

В.К. Мурсалиева* , А.Т. Алғазы , Д.Н. Сатыбалдиева , Т.М. Муханов 

РГП на ПХВ «Институт биологии и биотехнологии растений», Казахстан, г. Алматы

*e-mail:gen_mursal@mail.ru

КУЛЬТУРА *IN VITRO* АДВЕНТИВНЫХ КОРНЕЙ ТУРКЕСТАНСКОГО МЫЛЬНОГО КОРНЯ *ALLOCHRUSA GYPSOPHILOIDES* (REGEL) SCHISCHK

Сокращения и обозначения

АК – адвентивные корни; ИМК – индолил-3-масляная кислота; Кр – коэффициент прироста; МС – питательная среда Мурасиге и Скуга; НУК – α -нафтилуксусная кислота, ТМК – туркестанский мыльный корень

В статье приведены экспериментальные данные по культуре адвентивных корней *in vitro* для эндемичного вида *Allochrusa gypsophiloides*, туркестанского мыльного корня – супер-продуцента тритерпеновых сапонинов. Первичная культура изолированных корней получена от исходных семян, собранных из природных популяций *A. gypsophiloides* на юге Казахстана. Изучено влияние экзогенных ауксинов, ИМК и НУК в жидкой питательной среде МС на рост корневых эксплантов, дифференцировку адвентивных корней, коэффициент прироста биомассы и биосинтетический потенциал культуры по уровню накопления тритерпеновых сапонинов *in vitro*. Установлена общая динамика роста культуры адвентивных корней: накопление максимальной биомассы и увеличение прироста на 40-50 сутки инкубации с дальнейшим снижением в ходе двухмесячного цикла культивирования. Выявлено, что стимулирующее действие ауксинов питательной среды связано с инициацией корневых апексов в индуцированной каллусной ткани, приводящая к развитию адвентивных корней и интенсивному росту дифференцированной корневой биомассы в изолированной культуре. Превышение прироста биомассы на опытных вариантах среды составило 215 % к контрольной среде с более ранним стимулирующим эффектом ИМК. Выявлено, что содержание сапонинов в экстрактах, полученных из культуры адвентивных корней превышал их средний уровень в аналогичных экстрактах из нативных корней: в 2 раза на контрольной среде, в 3 раза на среде с внесением НУК и ИМК. Повышенное содержание сапонинов *in vitro* коррелировало с увеличением прироста биомассы на ауксинсодержащих средах. Высокий уровень сапонинов в бутанольных экстрактах из остаточной культуральной среды свидетельствует об активной экссудации метаболитов из корневой биомассы в жидкую среду МС. Разработаны биотехнологические основы получения культуры *in vitro* адвентивных корней с высоким ростовым индексом и повышенным уровнем сапонинов на индуцирующих средах для альтернативного производства вторичных метаболитов из культивируемой биомассы туркестанского мыльного корня *A. gypsophiloides*.

Ключевые слова: культура тканей *in vitro*, *Allochrusa gypsophiloides*, туркестанский мыльный корень, адвентивные корни, коэффициент прироста биомассы, сапонины.

V.K. Mursaliyeva*, A.T. Algazy, D.N. Satybaldiyeva, T.M. Mukhanov

Institute of Plant Biology and Biotechnology, Kazakhstan, Almaty

*e-mail:gen_mursal@mail.ru

Adventitious root *in vitro* cultures of turkestan soaproot *allochrusa gypsophiloides* (regel) schischk

Abbreviations

AR – adventitious roots; IBA – indole-3-butyric acid; GI – growth index; MS – Murashige and Skoog medium; NAA – α -naphthalene acetic acid, TSR – turkestan soaproot

The experimental data on establishment of adventitious roots cultures of endemic species *Allochrusa gypsophiloides* (turkestan soaproot), a super-producer of triterpene saponins, are presented. The primary isolated roots culture was obtained from initial seeds collected from natural populations of *A. gypsophiloides* in the south of Kazakhstan. The influence of different types of exogenous auxins,

NAA and IBA of MS nutrient liquid medium on the root explants growth, the growth index of induced adventitious roots, and their biosynthetic potential by the saponins accumulation in vitro was studied. The general dynamics of growth was established: an increase in root biomass on 40-50's culture days with a further decrease during a two-month cycle. It was revealed that the auxin stimulating effect is associated with the initiation of root apices in the induced callus tissue, leading to the development of adventitious roots and intensive growth of differentiated root biomass in an isolated culture. The excess of biomass accumulation in the experimental variants of the medium averaged 215% compared to the control medium with an earlier inducing effect of IBA. It was found that the level of saponins in the extracts obtained from the adventitious roots culture, exceeded their content in similar extracts from native roots: 2 times in the control medium, 3 times in the medium with NAA and IBA. Saponins level increasing in culture correlated with biomass growth index on medium supplemented with auxins. The high saponins content in the extracts from the residual growth medium indicates the active exudation of saponins from the root biomass into the nutrient medium. Biotechnological bases for obtaining in vitro culture of adventitious roots with a high growth index and an increased saponins level on inducing medium for alternative production of secondary metabolites from the cultivated biomass of turkestan soaproot *A. gypsophiloides* have been developed.

Key words: tissue culture, *Allochrysa gypsophiloides*, turkestan soap root, adventitious roots, biomass growth rate, saponins.

В.К. Мурсалиева*, А.Т. Алғазы, Д.Н. Сатыбалдиева, Т.М. Муханов

Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Қазақстан, Алматы

*e-mail:gen_mursal@mail.ru

Түркістандық сабынтамырдың *allochrysa gypsophiloides* (regel) schischk in vitro жағдайдағы адвентивті тамырлар дақылдары

Қысқартулар

АТ – адвентивті тамырлар; ИМҚ – индолил -3-май қышқылы; Кр – өсуінің коэффициенті; МС – Мурасиге және Скуг қоректік; НСК – α -нафтилсірке қышқылы, ТМК – түркістандық сабынтамыр

Мақалада үштерпенді сапониндердің үздік өндірушісі болып табылатын эндемик түр түркістандық сабынтамырдың *Allochrysa gypsophiloides* in vitro жағдайдағы адвентивті тамырларының дақылдары бойынша тәжірибелік мәліметтер берілген. Оқшауланған тамырлардың біріншілік дақылдары *A. gypsophiloides*-тің Қазақстанның оңтүстігіндегі табиғи популяциясынан жиналған бастапқы тұқымдардан алынды. Мурасиге және Скуг сұйық қоректік ортасының құрамындағы экзогенді ауксиндердің – индолил май қышқылы мен нафтилсірке қышқылының тамыр экспланттарының өсуіне, адвентивті тамырлардың дифференциациясына, биомасса өсуінің коэффициентіне және дақылдың in vitro жағдайда үштерпенді сапониндердің жинақтау деңгейі бойынша биосинтетикалық потенциалына әсері зерттелді. Адвентивті тамырлар дақылдарының өсуінің жалпы динамикасы анықталды: өсірудің екі ай мерзім кезеңінде инкубацияның 40-50 тәулігінде биомассаның максималды жинақталуы және өсудің ұлғаюы мен одан кейін биомассаның төмендеуі анықталды. Қоректік орта құрамындағы ауксиндердің ынталандыратын әсері индукцияланған каллус ұлпасында адвентивті тамырлардың дамуы мен дифференциацияланған тамыр биомассасының қарқынды өсуіне әкелетін тамыр апекстерінің қалыптасуымен байланысты болатыны анықталды. Ортаның тәжірибелік нұсқаларында биомасса өсуінің артуы бақылау нұсқасына санағанда 215% және мұнда ИМҚ ынталандырушы әсері ерте болды. Адвентивті тамырлар дақылдарынан алынған экстракттарда сапониндердің мөлшері табиғи тамырлардан алынған экстракттардағы орташа деңгейінен жоғары болды: бақылау ортасында 2 есе, НСК және ИМҚ қосылған орталарда 3 есе жоғары. In vitro жағдайдағы сапониндердің жоғары мөлшері құрамында ауксиндер бар орталардағы биомасса өсуінің артуымен байланысты. Қалған дақылдық ортадан алынған бутанолды экстракттардағы сапониндердің жоғары деңгейі тамыр биомассасынан МС сұйық қоректік ортасына сапониндердің белсенді бөлініп шығуын көрсетеді. Түркістандық сабынтамырдың *A. gypsophiloides* өсірілетін биомассасынан екінші реттік метаболиттердің баламалы өндірісі үшін ынталандырушы қоректік орталарда өсу индексі мен сапониндер деңгейі жоғары in vitro адвентивті тамырлар дақылдарын алудың биотехнологиялық негіздері жасалды.

Түйін сөздер: in vitro ұлпа дақылдары, *Allochrysa gypsophiloides*, түркістандық сабынтамыр, адвентивті тамырлар, биомасса өсуінің коэффициенті, сапониндер.

Введение

Аллохруза качимовидная *Allochrusa gypsophiloides* (сем. Caryophyllaceae Juss.) – травянистый, поликарпический с моноциклическим типом развития многолетник, высотой до 90 см с мощным стержневым корнем и сильно разветвленным, шаровидным кустом «перекати-поле». Вид имеет относительно ограниченный ареал, произрастает только в Западном Тянь-Шане и Памиро – Алае в предгорных пустынных лессовых степях, по сухим склонам рек, на щебнистых склонах гор на высоте 400-1300 м н. ур. м. [1].

Редкий вид *A. gypsophiloides*, занесенный в Красную книгу Казахстана с 1981 г, является одним из ценнейших лекарственных и технических растений природной флоры Средней Азии и Казахстана [2]. Вид, широко известный как туркестанский мыльный корень (ТМК), длительное время в советские годы экспортировался и использовался для получения технического сапонина с высокой поверхностной активностью и эмульгирующей способностью [3]. ТМК содержит комплекс тритерпеновых сапонинов олеанолового ряда, из которых выделены сапонины – производные гипсогенина и квиллаевой кислоты [4].

A. gypsophiloides является фармакопейным видом, на основе корней которого получали отхаркивающие, мочегонные, слабительные средства и др. фитопрепараты [5]. Недавние исследования показали иммуностимулирующую и противовирусную эффективность экстрактов ТМК [6].

В настоящее время истощение естественных запасов и деградирующее состояние природных популяций эндемичного вида в результате активной хозяйственной деятельности в ареале его произрастания [7] обуславливают необходимость сохранения генетических запасов *A. gypsophiloides*. В связи с этим, актуальной проблемой становится разработка альтернативных подходов, позволяющих заменить дикорастущее сырьё ТМК на гарантированно получаемую растительную биомассу, содержащую в достаточном количестве биологически активные метаболиты для дальнейшего научно-практического использования уникального потенциала ценной лекарственной и технической культуры.

Эффективным инструментом для решения этой задачи является инновационная технология культуры клеток, тканей и органов

(далее культура *in vitro*), экономическая целесообразность применения которой обусловлена преимуществами изолированной системы: независимость процесса от внешних факторов (сезонные условия, достаточность сырьевой базы и др.), возможность применения различных стратегий для повышения биосинтетической активности культуры; стандартизация и автоматизация процесса для крупномасштабного производства вторичных метаболитов в биореакторах и др. [8].

Вторичный метаболизм – это генетически детерминированная особенность дифференцированных клеток и тканей растений, которая свойственна специализированным органам и на определенных фенологических фазах растений [9]. Используя исходные высокопродуктивные генотипы и дифференцированные ткани с хорошим биосинтетическим потенциалом в качестве эксплантов для инициации культуры, можно получить ценные вторичные метаболиты на уровне близком к характерному для интактных растений или повысить его выход за счет сокращения временных затрат [10].

Культура корней обладает рядом особенностей по сравнению с другими *in vitro* системами. Корни растений развиваются как экстенсивно разветвленная система, способная быстро накапливать биомассу и детерминированная на синтез и запасание вторичных метаболитов. При этом адвентивные корни (АК) развиваются естественным способом в ответ на различные стресс-факторы, не только из главного корня, но и из других частей растений (листья, побег, черешок и др.), как правило, из клеток камбия или из недифференцированной каллусной ткани, образующейся при механическом повреждении [11].

Существенным преимуществом культуры АК по сравнению с суспензией клеток является их генетическая и биосинтетическая стабильность [12]. В отличие от бородавчатых корней (hairy root), полученных в результате трансформации бактерией *Agrobacterium tumefaciens*, культура АК не содержат чужеродные для растения опинозные гены, активация которых может привести к выработке небезвредных для человека продуктов биосинтеза [10, 13].

В условиях *in vitro* АК развиваются из различных эксплантов или суспензионных культур под индуцирующим действием фитогормонов в питательной среде. При этом индуцированная культура, как правило, сохраняет

способность к интенсивному росту, быстрому накоплению биомассы и синтезу метаболита, характерного для данного таксона. Оптимизация основных трофических и гормональных факторов питательной среды позволяет добиться интенсивного роста дифференцированной биомассы и стабильного уровня биологически активного метаболита в изолированной культуре.

Культуры изолированных корней широко используются как удобные модельные системы в физиолого-биохимических, молекулярно-генетических исследований и биотехнологических разработках для выяснения влияния экзогенных факторов (регуляторов роста, элиситоров, иммобилизаторов и др.) на их рост и вторичный метаболизм [14].

В настоящее время культуры АК получены для свыше 35 видов лекарственных растений, некоторые из них применяются для коммерческого производства тритерпеновых панаксозидов (*Panax ginseng*), производных кофеиновой кислоты (*Echinaceae purpurea*), фенольных соединений (*Astragalus membranaceus*, *Hypericum perforatum*), антрахинонов (*Morinda citrifolia*), алкалоидов (*Hyoscyamus niger*, *Scopolia parviflora*) и других вторичных метаболитов, описания технологий получения которых приведены в обзорах [10, 12, 15, 16].

В мире активно разрабатываются культуры АК для сапонинопродуцирующих растений: мыльнянки лекарственной *Saponaria officinalis* [17, 18], качима метельчатого *Gypsophila paniculata* [19], женьшеня обыкновенного *Panax ginseng* [20, 21] и других видов [22, 23].

Таким образом, учитывая коммерческую ценность ТМК как супер-продуцента медицинского и технического сапонина, а также эндемичный статус редкого вида, разработка альтернативного биотехнологического способа получения вторичных метаболитов методом культуры *in vitro* является актуальной задачей.

Целью исследований являлось получить культуру адвентивных корней туркестанского мыльного корня *Allochrusa gypsophiloides* и изучить влияние гормонального состава питательной среды на рост и развитие изолированных корней, на накопление корневой биомассы и её метаболическую активность по уровню накопления сапонинов *in vitro*.

Материалы и методы

Получение семенных проростков *in vitro*

Исходным растительным материалом для получения культуры изолированных корней служили семена, собранные в 2017 году от дикорастущих растений *A. gypsophiloides* из природных популяций на территории Туркестанской области, в корнях которых ранее было выявлено значительное содержание тритерпеновых сапонинов с высокой пенообразующей и гемолитической активностью [24].

Для сохранения всхожести семенной материал в течение трех лет депонировали в криобанке в условиях жидкого азота (-196°C). Для размораживания семена предварительно выдержали в холодильной камере при 2°C в течение недели. Предобработку семян проводили 0,01 % р-ром гибберелловой кислоты в течение 2 часов и затем их переносили в условиях ламинара на питательную среду Кнопа для оценки всхожести *in vitro* и получения асептических проростков. Посадку семян проводили ежемесячно с двукратной повторностью по 30 семян в каждой. Энергию прорастания определяли на 9 день, всхожесть и частоту корнеобразования на 15 день выращивания на среде Кнопа в стационарных условиях световой комнаты: температура 25-26°C, 16-ти часовой фотопериод, освещение 3000 люкс/м².

Культивирование корневых эксплантов

В экспериментах *in vitro* использовали общепринятую методику культивирования эксплантов [25]. В качестве первичных эксплантов для получения культуры АК от асептических проростков двухнедельного возраста изолировали кончики главных и боковых корней длиной 10-12 см. Культивирование корневых эксплантов проводили в колбах объемом 100 мл, содержащие 50 мл питательной среды, на орбитальных качалках (IKA, Germany) со скоростью 100 оборотов/мин при комнатной температуре в условиях искусственного затенения.

В качестве контроля *in vitro* использовали основную жидкую питательную среду Мурасиге и Скуга с половиной концентрацией макро- и микросолей (½ МС) без регуляторов роста, опытные варианты – ½ МС с внесением ауксинов в концентрации 1 мг/л: индоллил-3-масляная кислота (ИМК) или α-нафтил-уксусная кислота

(НУК). В работе использовали сухие питательные смеси и регуляторы роста производства фирмы Sigma-Aldrich (США).

В культуральную колбу инокулировали по 10 корневым эксплантам с общим средним сырым весом 7,6 мг. Повторность опытов 3-5 кратная в каждом варианте. Длительность цикла культивирования составила 70 суток, в ходе которой проводились фенологические наблюдения и отбор материала с интервалом 10 дней для определения сырого и сухого веса корневой биомассы. Полученные средние данные по биомассе выражали в г/колбу, содержащую исходно 50 мл питательной среды.

Коэффициент прироста корневой биомассы (Кг) определяли на 30, 40, 50 и 70 сутки культивирования и рассчитывали, как: (конечная масса – начальный вес)/ начальный вес. Полученные данные обрабатывали стандартными биометрическими методами [26] с вычислением средней арифметической, ошибки средней и достоверности по критерию Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$ с применением программы Microsoft Excel (2016).

Получение суммарных экстрактов сапонинов.

Этанольные экстракты из нативных корней получали из растительного материала, собранного в фазе цветения – начале плодоношения на территории Туркестанской области. Для анализа использовали корни со средними параметрами: вес 0,2 – 0,4 кг, длина 30 -50 см и диаметр 4-6 см.

Для получения суммарных спиртовых экстрактов, использовали стандартные методики с некоторыми модификациями [27]. Сухое растительное сырье корней (5 г) предварительно очищали от нежелательных примесей хлороформом с последующей экстракцией 90° этанолом (1:100) в течение 2 ч в аппарате Сосклета и далее этанольные извлечения отгоняли под вакуумом до сухого остатка с определением веса полученного экстракта.

Для получения суммарных экстрактов из культуры *in vitro*, биомассы АК общим сухим весом 2 г, полученные за период от 30-до 70-суточный период культивирования на контрольной и на опытных вариантах среды ½ МС, экстрагировали 90° этанолом по описанной выше методике.

Получение экстрактов из остаточной питательной среды после извлечения АК проводили по следующей схеме. Предварительно культуральную среду после 1,5 месячной культуры

фильтровали от остатков корней и упаривали до 30 мл на водяной бане при 80°C. Концентрат фильтрата переносили в делительную воронку и дважды добавляли равный объем бутанола для экстрагирования сапонинов, которые (как полярные соединения) при разделении переходили в верхний слой. Бутанольные фракции объединяли и отгоняли на роторном испарителе. Остатки из отгоночной колбы переносили небольшим количеством 90% этанола в выпарительную чашку с известным весом для выпаривания до сухого осадка.

Количественное определение сапонинов в экстрактах.

Определение сапонинов проводили: 1) в этанольных экстрактах из нативных корней (контроль *in vivo*); 2) в этанольных экстрактах из объединенной корневой биомассы, индуцированной *in vitro* за временной интервал от 30 до 70 суток инкубации; 3) в бутанольных экстрактах, полученных из остаточной питательной среде ½ МС после извлечения адвентивных корней на 45 сутки культивирования.

Общее содержание сапонинов определяли спектрофотометрическим методом, в основе которого лежит специфическая реакция ванилина и серной кислоты с ОН группой при C_3 атоме как в свободной, так и в гликозирированной форме сапонинов [28, 29]. Измерения оптической плотности растворов проводили при длине волны 544 нм на спектрофотометре Jenway 6305 (Англия). Результаты в пересчете на стандарт олеаноловой кислоты по концентрационной кривой ($y=4,9976x + 0,0019$, $R^2= 0,9876$) выражали в мг эквивалент на г экстракта (мгэкв/г). Статистическая обработка полученных данных по количественному анализу выполняли с использованием параметрического критерия Стьюдента согласно ГФ XI [30].

Результаты и обсуждение

Введение in vitro семенного материала.

Для получения культуры изолированных корней от исходных семян, собранных из природных популяций, на первом этапе работы, важно индуцировать прорастание семян и получить асептические проростки в качестве источника корневых апексов.

По литературным данным семена ТМК характеризуются скачкообразным длительным прорастанием и неравномерностью появления всходов, что является особенностью данной

культуры и одним из способов сохранения семенного потомства от неблагоприятных условий произрастания [31]. Семена ТМК по классификации типов покоя семян по М. Николаевой [32] относят к группе С₁ промежуточного типа покоя с умеренным характером физиологического торможения, у которых прерывание покоя может быть индуцировано различными приемами: дозреванием семян в ус-

ловиях сухого хранения, обработкой регуляторами роста и стратификацией [33].

Введение семян ТМК *in vitro* после длительного депонирования выявила зависимость темпов их прорастания от сроков посадки на среду Кнопа.

В таблице 1 приведены показатели энергии прорастания на 9 день, всхожести и корнеобразования – на 15 день после посадки семян *in vitro*.

Таблица 1 – Семенная всхожесть ТМК на среде Кнопа в зависимости от сроков посадки (%)

| Месяц посадки | Энергия прорастания | Всхожесть | Корнеобразование |
|---------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| I-II | 69,91 ± 20,29 ^{ab} | 77,32 ± 11,14 ^a | 60,65 ± 0,65 ^a |
| III-IV | 46,78 ± 7,55 ^{ab} | 54,23 ± 15,03 ^{ab} | 45,99 ± 5,95 ^b |
| V | 46,67 ± 12,07 ^{abc} | 58,57 ± 13,01 ^{ab} | 46,95 ± 12,42 ^{abc} |
| VI | 29,67 ± 1,16 ^c | 34,63 ± 6,69 ^b | 23,10 ± 3,75 ^c |
| VII | 12,25 ± 1,14 ^d | 14,40 ± 2,43 ^c | 6,62 ± 1,14 ^d |
| VIII | 1,96 ± 0,72 ^c | 2,78 ± 0,15 ^d | 0,5 ± 0,09 ^c |
| IX-X | 35,42 ± 2,95 ^{ac} | 55,63 ± 12,60 ^{ab} | 64,24 ± 3,32 ^a |
| XI-XII | 51,95 ± 0,61 ^b | 69,16 ± 13,63 ^a | 58,66 ± 15,61 ^{ab} |

Примечание: a, b, c, d, e – достоверные отличия между вариантами в столбце при $p \leq 0,05$

Вывявлено, что семена, высаженные на среду Кнопа в зимний период, имели высокие показатели всхожести до 77 % и основные всходы появлялись равномерно, в течение первой недели после посадки. При посадке семян весной показатели всхожести постепенно снижались без достоверной разницы до средних значений; всхожесть до 56 %, энергия прорастания и корнеобразование – до 47 %. Начиная с июля месяца отмечалось резкое понижение семенной всхожести до минимальных параметров в августе, 2 %, 2,78% и 0,5 % соответственно. В осенне-зимний период, с сентября по декабрь, всхожесть семян с высокой степенью достоверности повышалась до 69 %, энергия прорастания до 52 %, корнеобразование до 59 %.

В раннее проведенных исследованиях [34] по оценке лабораторной всхожести семян ТМК, установлено, что свежесобранные семена (в августе) не прорастают, что связано, с необходимостью их дозревания в ходе двухмесячного хранения. Постепенное повышение семенной всхожести было выявлено с октябрь по февраль, затем отмечалось снижение показателя до минимального значения в летний период с последующим подъемом осенью до средних показателей.

Сопоставление экспериментальных данных выявило, что основная динамика прорастания, характерная для семян ТМК, сохраняется в

культуре *in vitro*: минимальная всхожесть в летний период и повышение показателей в осенне-зимний период, которые сохраняются на среднем уровне в весенний сезон. Следовательно, оптимальным сроком введения семян ТМК в условия *in vitro* является зимне-весенний период.

Культура адвентивных корней ТМК.

Адвентивное корнеобразование — это комплексный морфофизиологический процесс, который включает редифференцировку специализированных клеток, и их переключение на дифференцировку корневых примордий и развитие корней. Условно выделяют три последующие фазы процесса: 1) индукция – молекулярные и биохимические изменения в клетках, приводящие к дедифференцировке, 2) инициация – клеточные деления и закладка корневых примордий; 3) экспрессия – рост корневых примордий и появление корней. Механизм адвентивного корнеобразования реализуется при установлении в растении необходимого гормонального баланса, который меняется в ходе инициации клеточного деления, пролиферации клеток и инициации корневых апексов [8, 13].

В культуре *in vitro* деление, растяжение и дифференциация адвентивных корней осуществляется аналогично ювенильным корням целых растений в начальные фазы их роста. Индукторами различных типов дифференцировки являются фитогормоны

или имитаторы их действия, регуляторы роста. Ранние физиологические процессы, обеспечивающие индукцию и инициацию корневых примордий, могут быть запущены под воздействием ауксинов в питательной среде. Ключевая роль ауксина в закладке и формировании адвентивного корня установлена, однако молекулярные основы процессов, в том числе гены, отвечающие за формирование адвентивных корней, ещё остаются неизученными [10].

Согласно гипотезе, Skoog и Miller (1957), решающее значение на индукцию ризогенеза *in vitro* имеет высокое отношение ауксинов к цитокинину – фитогормонов необходимых для клеточного деления и пролиферации ткани. Предполагают, что экзогенный ауксин необходим лишь на раннем этапе индукции клеточного деления, приводящего к формированию меристематических очагов. На последующем этапе закладки корневых апексов высокие концентрации ауксина выполняют ингибирующую роль. На этапе роста и развития корневых примордий требуется преобладающий уровень цитокинина, необходимого для дифференцировки тканей корня. Конкретная роль экзогенных фитогормонов в инициации роста и дифференцировки тканей *in vitro* до конца не изучена. При этом эффективность действия различных ауксинов на индукцию и пролиферацию АК различается в зависимости от исходного вида и условий культивирования [35, 36].

В связи с этим для каждой культуры необходимо оптимизировать гормональный состав

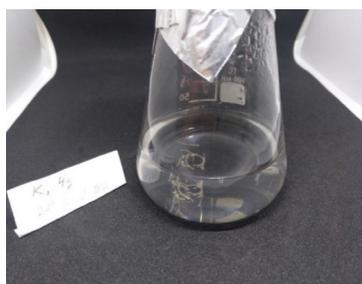
питательной среды на стадии индукции и инициации адвентивного корнеобразования. Для получения эффективной культуры АК *in vitro* необходимо прежде всего создать оптимальные условия для дифференцировки, интенсивного роста и накопления корневой биомассы, детерминированной на синтез биологически активного метаболита.

Выявлено, что выращивание апикальных эксплантов асептических корней ТМК способствует их росту и дифференцировке дополнительных адвентивных корней *in vitro*. При этом темпы и характер роста изолированных корешков варьировали в зависимости от гормонального состава питательной среды $\frac{1}{2}$ МС.

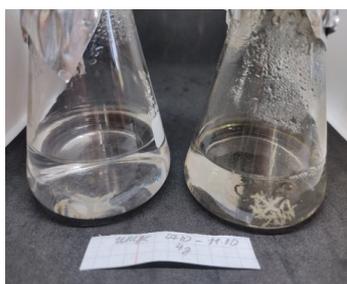
На рисунке 1 приведены фотоснимки культуральных колб с эксплантами и индуцированными корневыми биомассами на контрольной среде и опытных вариантах $\frac{1}{2}$ МС среды с внесением ауксинов ИМК и НУК.

В контроле на первом этапе культивирования отмечалась закладка и рост корешков второго порядка, затем их рост растяжением и незначительным ветвлением на второй неделе культивирования (рисунок 1 а, г).

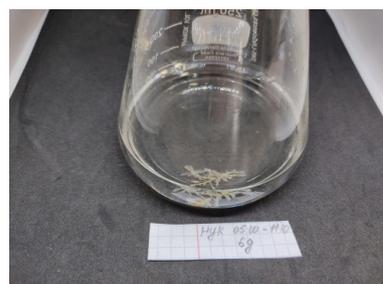
В опытных вариантах, на первом этапе происходила дедифференцировка тканей с образованием каллуса на первичных эксплантах (рисунок 1 б, в), на втором этапе – последующая массовая дифференцировка корневых апексов и отрастание адвентивных корешков. На второй неделе инкубации отмечалось развитие придаточных (латеральных) корней по всей поверхности первичных эксплантов.



а



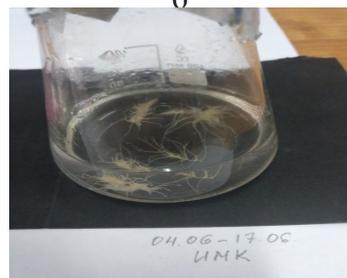
б



в



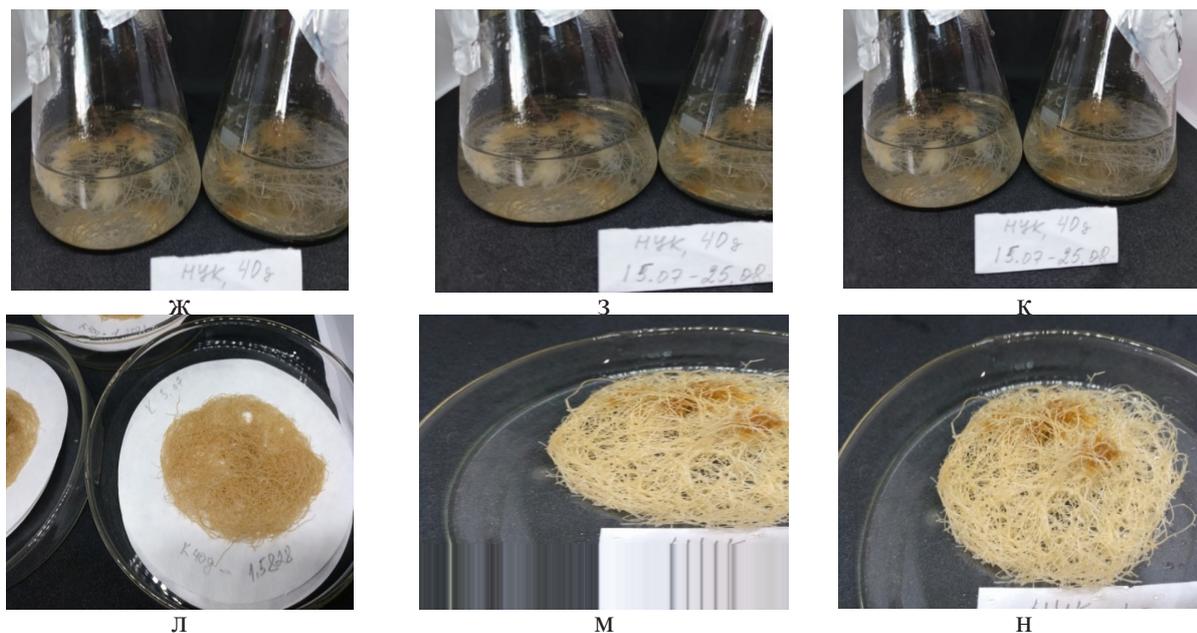
г



д



е



4 сутки культуры: а – контроль, б – ИМК, в – НУК; вторая неделя культуры: г – 12 день, контроль, д – 13 день, ИМК, е – 12 день, НУК; 1,5 месячная культура адвентивных корней; ж – контроль, з – ИМК, к – НУК; выход сырой биомассы адвентивных корней: л – контроль, 1,58 г/колба, м – ИМК, 3,24 г/колба; н – НУК, 1,42 г/колба

Рисунок 1 – Культура адвентивных корней ТМК в контроле (I) и на опытных вариантах $\frac{1}{2}$ МС среды с внесением ИМК (II) и НУК (III) в концентрации 1 мг/л

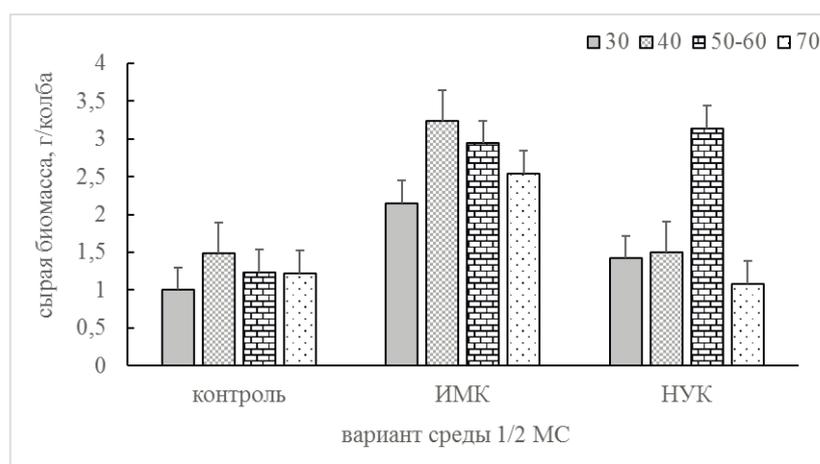
На приведенных фотоснимках в опытных вариантах отчетливо видны плотные участки каллусной ткани – центры дифференцировки адвентивных корешков, которые сохраняли регенерационный потенциал длительный период, в течение двух месяцев культивирования (рисунок 1 з, е). В отличие от контроля, роста растяжением корешков не наблюдалось.

В ходе дальнейшего культивирования в течение 1,5 месяцев биомасса культуры АК нарастала как на ауксинсодержащих средах, так и на контрольной среде. Пролиферативная активность индуцированной культуры на этом этапе приводило к быстрому разрастанию корневой биомассы. По темпам роста и развития адвентивных корешков на опытных вариантах отмечались различия: культура на среде с ИМК

развивалась более интенсивно, чем на среде с НУК (рисунок 1 д, е).

Выявлено стимулирующее действие экзогенных ауксинов на процесс дифференцировки адвентивных корней, накопление их биомассы и индекс роста *in vitro*. При этом эффективность и сроки индуцирующего действия на накопление биомассы варьировали в зависимости от типа ауксина. Обнаружено, что выход сухой массы корней достоверно не отличался между вариантами и составил в среднем: в контроле – 11,66 %, на ИМК – 9,42 %, на НУК – 11,27 %.

На рисунке 2 приведены средние данные по сырой биомассе адвентивных корней с интервалом 10 дней на контрольной и опытных вариантах среды в ходе двухмесячного цикла культивирования.



НУК – нафтилуксусная кислота, ИМК – индолилмасляная кислота, 30,40,50-60,70 – сутки культивирования

Рисунок 2 – Накопление биомассы адвентивных корней *in vitro* на $\frac{1}{2}$ МС без гормонов (контроль), с внесением НУК и ИМК в концентрации 1 мг/л

Выявлена общая динамика накопления биомассы в ходе культивирования, которая проявлялась как в контроле, так и в опытных вариантах: максимальное увеличение биомассы – на 40-50 дни выращивания, и снижение в ходе дальнейшего культивирования.

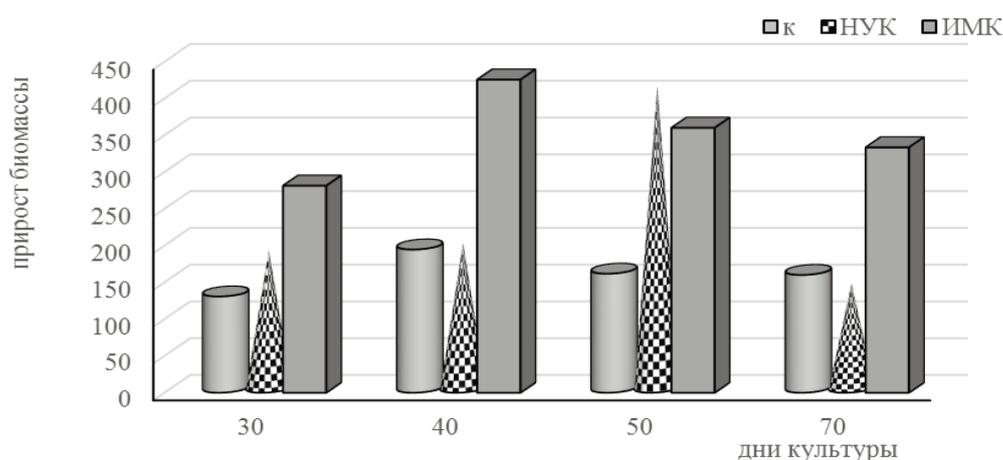
Культивирование эксплантов на контрольной среде в течение месяца приводило к накоплению в среднем 1 г сырой биомассы и 0,11 г сухого веса (с. в.) на колбу. При удлинении сроков инкубации эксплантов до 40 дней отмечалось максимальное накопление сырой биомассы в среднем 1,48 г (с. в. 0,16 г). В последующем, на 50-е и 70-е дни культивирования биомасса корней незначительно уменьшалась без достоверной разницы. В целом, в контроле накопление сырого веса корней существенно не менялось и сохранялось на уровне 1,2 г.

На среде с внесением НУК сырой вес корней 1,42 г (с. в. 0,16 г) 30-дневной культуры практически соответствовал максимальному весу контрольных на 40-дни. Максимальная биомасса корней на среде с НУК составила 3,13 г (с. в. 0,45 г) на второй месяц выращивания, которая затем снижалась до 1 г (с. в. 0,09 г) на 70-сутки культуры.

Наиболее выраженный ускоренный эффект на увеличение корневой биомассы оказывал экзогенный ауксин ИМК. Добавление ИМК в питательную среду стимулировало накопление 1,41 г сырой биомассы (0,12 г с. в.) на 20-дни культуры, аналогичное контролю на 40-сутки и варианту с НУК – на 30-сутки культуры. При удлинении срока выращивания на среде с ИМК до 30 и 40 дней, накопление сырого веса корней увеличилось до 2,1 г (с. в. 0,26 г) и 3,2 г (с. в. 0,33 г), соответственно.

Таким образом, в варианте среды с НУК отмечалось ускорение роста культуры на 10 дней и двукратное превышение максимальной биомассы корней по сравнению с контролем. Максимальный средний прирост биомассы достигался на среде с НУК на второй месяц культуры, тогда как на среде с ИМК на 40-сутки выращивания.

На рисунке 3 приведены средние данные по коэффициенту прироста биомассы K_t по отношению к исходному сырому весу первичных эксплантов (7,6 мг) в ходе культивирования на индуцирующих средах и в контроле на 30-е, 40-е, 50-е и 70-е дни инкубации.



к – контроль, НУК – нафтилукусная кислота, ИМК – индолилмасляная кислота

Рисунок 3 – Прирост биомассы адвентивных корней *in vitro* на контрольной и опытных вариантах среды $\frac{1}{2}$ МС с 1 мг/л НУК и ИМК

К концу первого месяца инкубации Кг составил: в контроле – 131, на среде с НУК – 187, на среде с ИМК 282. Максимальное увеличение биомассы на всех вариантах среды отмечалось на 40-50 дни выращивания, которое в ходе дальнейшего культивирования снижалось.

В контроле показатель прироста биомассы увеличивался от 131 до 195 на 40-е дни инкубации, и далее постепенно снижался до Кг 160 к концу второго месяца.

Прирост биомассы корней на среде с НУК отмечался на уровне контроля в начальный период культуры, затем повышался до значения 412 к 50-м дням культуры и к концу второго месяца снижался ниже контроля, до 142.

В варианте опыта с ИМК на 40-е дни культуры отмечался максимальный прирост Кг 425,8 на всем протяжении культивирования, с двукратным превышением контроля и варианта с НУК аналогичного срока культуры. В ходе дальнейшего

культивирования показатель прироста постепенно снижался до 334 к 70 дню культуры.

Таким образом, полученные максимальные показатели следующие: на среде с ИМК – биомасса 3,24 г/колба, Кг 426 на 40-е дни культуры; на среде с НУК – 3,13 г., Кг 412 на второй месяц культуры; в контроле – 1,5 г, Кг 195 через полтора месяца культуры. Максимальное превышение на опытных вариантах среды с ИМК и НУК по отношению к контролю не отличалось и составило: по биомассе 212 % и 216 %, по Кг – 211 % и 218%, соответственно.

Сравнительный анализ содержания сапонинов ТМК в культуре in vitro.

В таблице 2 приведено содержание сапонинов в этанольных экстрактах, полученных из нативных корней ТМК (корни *in vivo*), из суммарной корневой биомассы АК и в бутанольных экстрактах остаточной питательной среды, полученных за полтора месяца культивирования.

Таблица 2 – Содержание сапонинов в суммарных экстрактах ТМК

| Вариант $\frac{1}{2}$ МС* среды | Содержание сапонинов, мгэкв/г экстракта | |
|---------------------------------|---|------------------------------|
| | биомасса адвентивных корней | остаточная питательная среда |
| Контроль (без ауксинов) | 14,63 ± 0,50 ^a | 32,29 ± 3,54 ^a |
| 1 мг/л НУК | 29,77 ± 2,14 ^b | 39,26 ± 11,21 ^a |
| 1 мг/л ИМК | 30,77 ± 5,15 ^b | 41,53 ± 3,70 ^a |
| корни <i>in vivo</i> | 21,92 ± 2,58 ^c | |

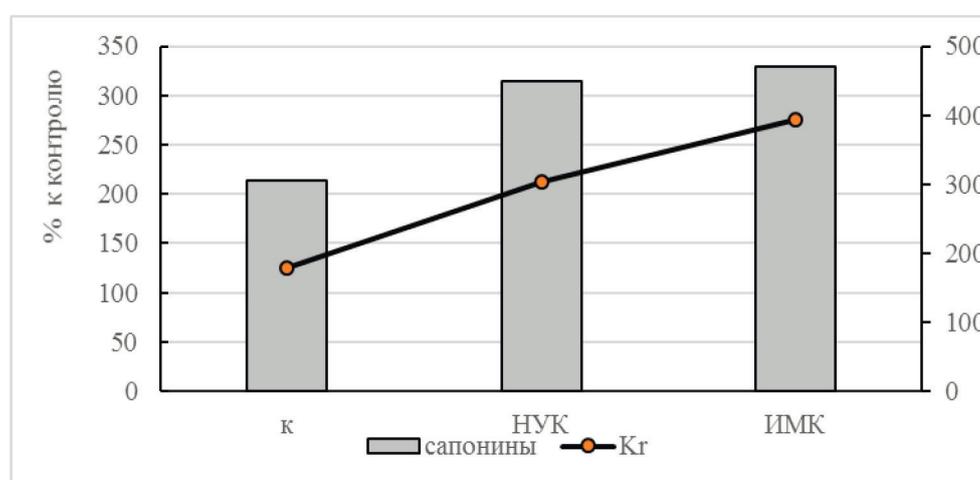
* – среда Мурасиге и Скуга с половинным содержанием макро- и микросолей; ^{a,b,c} – достоверные отличия между вариантами в столбце при $p \leq 0,05$

Из приведенных в таблице 2 данных следует, что уровень сапонинов в корневой биомассе, полученной на контрольной среде был почти в два раза ниже, чем в корнях, индуцированных на среде с внесением ИМК и НУК. При этом уровень сапонинов в контрольных корнях *in vitro* достоверно был ниже по сравнению с аналогичными экстрактами из нативных корней.

Выявлено, что экстракты из остаточной культуральной среды существенно не отличались по накоплению в них сапонинов: 32,3 мгэкв/г в контроле, 41,5 мгэкв/г в варианте с ИМК, и около

40 мгэкв/г – в среде с НУК. Высокий уровень сапонинов, выявленный во всех экстрактах культуральной среды, свидетельствует об активном выходе сапонинов из корней в окружающую жидкую среду, что облегчает процесс извлечения конечных метаболитов из культуры.

На рисунке 4 приведены обобщённые диаграммы, отражающие уровень сапонинов в экстрактах, полученных от 30-45 дневной культуры *in vitro* по отношению к их содержанию в нативных корнях и коэффициенты прироста по вариантам среды.



к – контрольная среда, НУК – нафтилуксусная кислота, ИМК – индолилмасляная кислота, Кг – коэффициент прироста биомассы

Рисунок 4 – Уровень сапонинов в экстрактах ТМК, полученных из культуры адвентивных корней к их содержанию в нативных корнях и коэффициенты прироста биомассы адвентивных корней на 30-сутки культуры

При сопоставлении суммарного содержания сапонинов в изолированной культуре с показателем нативных корней, выявлено, что в культуре *in vitro* превышение составило: на контрольной среде 214 %, на среде с НУК и ИМК, 315 % и 330 %, соответственно. Повышенный уровень сапонинов коррелирует с увеличением прироста биомассы адвентивных корней на индуцирующих средах с добавлением ауксинов.

Обзор литературы по теме исследований показал, что стимулирующий эффект ауксинов на увеличение биомассы адвентивных корней установлен для разных видов. При этом эффективность действия различных ауксинов на пролиферацию АК различается в зависимости от вида растения. Так, в культуре адвентивных

корней женьшеня *Panax ginseng* в стандартных условиях выращивания на среде МС с 24,6 μM (5 мг/л) ИМК накопление биомассы за два месяца составило 2,1 г/100 мл среды, содержание сапонинов не превышало 0,72 мг/г сырого веса [20]. Высокий уровень сапонинов 29,5 мг/г сырого веса выявлен в культуре корней первоцвета *Primula veris* на индуцирующей среде с ауксином в сочетании с кинетином [37]. В культуре изолированных корней *Gypsophilla* ssp. накопление сапонинов варьировало от минимального, 7 мг/г, до максимального уровня, 65 мг/г, в зависимости от линии исходных корней [19]. В работе М. Simao с соавторами [38] показана эффективность действия НУК по сравнению с другими ауксинами на

пролиферативную активность адвентивных корней пасифлоры *Passiflora pohlii* Mast.

Заключение

Полученные данные позволяют утверждать, что разработка культуры адвентивных корней туркестанского мыльного корня является перспективной в качестве инновационной технологии для альтернативного получения коммерчески ценных тритерпеновых сапонинов эндемичного вида аллохрузы качимовидной *A. gypsophiloides*.

Ключевыми факторами для получения высокоэффективной культуры адвентивных корней ТМК являются использование корневых эксплантов от исходных высокопродуктивных генотипов, детерминированных на накопление вторичных метаболитов и оптимальный гормональный состав питательной среды, обеспечивающий быстрый рост культуры и активный синтез вторичных метаболитов в изолированной культуре.

На основании исследований и анализа экспериментальных данных можно сделать следующие выводы:

1. Оптимальными для получения культуры адвентивных корней являются экспланты корешков проростков от исходных семян с оптимальным сроком их введения *in vitro* в зимне-весенний период.

2. Стимулирующее действие экзогенных ауксинов связано с индуцированием каллусо-

генеза на первичных эксплантах с последующей массовой дифференцировкой в каллусной ткани корневых апексов, массовым развитием адвентивных корешков с образованием разветвленной корневой сети. Индуцированный ризогенез на ауксинсодержащих средах приводил к двукратному накоплению корневой биомассы по сравнению с контрольной средой и трехкратному повышению уровня сапонинов в культуре *in vitro* относительно их содержания в нативных корнях.

3. Тип ауксина (НУК или ИМК) не оказывал существенного влияния на максимальные значения ростового индекса культуры, показатели накопления биомассы и содержания сапонинов, но влиял на скорость протекания индуцированных процессов. Ауксин ИМК оказывал более раннее стимулирующее действие: по отношению к контрольной среде на 20 дней, к варианту с НУК на 10 дней.

Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования

Проведенные исследования выполнены при грантовом финансировании Министерства образования и науки Республики Казахстан (№AP09258985), договор № 121/36-21-23 от 6 апреля 2021 года.

Литература

1. Кукунов М.К. Ботаническое ресурсосведение Казахстана. – Алматы: Гылым, 1999. – 160 с.
2. Красная книга Казахстана. – Изд. 2-е, переработанное и дополненное. Том 2: Растения (колл. авторов). – Астана, ТОО «ArtPrintXXI», 2014. – С. 60.
3. Eisenman S.W., Strume L., Zurov D.E. Medical plants of Central Asia: Uzbekistan and Kyrgyzstan. – Springer Science & Business Media, 2012. – P. 15-273. DOI: <https://www.springer.com/gp/book/9781461439110>.
4. Battger S., Melzig M.F. Triterpenoid saponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family // *Phytochemistry Letters*. – 2001. – Vol. 4, N. 2. – P. 59-68. DOI: 10.1016/j.phytol.2010.08.003.
5. Грудзинская Л.М., Гемеджиева Н.Г., Нелина Н.В., Каржаубекова Ж.Ж. Аннотированный список лекарственных растений Казахстана. – Алматы, 2014. – С. 55.
6. Tumagambetova A., Alexyuk P., Bogoyavlenskij V., Zaitseva E., Omirtaeva M., Alexyur M., Sokolova N. Adjuvant activity of saponins from Kazakhstani plants on the immune response to the subunit influenza vaccine // *Archives of Virology*. – 2017. – T.162. – № 12. – С. 3817-3826. DOI: 10.1007/s00705-017-3560-5.
7. Гемеджиева Н., Мурсалиева В., Муханов Т. Оценка современного состояния природных популяций *Allochrysa gypsophiloides* в Южно-Казахстанской области // *Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская*. – 2016. – № 1(313). – С. 22-29. DOI: <http://www.biological-medical.kz/ru/archive/%E2%84%961.html>.
8. Murthy H.N., Lee K., Paek K. Production of secondary metabolites from cell and organ culture: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation // *Plant Cell Tissue Organ Culture*. – 2014. – Vol.118, N.1. – P. 1-16. DOI: 10.1007/s11240-014-0467-7.

9. Пасешниченко В.А. Растения-продуценты биологически активных веществ // Соровский образовательный журнал. – 2001. – №7 (8). – С. 13-19. DOI: http://window.edu.ru/resource/599/20599/files/0108_013.pdf.
10. Khanam M. N., Anis M., Javed S., Mottaghipisheh J., Csupor D. Adventitious root culture – an alternative strategy for secondary metabolite production: a review. – *Agronomy*. – 2022. – Vol. 12, N. 5, 1178. DOI:10.3390/agronomy12051178
11. Steffens B., Rasmussen A. The physiology of Adventitious Roots // *Plant Physiology*. – 2016. – Vol. 170, N. 2. – P. 603-617. DOI: www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.15.01360.
12. Tien, Le. Root cultures for secondary products. In *Plant Roots*, edited by Yildirim E., Turan M., Ekin M. – London: IntechOpen, 2020. DOI: 10.5772/intechopen.94419
13. Murthy H., Dandin V., Paek K. Tools for biotechnological production of useful phytochemicals from adventitious root cultures // *Phytochemistry Reviews*. – 2014. – V.15, N. 1. – P. 129-145. DOI: 10.1007/s11101-014-9391-z.
14. Espinosa-Leal C., Puente-Garza C., Garcia-Lara S. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds // *Planta*. – 2018. – Vol. 248, N.1. – P.1-18. DOI: 10.1007/s00425-018-2910-1.
15. Karuppusamy S. A review on trends in production on secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures // *Journal of Medicinal Plants research*. – 2009. – Vol. 3, N. 13. – P. 1222- 1239. DOI: 10.5897/JMPR.9000026
16. Rahmat E., Kang Y. Adventitious root culture for secondary metabolite production in medicinal plants: a review // *Journal of Plant Biotechnology*. – 2019. – Vol. 46, N. 3. – P. 143-157. DOI: 10.5010/jpb.2019.46.3.143.
17. Cola D., Domenico D., Poma C., Spano L. Saponin production from in vitro cultures of the soapwort *Saponaria officinalis* L. // *Plant Cell Reports*. – 1997. – Vol. 17, P. 55–59. DOI: 10.1007/s002990050351.
18. Fulcheri C., Morard P., Henty M. Stimulation of the growth and the triterpenoid saponins accumulation of *Saponaria officinalis* cell and *Gypsophila paniculata* root suspension cultures by improvement of the mineral composition of the media // *J. Agric. Food Chem*. – 1998. – Vol. 46 (5). – P. 2055- 2061.
19. Gevrenova R., Stancheva T., Voyinikov Y., Mattar L.D., Henry M. Root in vitro cultures of six *Gypsophila* species and their saponin contents // *Enzyme and Microbial technology*. – 2010. – Vol. 47. – P. 97-104. DOI:10.1016/j.enzmictec.2010.05.007.
20. Langhansová, L., Marsík, P. and Vaněk, T. Alternative production of saponins from *Panax ginsens* // *Acta Horticulture*. – 2005. – Vol. 678. – P. 45-50. DOI: <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.678.5>.
21. Choi S.M., Song S.U., Yun S.R., Kwon O.W., Seon S.H., Paek K.Y. Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system // *Plant cell, tissue organ culture*. – 2000. – Vol. 62. – P. 187-193. DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006412203197>.
22. Kikowska M., Thiem B., Sliwinska E., Rewers M., Kowalczyk M., Stochmal A., Oleszek W. The effect of nutritional factors and plant growth regulators on micropropagation and production of phenolic acids and saponins from plantlets and adventitious root cultures of *Eryngium maritimum* L. // *J. Plant Growth Regul.* – 2014. – Vol. 33. – P. 809-819.
23. Biswas T., Dwivedi U. Plant triterpenoid saponins: biosynthesis, in vitro production, and pharmacological relevance // *Protoplasma*. – 2019. – Vol. 256, N. 6. – P. 1463-1486. DOI: 10.1007/s00709-019-01411-0.
24. Мурсалиева В.К., Кожебаева Ж.С., Рахимбаев И.Р., Гемеджиева Н.Г. Качественный и количественный анализ сапонинов туркестанского мыльного корня *Allochrusa gypsophiloides* (Regel) Schischk // *Вестник КазНУ им. аль-Фараби. Серия биологическая*, 2016. – №3(68). – С.114 – 123. DOI: <https://bb.kaznu.kz/index.php/biology/article/view/1208>.
25. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 487 с.
26. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Наука, 1990. – 352 с.
27. Ковалев В.Н., Попова Н.В., Кисличенко В.С. Исакова Т.И. Практикум по фармакогнозии. – Харьков: Золотые страницы, 2003. – С. 294 – 316.
28. Hiai S., Oura H., Nakajima T. Color reaction of some saponin and saponins with vanillin and sulfuric acid // *Planta Medica*. – 1976. – Vol.29, N. 02. – P. 116-122.
29. Deepika J., Shrivastava S. Estimation of Total Phenolic, Flavonoid and Saponin Content in Different Extracts of *Butea monosperma* Bark. // *International Journal of Engineering Technology Science and Research*. – 2017. – Vol. 4, N. 7. – P. 177-182. DOI: http://ijetsr.com/images/short_pdf/1500000401_ieted149_ijetsr.pdf.
30. Государственная фармакопея СССР. Вып.2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. 11 изд. – М.: Медицина, 1991. – 400 с.
31. Беспаяев С.Б. Колючелистник качимовидный в Казахстане. (морфология, систематика, фитоценология, испытания в культуре): дис ... канд. биол. наук: 02.06.1966 / Казахский государственный университет им С.М. Кирова. – Алматы, 1966.– 183 с.
32. Nikolaeva M. Покой семян и факторы, его регулирующие. В кн.: Физиология и биохимия покоя и прорастание семян [Seed dormancy and factors that regulate it. In: Physiology and biochemistry of dormancy and seed germination] Moscow: Kolos, 1982. – С. 72-94.
33. Finch-Savage, W., and Leubner-Metzger, G. Seed dormancy and the control of germination // *New Phytologist*. – 2006. – Vol. 171, N. 3. – P. 501-523. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x.
34. Mursaliyeva V., Imambayeva A., Parkhatova R. Seed germination of *Allochrusa gypsophiloides* (Caryophyllaceae), an endemic species from Central Asia and Kazakhstan // *Seed Science and Technology*. – 2020. – Vol. 48, N. 2. – P. 289-295. DOI: 10.15258/sst.2020.48.2.15.
35. Nandogopal S., Kumari B. Effectiveness of auxin induced in vitro root culture in chicory // *Journal of Central European Agriculture*. – 2007. Vol. 8(1). – P. 73-80. DOI: 10.5513/JCEA.V8I1.435

36. Muhammad A., Abbasi. B. Adventitious roots formation for enhanced and sustainable production of antioxidants in Brassica oleracea var. acephala (Brassicaceae) // Inter. J. of Secondary Metabolite. – 2019. – Vol. 6(2). – P. 162-171. DOI: 10.21448/ijsm.530027.
37. Okslar V., Plaper I., Kovac M., Eriavec A., Obermaier T., Rebec A., Rebec A., Ravnikar M., Zel J. Saponins in tissue culture of *Primula veris* L. // In vitro Cell Biol: Plant. – 2007. – Vol. 43. – PP. 644-51. DOI: 10.1007/s11627-007-9072-3.
38. Simao M., Fonseca E., Garcia R., Mansur E., Pacheco G. Effects of auxins and different culture systems on the adventitious root development of *Passiflora pohlii* Mast. and their ability to produce antioxidant compounds // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2016. – Vol. 124. – PP. 419-430. DOI: 10.1007/s11240-015-0904-2.

References

1. Battger S., Melzig M.F. (2001) Triterpenoid saponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family. *Phytochemistry Letters*, vol. 4, no 2, pp. 59-68. DOI: 10.1016/j.phytol.2010.08.003.
2. Bespaev S.B. (1966) *Kolyuchelistnik kachimovidnyj v Kazakhstane. (morfologiya, sistematika, fitocenologiya, ispytaniya v kul'ture)* [Kachimovidny thorn in Kazakhstan: morphology, systematics, phytocenology, tests in culture] dis ... kand. biol. nauk: / Kazakhskij gosudarstvennyj universitet im S.M. Kirova, Almaty, 183 p. [In Russian].
3. Biswas T., Dwivedi U. (2019) Plant triterpenoid saponins: biosynthesis, in vitro production, and pharmacological relevance. *Protoplasma*, vol. 256(6), pp. 1463-1486. DOI: 10.1007/s00709-019-01411-0
4. Choi S.M., Song S.U., Yun S.R., Kwon O.W., Seon S.H., Paek K.Y. (2000) Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system. *Plant cell, tissue organ culture*, vol. 62, pp. 187-193. DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006412203197>
5. Cola D., Domenico D., Poma C., Spano L. (1997) Saponin production from in vitro cultures of the soapwort *Saponaria officinalis* L. *Plant Cell Reports*, vol. 17, pp. 55–59. DOI: 10.1007/s002990050351.
6. Deepika J., Shrivastava S. (2017) Estimation of total phenolic, favonoid and saponin content in different extracts of *Butea monosperma* Bark. *International Journal of Engineering Technology Science and Research*, vol. 4(7), pp. 177-182. DOI: http://ijetsr.com/images/short_pdf/1500000401_ieted149_ijetsr.pdf.
7. Eisenman S.W., Strume L., Zaurov D.E. (2012) *Medical plants of Central Asia: Uzbekistan and Kyrgyzstan*. Springer Science & Business Media, p. 15-273. DOI: <https://www.springer.com/gp/book/9781461439110>
8. Espinosa-Leal C., Puente-Garza C., Garcia-Lara S. (2018) In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, vol. 248(1), pp. 1-18. DOI: 10.1007/s00425-018-2910-1.
9. Finch-Savage, W., and Leubher-Metzger, G. (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, vol. 171(3), pp. 501-523. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x
10. Fulcheri C., Morard P., Henty M. (1998) Stimulation of the growth and the triterpenoid saponins accumulation of *Saponaria officinalis* cell and *Gypsophila paniculata* root suspension cultures by improvement of the mineral composition of the media. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46 (5), pp. 2055- 2061.
11. Gemedzhieva N., Mursaliyeva V., Mukhanov T. (2016) Ocenka sovremennogo sostoyaniya prirodnyh populyacij *Allochrysa gypsophiloides* v Yuzhno-Kazakhstanskoj oblasti [Assessment of the current state of *Allochrysa gypsophiloides* (Regel) Schischk. natural populations in the South-Kazakhstan region], *Izvestiya NAN RK. Seriya biologicheskaya i medicinskaya* [News of the National academy of sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biological and medical], no. 1(313), pp. 22-29. DOI: <http://www.biological-medical.kz/ru/archive/%E2%84%961.html>. [In Russian].
12. Gevrenova R., Stancheva T., Voyinikov Y., Mattar L.D., Henry M. (2010) Root in vitro cultures of six *Gypsophila* species and their saponin contents. *Enzyme and Microbial technology*, vol. 47, pp. 97-104. DOI:10.1016/j.enzmtec.2010.05.007.
13. Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR. (1991) Vyp.2. Obshchie metody analiza. *Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e*. 11 izd. [State Pharmacopoeia of the USSR. Vol.2. General methods of analysis. Medicinal plant raw materials. 11th edition] *Medicina*, Moscow, 400 p. [In Russian].
14. Grudzinskaya L.M., Gemedzhieva N.G., Nelina N.V., Karzhaubekova Zh. Zh. (2014) Annotirovannyj spisok lekarstvennyh rastenij Kazakhstana [Annotated list of medicinal plants of Kazakhstan]. Almaty, p.55. DOI: <http://www.biological-medical.kz/ru/archive/%E2%84%961.html>. [In Russian].
15. Hiai S., Oura H., Nakajima T. (1976) Color reaction of some saponinogens and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Medica*, vol. 29, no. 02, pp. 116-122.
16. Kalinin F.L., Sarnackaya V.V., Polishchuk V.E. (1980) *Metody kul'tury tkanej v fiziologii i biohimii rastenij* [Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry]. Kiev: Naukova Dumka, 487 p. [In Russian].
17. Karuppusamy S. (2009) A review on trends in production on secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants research*, vol. 3, N. 13, pp. 1222- 1239. DOI: 10.5897/JMPR.9000026
18. Kovalev V.N., Popova N.V., Kislichenko V.S. Isakova T.I. (2003) *Praktikum po farmakognozii* [Workshop on pharmacognosy]. Kharkiv: Golden Pages, pp. 294-316. [In Russian].
19. Khanam M. N., Anis M., Javed S., Mottaghipisheh J., Csupor D. (2022) Adventitious root culture – an alternative strategy for secondary metabolite production: a review. *Agronomy*, vol. 12, no. 5, 1178. DOI: 10.3390/agronomy12051178
20. Kikowska M., Thiem B., Sliwiska E., Rewers M., Kowalczyk M., Stochmal A., Oleszek W. (2014) The effect of nutritional factors and plant growth regulators on micropropagation and production of phenolic acids and saponins from plantlets and adventitious root cultures of *Eryngium maritimum* L. *J. Plant Growth Regul.*, vol. 33, pp. 809-819.
21. *Krasnaya kniga Kazakhstana* (2014) Izd. 2-e, pererabotannoe i dopolnennoe. Tom 2: Rasteniya (koll. avtorov) [Red Book of Kazakhstan, 2nd edition, revised and supplemented], ArtPrintXXI, Astana, p. 60. [In Russian].

22. Kukenov M.K. (1999) Botanicheskoe resursovedenie Kazakhstana [Botanical resource studies of Kazakhstan]. Gylm, Almaty, 160 p. [In Russian].
23. Lakin G.F. Biometriya (1990) [Biometrics]. Nauka, Moscow, 352 p. [In Russian].
24. Langhansová, L., Marsik, P. and Vaněk, T. (2005) Alternative production of saponins from *Panax ginsens*. *Acta Horticulture*, vol. 678, pp. 45-50. DOI: <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.678.5>.
25. Muhammad A., Abbasi. B. (2019). Adventitious roots formation for enhanced and sustainable production of antioxidants in *Brassica oleracea* var. *acephala* (Brassicaceae). *Inter. J. of Secondary Metabolite*, vol. 6(2), pp. 162-171. DOI: 10.21448/ijsm.530027.
26. Mursaliyeva V., Imanbayeva A., Parkhatova R. (2020) Seed germination of *Allochrysa gypsophiloides* (Caryophyllaceae), an endemic species from Central Asia and Kazakhstan. *Seed Science and Technology*, vol. 48(2), pp. 289-295. DOI: 10.15258/sst.2020.48.2.15
27. Mursaliyeva V.K., Kozhebaeva ZH.S., Rahimbaev I.R., Gemedzhieva N.G. (2016) Kachestvennyj i kolichestvennyj analiz saponinov turkestanskogo myl'nogo kornya *Allochrysa gypsophiloides* (Regel) Schischk [Qualitative and quantitative analysis of saponins in *Allochrysa gypsophiloides* (Regel) Schischk]. *KazNU Bulletin. Biology series*, no. 3(68), pp. 114 – 123 [In Russian]. DOI: <https://bb.kaznu.kz/index.php/biology/article/view/1208>.
28. Murthy H., Dandin V., Paek K. (2014) Tools for biotechnological production of useful phytochemicals from adventitious root cultures. *Phytochemistry Reviews*, 15(1), 129-145.
29. Murthy H.N., Lee K., Paek K. (2014) Production of secondary metabolites from cell and organ culture: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, vol. 118, no 1, pp. 1-16. DOI: 10.1007/s11101-014-9391-z.
30. Nandogopal S., Kumari BDR. (2007) Effectiveness of auxin induced in vitro root culture in chicory. *Journal of Central European Agriculture*, vol. 8(1), pp. 73-80. DOI: 10.5513/JCEA.V8I1.435
31. Nikolaeva M. (1982) Pokoj semyan i faktory, ego reguliruyushchie. V kn.: *Fiziologiya i biokhimiya pokoya i prorastanie semyan* [Seed dormancy and factors that regulate it. In: *Physiology and biochemistry of dormancy and seed germination*] Kolos, Moscow, pp. 72-94. [In Russian].
32. Okslar V., Plaper I., Kovac M., Eriavec A., Obermaier T., Rebec A., Ravnikar M., Zel J. (2007). Saponins in tissue culture of *Primula veris* L. *In vitro Cell Dev. Biol: Plant*; vol. 43, pp. 644-51. DOI: 10.1007/s11627-007-9072-3.
33. Paseshnichenko V.A. (2001) Rasteniya-producenty biologicheski aktivnyh veshchestv [Plants as producers of bioactive compounds] *Sorovsky Educational Magazine*, vol. 7(8), pp. 13-19. DOI: http://window.edu.ru/resource/599/20599/files/0108_013.pdf. [In Russian].
34. Rahmat E., Kang Y. (2019) Adventitious root culture for secondary metabolite production in medicinal plants: a review. *Journal of Plant Biotechnology*, vol. 46(3), pp. 143-157. DOI: 10.5010/jpb.2019.46.3.143.
35. Simao M., Fonseca E., Garcia R., Mansur E., Pacheco G. (2016). Effects of auxins and different culture systems on the adventitious root development of *Passiflora pohlii* Mast. and their ability to produce antioxidant compounds. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, vol. 124, pp. 419-430. DOI: 10.1007/s11240-015-0904-2.
36. Steffens B., Rasmussen A. (2016) The physiology of Adventitious Roots. *Plant Physiology*, vol. 170(2), pp. 603-617. DOI: www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.15.01360
37. Tien, Le. (2020) Root cultures for secondary products. In *Plant Roots*, edited by Yildirim E., Turan M., Ekinci M. – London: IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.94419
38. Tumagambetova A., Alexyuk P., Bogoyavlenskij V., Zaitseva E., Omirtaeva M., Alexyur M., Sokolova N. (2017) Adjuvant activity of saponins from Kazakhstani plants on the immune response to the subunit influenza vaccine. *Archives of Virology*, Vol. 62(12), pp. 3817-3826. DOI: 10.1007/s00705-017-3560-5.