

УДК 602.6:581.4:633.91

С.К. Турашева, К.К. Богуспаев, Д.Г. Фалеев, С.Б. Оразова, Амангуль, А.С. Аксамбаева
НИИ проблем экологии, КазНУ им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
*E-mail: Svetlana.Turasheva@kaznu.kz

Оптимизация режима стерилизации эксплантов растения тау-сағыз (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse)

Проведена оптимизация условий стерилизации листовых и корневых эксплантов тау-сагыза и получена культура соматических клеток тау-сагыза. Выявлено, что наиболее эффективным стерилизующим веществом является 0,1% раствор сулемы. При использовании 0,1% раствора сулемы с длительностью экспозиции 10 мин. в сочетании с 70% этанолом наблюдается наилучший результат стерилизации. Для введения в культуру тау-сагыза использованы модифицированные питательные среды Мурасиге-Скуга (МС) и Гамборга-Эвелеге В5 (В5) с различными концентрациями фитогормонов 2,4-Д, кинетина, БАП и ИУК.

Ключевые слова: тау-сағыз, культура клеток, стерилизация, питательная среда.

S.K. Turasheva, K.K. Boguspaev, D.G. Faleev, S.B. Orazova, Amangul, A.S. Aksambayeva
**Optimization of the sterilization conditions of tau-sagyz explants
(*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse)**

In the article have been discussed about optimization of sterilization leaf and root explants of tau-sagyz. It was observed that effective agents for sterilization are 0.1 % solution of hydrargium. The apply 0.1% hydrargium solution's and 70% ethanol was optimal for sterilization of tau-sagyz explants. For introduction tau-sagyz plants in vitro culture were used Murashige-Skug (MS) and Gamborg-Evelegh B5 (B5) medium with different concentrations of phytohormones 2.4-D, kinetin, BAP and IAA.

Keywords: tau-sagyz, cell culture, sterilization, medium.

С.К. Турашева, К.К. Богуспаев, Д.Г. Фалеев, С.Б. Оразова, Амангуль, А.С. Аксамбаева
**Тау-сағыз (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse)
өсімдік эксплантарының залалсыздандыру тәртібін жетілдіруі**

Мақалада тау-сағыз өсімдігінің жапырақ және тамыр экспланттарының залалсыздандыру тәртібін жетілдіру және тау-сағыздың сомалық клетка дақылдарын алу туралы талқыланады. Зерттелген залалсыздандыратын заттардың арасында ең тиімді 0,1% сулема екендігі көрсетілген. Өсімдік материал 10 минут залалсыздандыру барысында 0,1 % сулемамен және 70 % этанолмен залалсыздандырыла өте жақсы нәтижелер пайда болады. Тау-сағызды *in vitro* культураға енгізу үшін 2,4-Д, кинетин, БАП, ИСК фитогормондардың әртүрлі концентрациялары бар Мурасиге-Скуг (МС) және Гамборга-Эвелеге В5 (В5) қоректік орталар қолданылған.

Түйін сөздер: тау-сағыз, клетка культурасы, залалсыздандыру, қоректік орта.

Эндемик тау-сағыз (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse) из семейства сложноцветных (*Asteraceae*) - редкий вид с сокращающейся численностью с дизъюнктивным тяньшанско-памироалтайским ареалом - представляет собой ценное техническое растение, лучший источник натурального каучука среди растений умеренных широт [1-3]. Известно, что 20% натурального каучука (латекса) добывают на плантациях гевеи

в Индонезии, Малайзии, Вьетнаме. В промышленных масштабах каучук производят путем химического синтеза из бутадиена и изопрена. Получаемый таким способом каучук используется в технике, например, при производстве автомобильных шин, в медицине (при производстве хирургических перчаток и медицинских изделий из латекса), в тяжелой и легкой промышленности (изделия из резины) и т.д. Однако, природный

каучук намного прочнее искусственного (синтетического), поэтому спрос на натуральный каучук растет с каждым годом, что и обуславливает поиск новых альтернативных источников натурального каучука.

В природных условиях Казахстана эндемичный вид тау-сагыз представляет собой самый оптимальный источник каучука. Вследствие того, что природные популяции тау-сагыза малочисленны, необходимо разработать технологию клонального микроразмножения каучуконоса *Scorzonera tau-saghyz*. Массовое получение эндемика с помощью биотехнологических методов позволит производить натуральный каучук в достаточном количестве. Первым этапом данной технологии является введение растений в культуру *in vitro*, что подразумевает стерилизацию исходного растительного материала, изолирование и культивирование эксплантов на питательной среде.

Целью проведения данного исследования являлась оптимизация режима стерилизации эксплантов тау-сагыза (*Scorzonera tau-saghyz Lipsch. et Bosse*).

Материалы и методы

Эксперименты по введению дикорастущих форм тау-сагыза *Scorzonera tau-saghyz* в культуру *in vitro* проводили в период активной вегетации растений (май-июнь). В качестве эксплантов для культивирования *in vitro* использовали листовые сегменты, взятые с активно вегетирующих 1-2-летних побегов, а также корневые сегменты растений. В экспериментах использовали общепринятые в биотехнологии методы культивирования изолированных клеток и тканей растений [4-7].

Для стерилизации растительного материала использовали следующие стерилизующие агенты: 70% раствор этилового спирта, 5% раствор гипохлорида натрия, 0,1% раствор сулемы, 0,5% раствор $KMnO_4$. Экспозиция растительного материала в каждом из стерилизующих растворах варьировала от 10 секунд до 10 минут.

Основной средой для культивирования эксплантов явилась среда Мурасиге и Скуга (МС) и среда Гамборга и Эвелеге (В5). Испытаны следующие варианты сред (таблица 1):

Таблица 1 – Варианты состава питательных сред, использованных для культивирования эксплантов тау-сагыза

№	Вариант питательной среды	Базовый состав среды и модификации по фитогормонам
1	Вариант 1	МС+0,5 мг/л ИУК+0,5 мг/л БАП
2	Вариант 2	МС+1 мг/л ИУК+1мг/л БАП
3	Вариант 3	МС+2 мг/л ИУК+2 мг/л БАП
4	Вариант 4	МС+0,5 мг/л 2,4Д+0,5 мг/л БАП
5	Вариант 5	МС+1 мг/л 2,4Д+1мг/л БАП
6	Вариант 6	МС+2 мг/л 2,4Д+2 мг/л БАП
7	Вариант 7	МС+2 мг/л ИУК+1мг/л БАП
8	Вариант 8	МС+2 мг/л 2,4Д+1 мг/л БАП
9	Вариант 9	Гамборга-Эвелеге В5 +0,5 мг/л ИУК+0,5 мг/л БАП
10	Вариант 10	Гамборга В5+1 мг/л ИУК+1мг/л БАП
11	Вариант 11	Гамборга В5+2 мг/л ИУК+2 мг/л БАП
12	Вариант 12	Гамборга В5+0,5 мг/л 2,4Д+0,5 мг/л БАП
13	Вариант 13	Гамборга В5+1 мг/л 2,4Д+1мг/л БАП
14	Вариант 14	Гамборга В5+2 мг/л 2,4Д+2 мг/л БАП
15	Вариант 15	Гамборга В5+2 мг/л ИУК+1 мг/л БАП
16	Вариант 16	Гамборга В5+2 мг/л 2,4Д+1 мг/л БАП

Для индукции каллусообразования культивируемые экспланты содержали в темноте при температуре 24-27 °С. Ежедневно проводился скрининг по морфо-физиологическим параметрам (морфологические изменения культивиру-

емых эксплантов, рост, увеличение объема или прирост биомассы, некротические явления). Субкультивирование эксплантов проводили через каждые 20-25 дней, на те же варианты свежих питательных сред.

Результаты и их обсуждение

Важным этапом микрклонального размножения растений является отбор экспланта и введение его в культуру *in vitro* и получение асептической культуры. Поверхностные покровы всех органов растений обычно загрязнены спорами грибов, тогда как внутренние ткани здоровых, неповрежденных растений хотя и считаются стерильными, но и здесь не может быть абсолютной стерильности. Для поверхностной дезинфекции растительного материала применяют широкий набор химических реагентов как по отдельности, так и

в комплексе друг с другом – ступенчатая стерилизация [8, 9].

Растения часто бывают заражены патогенами бактериальной природы, которые имеют латентный период внешнего проявления при культивировании. При выборе стерилизующих агентов следует учитывать их концентрацию и комбинацию, продолжительность экспозиции, тип экспланта и природу контаминации.

В данных исследованиях стерилизацию проводили в различных режимах, используя общераспространенные стерилизующие агенты и варьируя временем экспозиции в стерилизующих растворах (таблица 2).

Таблица 2 – Режим стерилизации листьев и корней тау-сагыза

Номер варианта стерилизации	Стерилизующий агент, концентрация	Время экспозиции листьев/корней в стерилизующем растворе
1 вариант	70% этиловый спирт	2 мин. листья/3 мин. корни
2 вариант	50% гипохлорид натрия	2 мин. листья/3 мин. корни
3 вариант	0,5% раствор $KMnO_4$	12 мин. листья/15 мин. корни
4 вариант	70% этиловый спирт	5 мин. листья/7 мин. корни
5 вариант	0,1% сулема	10 мин.
6 вариант	0,1% сулема	20 мин.
7 вариант	70% этиловый спирт+0,1% сулема	30 сек.+10мин.

При применении в качестве стерилизующих агентов 70% этанола, 50% гипохлорида натрия, 0,5% раствора перманганата калия (варианты 1-3) происходило 100% заражение всего растительного материала. При увеличении времени экспозиции в 70% этиловом спирте в 2,5 раза процент заражения листовых эксплантов незначительно снизился – 98 %, однако происходило полное 100% заражение корневых эксплантов (рисунок 1, 2).

Использование 0,1% раствора сулемы (5 вариант) для стерилизации растительного материала привело к значительному уменьшению процента заражения – 30% зараженных листовых эксплантов и 50% бактериального заражения корней. Увеличение продолжительности стерилизации 0,1% сулемой до 20 мин. (6 вариант) приводило к 5-кратному уменьшению заражения корневых эксплантов (10%) и полному отсутствию бактериальной и грибной инфекции на сегментах листьев тау-сагыза (0%), но также способствовало и частичному некрозу листовых эксплантов.

Поэтому было предложено в качестве основного стерилизующего агента использовать 0,1% сулему со временем экспозиции 10 мин., а для улучшения проницаемости основного стерилизующего вещества и уменьшения поверхностно-активного натяжения использовать предварительную обработку эксплантов 70% этиловым спиртом (7 вариант) (рисунок 1, 2).

Последний вариант оказался наиболее оптимальным в плане максимального проявления бактерицидных и фунгицидных свойств стерилизующего вещества и в то же время минимально повреждающим, не токсичным и щадящим для растительной ткани, об этом свидетельствует тот факт, что процент заражения листьев составил в целом 19,4%, а корней – 2,6%. Более полную картину результатов стерилизации 0,1% сулемой в сочетании с 70% этанола на различных вариантах питательных сред можно увидеть на диаграммах (рисунок 1, 2). Ниже приведены фотоснимки стерильных эксплантов корней одноклеточных растений тау-сагыза (рисунок 3).



Рисунок 1 – Процент заражения листовых эксплантов растений тау-сагыз на различных питательных средах (стерилизация 0,1% раствором сулемы в сочетании с 70% этанолом)

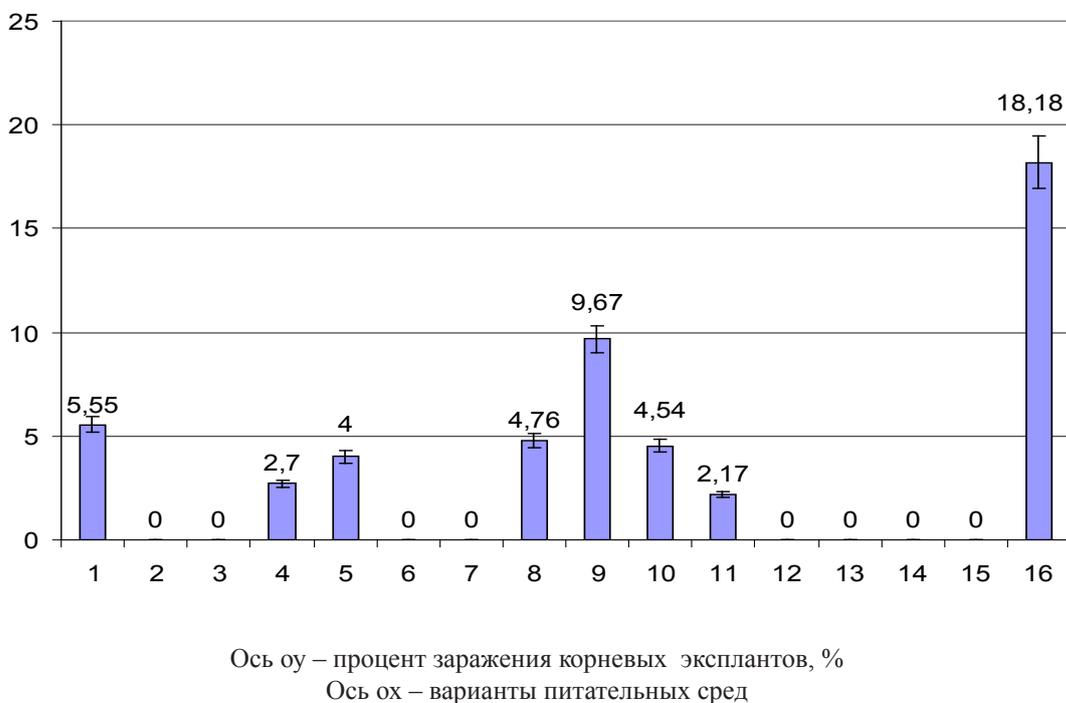


Рисунок 2 – Процент заражения корневых эксплантов растений тау-сагыз на различных питательных средах (стерилизация 0,1% раствором сулемы в сочетании с 70% этанолом)

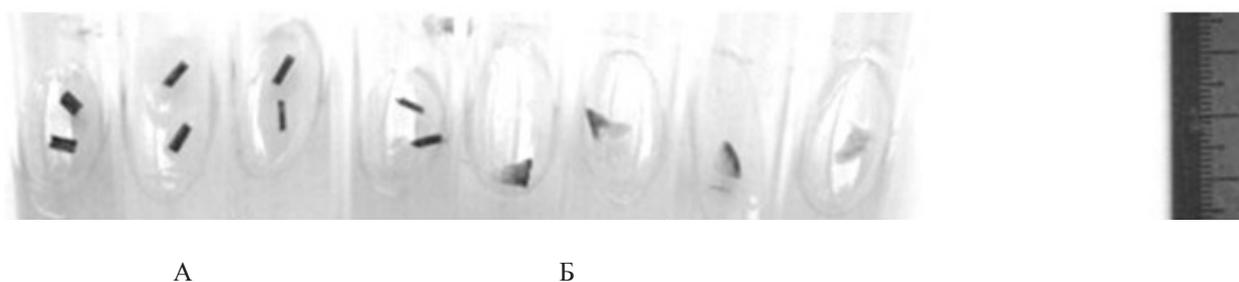


Рисунок 3 – Культивируемые экспланты листьев (А) и корней (Б) однолетних растений *Scorzonera tau-saghyz*

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что на успешное введение растений *Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse в культуру *in vitro* оказывает влияние способ стерилизации эксплантов. В ходе прове-

дения лабораторных опытов было выявлено, что наиболее эффективным является 0,1% раствор сулемы в сочетании с 70% этанолом с длительностью экспозиции 10 мин и 30 секунд, соответственно.

Литература

- 1 Павлов Н.В. Растительные ресурсы Южного Казахстана. – М.: Изд. Московского общества испытателей природы, 1947. – 9 с.
- 2 Липшиц С.Ю., Боссе Г.Г. Скорцонера тау-сагыз (Новое каучуконосное растение Казахстана). // Трест Каучуконос ВСНХ СССР. – 1930. – №4. – С. 18-22.
- 3 Липшиц С.Ю., Боссе Г.Г. Новый каучуконос Казахстана – *Scorzonera tau-saghyz* Lipschits et Bosse. // М. Тр. Всес. инст. кауч. и гуттап. – 1931. – Вып.1. – 56 с.
- 4 Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 487 с.
- 5 Мурсалиева В.К., Мухамбетжанов С.К., Нам С.В., Рахимбаев И.Р. Микрклональное размножение роз. Методическое руководство по организации и проведению работ. – Алматы, 2011. – 64 с.
- 6 Jung-Hwan Lee, Yoon Eui-Soo, Jung Su-Jin, Bae Ki-Hwa, Seo Jin-Wook, Choi Young-Eui Plant Regeneration and Effect of Auxin and Cytokinin on Adventitious Shoot Formation from Seedling Explant of *Taraxacum platycarpum*. Korean Journal Plant Biotechnology. – 2002. – Vol. 29, № 2. – pp. 111-115.
- 7 Omo-Ikerodah E.E., Omokhafa K.O., Akpobome F.A. and Mokwunye M.U. Review. An overview of the potentials of natural rubber (*Hevea brasiliensis*) engineering for the production of valuable proteins//African Journal of Biotechnology – 2009. -Vol. 8 (25). – pp. 7303-7307. –
- 8 Jung-Hwan Lee, Young-Kwan Kim, Eun-Yi Oh, Kuk-Young Jung, Kisung Ko Optimization of *in vitro* seed germination of *Taraxacum platycarpum*. Korean Journal of Environmental Agriculture. – 2009. – Vol. 28, № 4. – pp. 403-408.
- 9 Booth By A., Satchuthananthavale R. Regeneration in root cuttings of *Taraxacum officinale*. New Phitol. – 1974. – №73. – Pp. 445-452.