропогенного воздействия и изменения климата. В связи с этим одной из задач Глобальной стратегии для сохранения растений является «secure 75 per cent of threatened plant species in accessible *ex situ* collections probably in the country of origin, and 20 per cent of them included in recovery and restoration programmers» [1, 3].

Мангышлакская область, расположенная в пустынной зоне на западе Республики Казахстан, является одной из крупных и интенсивно осваиваемых нефтегазоносных регионов и характеризуется сложными физико-географическими условиями: резко континентальным аридным климатом, разнообразием ландшафтно-климатических зон, каждая из которых отличается своеобразным и уникальным комплексом видов. В настоящее время флористический состав Мангистауской области, согласно опубликованным данным Мангышлакского экспериментального ботанического сада (МЭБС), насчитывает 675 видов из 300 родов и 69 семейств [4]. Список редких дикорастущих видов местной флоры включает около 40 видов, многие из которых внесены в Красную книгу Казахстана и в перечень редких и находящихся под угрозой исчезно-

вания видов растений [5, 6]. Уникальность и неповторимость генетических растительных ресурсов данного региона обуславливают также произрастающие только здесь реликтовые виды [7].

Одним из таких растений является мягкоплодник критмолистный (кәдімгі жұмсақ жеміс) *Malacocarpus crithmifolius* (Retz.) С.А. Меу – реликтовый представитель древнейшего монотипного ирано-южнотуранского рода *Malococarpus* из семейства Пегановых *Peganaceae*.

M. crithmifolius единственный вид из флоры Казахстана, который занесен в 2008 году в Красный список Международного союза по охране природы (МСОП) как уязвимый вид категории III (VU) с низкой численностью популяций и ограниченным ареалом [8].

По жизненной форме растение представляет собой ягодную полукустарниковую лиану высотой до двух метров со стелющимися длинными стеблями с неправильно дважды рассеченными на ланцетно-линейные доли листьями (другое название вида - мягкоплодник рассеченнолистный). Основные местонахождения природных популяций сосредоточены на Восточном побережье Каспийского моря – Мангышлак, Бузачи, чинки Устюрта. Растет мягкоплодник на глинистых и песчаных почвах, на равнинах, на каменистых склонах предгорий и на обрывах чинков [9].

Мягкоплодник критмолистный является слабо конкурентоспособным видом, встречается спорадически и, как правило, в угнетенном состоянии. Естественное возобновление вида происходит от пня. Размножение семенами отмечается только в благоприятные по осадкам годы при достаточном количестве света среди древесно-кустарникового редколесья. Однако, в природе небольшое число особей выживает самосевом [9].

Мягкоплодник является перспективным пищевым и декоративным растением для широкого использования на засоленных неудобных землях и для введения в культуру в качестве ягодного растения в промышленных районах Мангышлака и Устюрта и в пустынных районах Центральной Азии. Сочные оранжево-красные ягоды мягкоплодника содержат много витамина С, богаты сахарами и органическими кислотами [10]. В листьях растения выявлено высокое содержание алкалоидов, идентифицирован анабазин, гидрохлорид которого используется в качестве средства, снижающего никотиновую зависимость [11]. Растение рекомендовано для использования в садоводстве для вертикального декоративного озеленения [12]. В аридной Аралокаспийской зоне мягкоплодник играет значительную роль в кормовом рационе овец и лошадей [13].

Целью исследования является разработка способа ускоренного размножения мягкоплодника критмолистного *M. crithmifolius* методом культуры тканей *in vitro*, применение которого позволит сохранить эндемичный вид, провести интродукцию и предотвратить исчезновение генетических ресурсов этого реликтового растения.

Экспериментальная часть

Семена *M. crithmifolius* из коллекции МЭБС были высажены в условия теплицы для получения донорных растений. Для введения в культуру *in vitro* использовали экспланты вегетативных побегов с верхушечной почкой и генеративных побегов с соцветиями. Введение первичных эксплантов проводили в весенний период с горшечного растения и летний период с полевых растений на этапе их вегетации-цветения.

В экспериментах применяли общепринятую методику культивирования изолированных эксплантов растений на питательной среде в условиях *in vitro* [14]. Для культивирования использовали основную среду Мура-сиге и Скуга (МС) с внесением стимуляторов роста: ауксинов; 2,4 – дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4 Д), индолилмасляная кислота (ИМК), индолилуксусная кислота (ИУК); цитокинина - 6- бензиламинопурин (БАП).

Для стерилизации исходные побеги в условиях ламинарного бокса стерилизовали 70% этиловым спиртом, затем 0,1% раствором сулемы. После стерилизации в асептических условиях каждый побег делили на узловые сегменты длиной 1,5 см и высаживали на питательную среду.

Высаженный на питательную среду материал переносили в условия световой комнаты, где поддерживали 16-часовой фотопериод, освещенность 3000 люкс, 60% влажности и температуру 24-26°C. Еженедельно визуально оценивали жизнеспособность, рост и развитие эксплантов. Перенос (пассирование) материала на свежую питательную среду проводили через каждый месяц культивирования. Коэффициент размножения (Kr) определяли, как общее количество образующихся побегов в варианте, деленное на число первичных эксплантов или пассированных микропобегов.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что экспланты вегетативных побегов с верхушечной почкой не обладают регенерационной способностью в условиях *in vitro*. При их культивировании на индуцирующей среде с БАП происходила витрификация верхушки побега и листьев, дальнейшего роста и пролиферации дополнительных почек не наблюдалось (рисунок 1 а).

При культивировании эксплантов генеративных органов на индуцирующей питательной среде отмечалась ответная морфогенетическая реакция эксплантов. Выявлено существенное влияние гормонального состава питательной среды на реализацию регенерационного потенциала эксплантов.

Основная среда МС с 1 мг/л 2,4 Д вызывала образование неморфогенного каллуса на поверхности эксплантов соцветий, который некротировался в ходе пассирования (рисунок 1 б). Тогда как культивирование на среде с внесением БАП в сочетании с ауксинами приводило к закладке дополнительных почек в пазухах прилистников (рисунок 1 в).

Приживаемость сегментов генеративных побегов была высока (72%), но морфогенетическая реакция отмечалась только у 33% вве-

денных эксплантов через неделю культивирования на среде с 4 мг/л БАП + 0,25 мг/л ИМК.

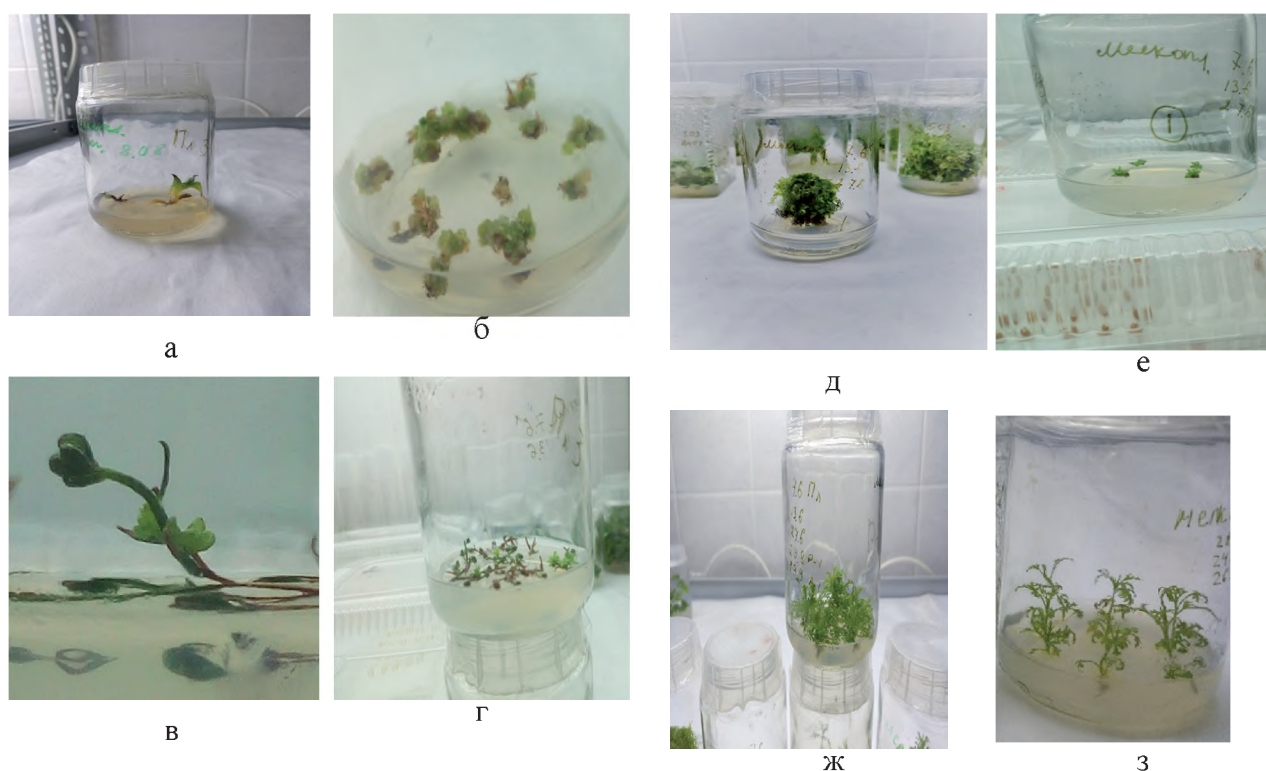
В пазухах прилистников отмечалось появление кустистых образований (рисунок 1 г), которые увеличивались в размерах и без пассирования достигали через 2,5 месяца высоты 3 см (рисунок 1 д).

При отделении вновь образованных кустистых побегов (рисунок 1 е) и их пассирования на свежие среды с пониженным уровнем БАП до 1 мг/л можно было отделить единичные побеги в количестве 8-10 штук и разделить оставшийся

плотный конгломерат на отдельные кусты для следующей пересадки (рисунок 1 ж).

В целом за 4 пассажа (введение – III пассаж) от одного исходного экспланта было получено в зависимости от гормонального состава среды от 20 до 32 побегов (таблица).

Из приведенных в таблице данных следует, что дополнительное внесение в питательную среду цитокинина БАП и ауксина ИМК или ИУК стимулирует закладку дополнительных почек и развитие из них адвентивных побегов, которые при дальнейшем трехкратном



а – верхушка вегетативного побега, б – каллус на эксплантах соцветий, в – развитие пазушных побегов в пазухах прилистников на генеративных побегах; г – регенерация кустистых побегов на эксплантах генеративных побегов; д – конгломерат побегов на 70 день на первичной среде; е – отделенные кустики, 1 пассаж; ж – развитые побеги, 3 пассаж; з – этап укоренения побегов, 5 пассаж

Рис. 1 – Микроклональное размножение мягкоплодника критмолистного *Malacocarpus crithmifolius* в условиях *in vitro*

Таблица – Регенерационная способность эксплантов цветочных побегов мягкоплодника критмолистного *Malacocarpus crithmifolius*

Гормональный состав среды МС	Количество отделенных побегов (кустов) в ходе пассирования, шт				Коэффициент размножения Кг	Укоренение по неделям после пассирования на индуцирующую среду, %		
	0	I	II	III		I	II	IV
4 БАП + 0,25 ИМК	1	4	8,5	32	8	12,5	37,5	100
1,5 БАП + 0,1 ИУК	1	5	3,5	20	4			

пассировании также продуцируют новые побеги, т.е. происходит процесс клонирования исходного растительного материала (микрореклональное размножение). Этап собственно размножения можно многократно повторять, чтобы увеличить коэффициент тиражирования и получить клоновый растительный материал, генетически не отличающийся от первоначального донорного растения.

Для получения полноценных растений-регенерантов полученные побеги пересаживали на среду для укоренения с половинной концентрацией макро- и микросолей $\frac{1}{2}$ МС с внесением ауксина. Формирование корней у асептических побегов отмечали через неделю выращивания на среде $\frac{1}{2}$ МС с внесением 0,5 мг/л ИМК. В ходе дальнейшего месячного культивирования ризогенез отмечали у всех пассированных побегов (рисунк 1 з).

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлен оптимальный для

регенерации *in vitro* эксплант генеративного побега с молодыми соцветиями, при культивировании которого на среде с БАП и ИМК/ИУК достигается прямая регенерация путем закладки дополнительных почек в пазухах прилистников. Последовательное пассирование позволяет провести собственно микро-размножение исходной культуры и получить полноценные растения-регенеранты мягкоплодника критмолистного для перевода в почвенный субстрат и адаптации к условиям *ex vitro*.

Разработанный способ микрореклонального размножения предназначен для сохранения, массового воспроизводства и хозяйственного использования генетических ресурсов дикорастущей культуры в суровых почвенно-климатических условиях пустынной Прикаспийской зоны (для озеленения городов и поселков, в садово-парковом строительстве, в фитомелиоративных мероприятиях, как плодоягодной культуры и др.).

Работа выполнена в рамках НТП на 2018-2020 гг. (№ BR05236506).

ЛИТЕРАТУРА

1. Convention on Biological Diversity. United Nations, 1992. 30 pp.
2. Национальная стратегия и План действий по сохранению и сбалансированному использованию биологического разнообразия в Республике Казахстан. – Кокчетав, 1999.
3. Рябушкина Н.А., Абугалиева С.И., Турусбеков Е.К. Проблемы изучения и сохранения биоразнообразия флоры Казахстана // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. – 2015, N. 3. Электронный источник: <http://www.biotechlink.org/3-2016/article2>
4. Каталог растений Мангышлакского экспериментального ботанического сада. – Актау, 2009. – 136 с.
5. Красная книга Казахстана. – Изд. 2-е, переработанное и дополненное. – Т. 2: Растения (колл. авторов). – Астана, ТОО «АртPrintXXI», 2014. – 452 с.
6. Перечень редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений. Постановление Правительства Республики Казахстан от 31 октября 2006 года.
7. Кудабоева Г.М. Растения Меловых Гор Северный Актау // Вестник КазНУ, экологическая серия. – 2009. – № 3 (26). – С. 19-20.
8. The IUCN Red List of Threatened Species. Электронный источник: <https://www.iucnredlist.org>.
9. Shomurodov H.F., Saribayeva Sh. U., Akhmedov A. Distribution pattern and modern status of rare plant species on the Ustyurt plateau in Uzbekistan // Arid Ecosystems. – 2015. – V5, N. 4. – P. 261-267
10. Белоусова Л.С., Денисова Л.В., Никитина С.В. Редкие растения СССР. – М., 1979. – С. 201.
11. Жарекеев В.Х., Тележенетская М.В., Юнусов С.Ю. Изучение алкалоидов *Malacocarpus crithmifolius* // Химия природных соединений. –1971. – №4. – С. 538-539.

12. Мурзова Р.М. Мягкоплодник критмолистный – *Malococarpus crithmifolius* (Retz.) С. А. Мей и биологические предпосылки к введению его в культуру: Автореф. дис... канд. биол. наук. – Ташкент, 1958. – 16 с.
13. Нурушев М.Ж., Нурушева Г.М. Эколого-экономические аспекты продуктивного коневодства Казахстана // Известия Оренбургского госуд. аграрного университета. – 2005. – Т. 3. – № 7-1. – С. 43-45.
14. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В, Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 487 с.