

Дәйексөз үшін: Туменбаева А.Р. , Тагиманова Д.С. , Райзер О.Б. , Хапилина О.Н. (2026). *Daphne altaica* Pall. өсімдігін *in vitro* ортаға енгізу кезеңін оңтайландыру. *Еуразиялық агротехникалық журнал*, 2(130), 279-289. DOI: [https://doi.org/10.51452/eaj.2026.2\(130\).2185](https://doi.org/10.51452/eaj.2026.2(130).2185)

ӘОЖ 578:581.5:582.992

Зерттеу мақаласы

Daphne altaica Pall. өсімдігін *in vitro* ортаға енгізу кезеңін оңтайландыру

Туменбаева А.Р. , Тагиманова Д.С. , Райзер О.Б. , Хапилина О.Н. 

Ұлттық биотехнология орталығы, Астана, Қазақстан

Корреспондент-автор: Туменбаева А.Р.: tumenbayeva_a@mail.ru

Бірлескен авторлар: (1: ДТ) tagds@mail.ru

(2: ОР) 2008olesya@mail.ru; (3: ОХ) oksfor@mail.ru

Келіп түсті: 01.04.2026 **Қабылданды:** 30.06.2026 **Жарияланды:** 30.06.2026

Авторлық құқық: Туменбаева А.Р. т.б. Бұл мақала ашық қолжетімділікте жарияланып, Creative Commons Attribution 4.0 халықаралық лицензиясының шарттарына сәйкес таратылады (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Түйін

Алғышарттар мен мақсат. *Daphne altaica* Pall. дәстүрлі медицинада көптеген ауруларды емдеуде қолданылатын құнды дәрілік өсімдік. Бұл түр Қазақстанға тән эндемик болып табылады және Шығыс Қазақстанның шектеулі аумақтарында таралған. Табиғи таралу аймағының тарлығы, тұқым өнімділігінің төмендігі және өсудің баяулығы бұл өсімдіктің табиғи жолмен көбеюі мен сақталуын қиындатады. Өсімдіктерді көбейтудің биотехнологиялық әдістері жабайы өсетін популяциялардың табиғи биоалуантүрлілігін сақтауға және фармацевтикалық өнеркәсіпті қажетті өсімдік шикізатымен жеткілікті қамтамасыз етуге мүмкіндік береді. Осыған байланысты зерттеудің мақсаты *Daphne altaica* өсімдігін *in vitro* культурасына енгізудің тиімділігіне және микробүршіктердің түзілуіне әртүрлі зарарсыздандыру әдістері мен фитогормондардың әртүрлі концентрацияларының әсерін зерттеу болып табылады.

Материалдар мен әдістер. Бастапқы өсімдік материалы ретінде *Daphne altaica* Pall. өсімдігінің бүршік экспланттары пайдаланылды. Асептикалық культура алу үшін беткі зарарсыздандырудың әртүрлі режимдері сыналды, олардың ішінде ең тиімдісі – 0,01% HgCl_2 ерітіндісінде 20 мин өңдеу.

Микроклоналды көбейту Мурасиге-Скуга (МС) қоректік ортасында әртүрлі өсу реттегіштерін қолдану арқылы жүргізілді. Сондай-ақ, олардың комбинацияларының экспланттардың өсуіне және морфогенетикалық белсенділігіне әсері бағаланды.

Нәтижелер. 0,01% HgCl_2 ерітіндісінде зарарсыздандыру тіндердің тіршілік қабілетін сақтай отырып, асептикалық жағдайдың жоғары деңгейін қамтамасыз етті. Қоректік ортада бүршіктердің белсенді өнуі және бүршік сабақтарының түзілуі байқалды. Микроклоналды көбейтудің ең жоғары көрсеткіштері 1,0 мг/л БАП және 0,1 мг/л НСК ерітіндісі қосылған МС-R-4 ортасында алынды, бұл *in vitro* жағдайда морфологиялық жағынан толыққанды, жақсы дамыған жапырақтары бар микробүршіктердің қарқынды түзілуіне мүмкіндік берді.

Қорытынды. Өзірленген әдіс *Daphne altaica* Pall. өсімдігінің *in vitro* жағдайда стерильді микробүршіктерін тиімді алу мүмкіндігін қамтамасыз етеді. Бұл тәсілді қолдану түрдің генетикалық ресурстарын сақтауға, оның көп мөлшерде көбеюіне және табиғи популяцияларға антропогендік жүктеменің төмендеуіне ықпал етеді.

Кілт сөздер: *Daphne altaica* Pall.; фитогормондар; *in vitro*; зарарсыздандыру; қоректік орта.

Кіріспе

Daphne L. туысына (*Thymelaeaceae* отбасы) жататын бағалы дәрілік өсімдік болып табылады. Олар флавоноидтар, терпеноидтар, кумариндер және басқа да биологиялық белсенді қосылыстар сияқты екінші метаболиттердің жоғары құрамымен ерекшеленеді, бұл заттар антиоксиданттық,

қабынуға қарсы және қатерлі ісікке қарсы әрекеттерімен белгілі [1, 2, 3]. Химиялық құрамының бай болуына байланысты дәрілік өсімдіктер медицинада, фармацевтикада және биотехнологияда табиғи қосылыстардың көздері ретінде кеңінен қолданылады, олар дәрілік препараттар жасау үшін пайдаланылады.

Daphne altaica Pall. эндемикалық түр болып табылады және негізінен Орталық Азия мен Алтай таулы аймақтарында өседі. Қазақстанда бұл түр дәстүрлі түрде халық медицинасында трахитті, тұмауды, тамақ ауруларын, ревматизмді және жылан шағуларын емдеуде қолданылады [4, 5]. Алайда табиғи популяциялар антропогендік факторлардың әсерінен, орман кесу, өсімдіктерді жинау және экожүйелердің деградациясының салдарынан азаюда, сондай-ақ олардың табиғи көбею қабілетінің шектеулі болуы себепті қысқарады [4, 6]. Сонымен қатар, жабайы өсетін шикізаттағы биологиялық белсенді заттардың мөлшері айтарлықтай өзгеріп отырады, бұл үлкен көлемде жинауды қажет етеді және түрдің жойылу қаупін тудырады [5, 7].

Дәстүрлі көбею әдістерінің (тұқымдық және вегетативтік) тиімділігі төмен, әрі тұқым қуалайтын ұрпақтың өзгергіштігі жоғалады. Осыған байланысты *in vitro* биотехнологиялық әдістер түрдің көп мөлшерде көбеюі, генетикалық ресурстарын сақтау және стандартталған отырғызу материалын алу үшін перспективалы тәсіл ретінде қарастырылады [8].

In vitro жағдайда өсірудің артықшылықтарына маусымдылық пен климаттық жағдайларға тәуелсіздік, метаболиттердің сапалық және сандық сипаттамаларын бақылау мүмкіндігі, жыл бойы өнім алу және фармацевтикалық құнды қосылыстарды алу процесін жеңілдету жатады. Бұл әдістер табиғи популяцияларға қысымды азайтуға және шикізатты тұрақты түрде алуға мүмкіндік береді [9].

Микроклоналды көбейту процесіндегі негізгі кезең *in vitro* культураға енгізу кезеңі, оның негізінде экспланттарды зарарсыздандыру жатады. Зарарсыздандыру микробтық ластануды жойып, тіндерге зақым келтірмеуі тиіс. Сонымен қатар, фитогормондардың концентрациясы мен қоректік ортаның құрамы экспланттардың морфогенетикалық реакциясына және микробұршіктердің түзілуіне тікелей әсер етеді [10, 11].

Осылайша, жұмыстың мақсаты *in vitro* жағдайда *Daphne* туысына жататын өсімдіктердің микробұршіктерінің түзілу тиімділігіне әртүрлі зарарсыздандыру әдістері мен фитогормондардың оңтайлы концентрацияларының әсерін зерттеу болып табылады.

Материалдар мен әдістер

Зерттеу үшін негізгі материал ретінде *Daphne altaica* Pall. өсімдіктері қолданылды. Өсімдік материалы Шығыс Қазақстан облысында, Алғабас ауылының айналасындағы Көктас тауларының солтүстік-батыс беткейлеріндегі шөпті шалғындардан жиналды. Бастапқы экспланттар ретінде 2025 жылғы қыркүйек айының соңында жас *Daphne altaica* Pall. өсімдіктерінен алынған сабақ бүршіктері пайдаланылды (1-сурет).

Осы кезеңде өсімдіктер вегетацияның соңғы сатысында болып, физиологиялық тыныштық күйіне өте бастады, бұл бастапқы эксплант ретінде пайдаланылған бүршіктердің физиологиялық жағдайын айқындады. Сирек және жойылып бара жатқан өсімдік түрлерін жинау қағидаларына сәйкес, табиғи популяцияларға келтірілетін зиянды барынша азайту мақсатында бір-бірінен кемінде 5 м қашықтықта орналасқан 10 сау аналық өсімдіктің әрқайсысынан 2–3 біржылдық вегетативті өркен іріктеліп алынды [12]. Іріктеу критерийлері ретінде өсімдіктердің тіршілікке қабілеттілігі, аурулармен және зиянкестермен зақымдану белгілерінің, сондай-ақ механикалық зақымдардың болмауы негізге алынды.

Бастапқы эксплант ретінде даму деңгейі біркелкі жас біржылдық өркендерде орналасқан сабақ бүршіктері пайдаланылды. Жиналған өсімдік материалы стерильді контейнерлерге салынып, кейіннен *in vitro* жағдайына енгізу үшін зертханаға жеткізілді. Барлық тәжірибелер өсімдіктерді микроклондық көбейтудің стандартты талаптарын сақтай отырып, асептикалық жағдайларда жүргізілді.



1-сурет – *Daphne altaica* Pall. өсімдіктері табиғи өсу аймақтарында (Қазақстан)

In vitro жағдайына енгізер алдында өсімдік материалына стандартты әдістерді қолдана отырып беткі зарасыздандырудан өткізілді. *Daphne altaica* Pall. экспланттары зертхана жағдайында 72% тұрмыстық сабынмен суда мұқият жуылды, содан кейін ағып тұрған сумен шаю жүргізіліп, әртүрлі дезинфекциялық заттармен өңделді. Негізгі дезинфекциялық зат ретінде экспланттарды экзогенді және эндогенді микрофлорадан тазарту үшін 0,01% HgCl_2 және 10% NaClO ерітінділері қолданылды.

Өсімдік материалын зарасыздандыру үшін әртүрлі нұсқалар және әртүрлі экспозиция ұзақтығы (10 және 20 мин) қолданылды. Өңдеуден кейін экспланттар реактив қалдықтарынан толық тазарту үшін үш рет зарарсыз дистилденген сумен жуылды, содан кейін 6–бензиламинопурин (БАП), нафтилсірке қышқылы (НСК), метатопалин (mT) және гиббереллин қышқылы (ГК_3) сияқты әртүрлі өсімдік өсу реттегіштері қосылған Мурасиге Скуг (МС) модификацияланған коректік ортасына орналастырылды. Әр орта нұсқасына қосымша ретінде 1 г/л поливинилпирролидон (ППМ), 20 г/л сахароза және 6 г/л агар қосылды. Коректік ортаның рН мәні зарасыздандыру алдында 1 N NaOH немесе 1 N HCl ерітінділерінің көмегімен 5,7-ге дейін жеткізілді. Осыдан кейін орта культуралық ыдыстарға құйылып, 121 °C температурада, 1 атм қысымда 20 мин бойы автоклавта зарасыздандырылды.

Бақылау үлгілері гормондық компоненттер қосылмаған МС ортасына орналастырылды. *Daphne altaica* Pall. тіндерінің зарарсыз өсімдік ортасын бақылау әр 3-5 күн сайын жүргізіліп, экспланттардың контаминация деңгейі мен пролиферациясы тіркелді.

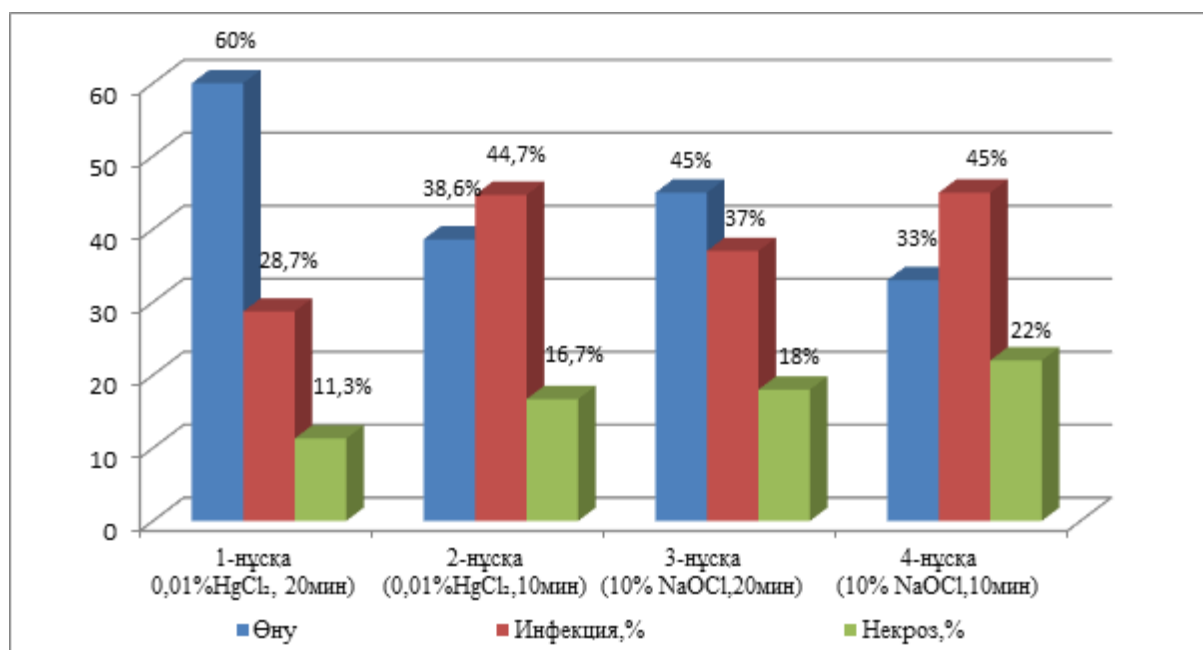
Экспланттарды *in vitro* жағдайында өсіру шарттары: жарықтандыру 2,5–3 мың люкс, температура +22...+24 °C, фотокезең 16/8 сағат. Өсіру BIOBASE Plant growth chamber климаттық камерасында жүргізілді.

Тәжірибе үш рет қайталаныммен жүргізілді, әр қайталануда 10 үлгі болды. Зерттелетін көрсеткіштерге коректік ортаның құрамының әсерін анықтау үшін статистикалық талдау бірфакторлы дисперсиялық талдау (ANOVA) әдісімен жүргізілді. Орташа мәндер арасында статистикалық мағыналы айырмашылықтар анықталған жағдайда, Тьюки критеріі (HSD) қолданылып көптік салыстыру жүргізілді. Деректерді өңдеу Minitab 17 бағдарламасы (Пенсильваниялық мемлекеттік университеті, АҚШ) арқылы жүзеге асырылды.

Нәтижелер

In vitro жағдайға енгізу кезеңін оңтайландыру

Зерттеу нәтижелері көрсеткендей, *Daphne altaica* Pall. зарарсыз экспланттарының ең жоғары тіршілік ету пайызы (60 %) 0,1% сынап хлориді (HgCl_2) ерітіндісінде 20 минуттық экспозиция кезінде тіркелді. Экспозиция уақытын 10 мин қысқартқанда тіршілік ету пайызы 38,6 % қысқарды. Ал 10% натрий гипохлориді ерітіндісін қолданғанда көрсеткіштер төмен болды, 20 минуттық экспозицияда – 45 %, ал 10 минутта – 33 % құрады (2-сурет).



2-сурет – *Daphne altaica* Pall бүршіктерін зарарсыздандыру нұсқаларының тиімділігін бағалау

Нәтижелер көрсеткендей, *D. altaica* бүршіктерін ең тиімді стерилизациялау және олардың тіршілік қабілетін сақтау 0,01 % HgCl₂ ерітіндісінде 20 минуттық өңдеу кезінде байқалды.

HgCl₂ экспозициясының уақытын 10 минуттан 20 минутқа ұзарту контаминациялайтын микрофлораны әлдеқайда толық басуға мүмкіндік берді. 10 минуттық өңдеу кезінде *D. altaica* экспланттарының стерильділігі 38,6 % болса, ұзақ экспозиция контаминация деңгейін айтарлықтай төмендетіп, тіндердің зақымдануына айтарлықтай әсер етпеді.

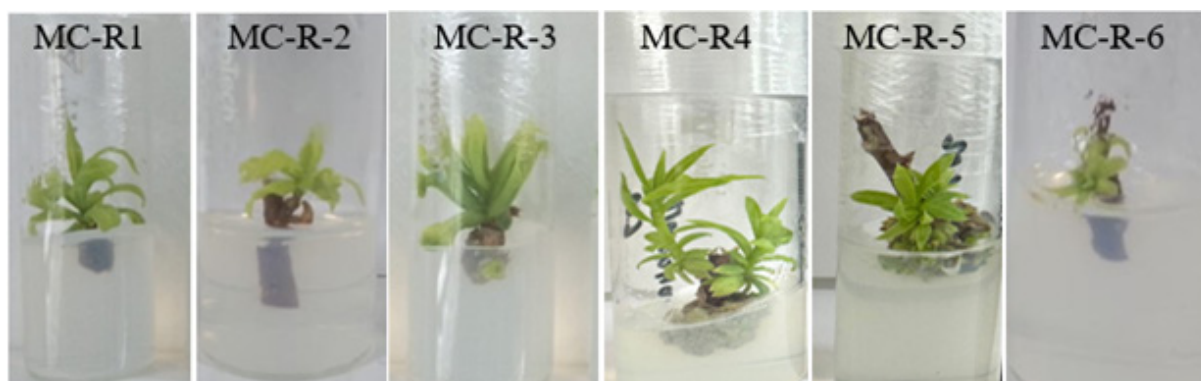
NaClO ерітіндісін қолдану әлдеқайда төмен нәтиже көрсетті. Өңдеу уақытын арттырғанына қарамастан, инфекция деңгейі түрде жоғары қалды. Сонымен қатар, бастапқы *D. altaica* экспланттарында тіндердің қараюы және ішінара некроздың дамуы байқалды, бұл, аталған зарарсыздандыру агенттің күшті тотығу қасиеттері мен фитотоксикалық әсерімен байланысты болуы мүмкін.

In vitro жағдайында *D. altaica* бүршіктерінің өсуін ынталандыру

Асептикалық экспланттар алынғаннан кейін, олар өсу мен бастапқы культураның түзілуін индукциялауға арналған қоректік орталарға көшірілді. *Daphne altaica* Pall. бүршіктерінің *in vitro* жағдайында өнуі әртүрлі өсу реттегіштерінің комбинациялары қосылған модификацияланған МС қоректік ортасының нұсқаларында зерттелді.

Нәтижелер көрсеткендей, өсу реттегіштерін қолданғанда сабақ бүршіктерінің дамуы біркелкі болып, бүршіктердің өну пайызы артты және *D. altaica* өсімділерінің тіршілік қабілеті жақсарды. Фитогормондарды қолдану тек сандық көрсеткіштерге (өсу жиілігі) ғана емес, сонымен қатар бүршік сабақтарының сапасына да оң әсер етті, қысқарған буын аралықтары, жапырақ бүршіктерінің түзілуі және апикальды доминанттықтың айқын көрінуі байқалды.

Өсірудің 21-24-ші күні экспланттардың морфогенетикалық белсенділігінде қоректік ортаның гормондық құрамына байланысты айырмашылықтар анықталды (2-сурет).



2-сурет – 21 күн өсіруден кейін әртүрлі фитогормондардың әсеріне байланысты *Daphne altaica* Pall. бұршіктерінің пролиферациясы

МС-R-4 қоректік ортасына 1 мг/л БАП және 0,1 мг/л НСҚ ерітіндісі қосылған кезде *D. altaica* бұршіктерінің өсуі қарқынды болып, жапырақ бұршіктерінің түзілуі белсенді байқалды.

МС-R-5 қоректік ортасы нұсқасы, онда мТ және ГҚ₃ қолданған кезде, бұршік сабақтарының түзілу реакциясы әлдеқайда төмен дәрежеде байқалды (1-кесте).

1-кесте – Әртүрлі фитогормондар әсерінен *Daphne altaica* Pall. бұршіктерінің *in vitro* жағдайында орташа өсу көрсеткіштері

Қоректік орта	Өсуді реттегіші/концентрациясы, мг/л				Өнудің басталуы, күні	Өркен саны, дана	Пролиферация жиілігі, %	28-ші күні өсінділердің өсуі
	БАП	мТ	НСҚ	ГҚ ₃				
МС-R-1	-	1	0,1	-	11	50	90	1,55±0,26 d
МС-R-2	-	-	0,1	1	12	50	90	1,91±0,51 c
МС-R-3	1	-	-	1	12	50	92	3,21±0,46 b
МС-R-4	1	-	0,1	-	10	50	94	4,01±0,44 a
МС-R-5	-	1	-	1	12	50	92	2,95±0,54 b
МС-R-6 (бақылау)	-	-	-	-	14	50	90	1,04±0,12 e

Орташа мәндер ± стандартты қателік (SEM) түрінде берілген (n = 10), тәжірибе үш рет қайталанған. Әртүрлі әріптермен белгіленген орташа мәндер арасында $P \leq 0,01$ деңгейінде статистикалық мәнді айырмашылық бар.

Қолданылған фитогормон комбинациялары *D. altaica* бұршіктерінің өну мерзіміне де әсер етті, ол 10-14 күн аралығында өзгеріп отырды. Ең ерте өну МС-R-4 ортада 10-шы күні байқалды, ал бақылау ортасы МС-R-6 бойынша өну тек 14-ші күні басталды.

Дисперсиялық талдау әртүрлі құрамында әртүрлі фитогормондар бар орталарда өскен *D. altaica* өсінділері арасында статистикалық маңызды айырмашылықтарды анықтады ($p \leq 0,001$). Бірфакторлы талдау қоректік орта нұсқасының 28-ші күні өсінділердің өсуіне айтарлықтай әсер ететінін көрсетті. Зерттелген нұсқалардың ішінде ең жоғары өсу көрсеткіштері МС-R-4 қоректік ортасында тіркеліп, оның *D. altaica* бұршіктерін *in vitro* өсіру үшін ең тиімді орта екенін көрсетті. Бұл нұсқада өркендердің орташа биіктігі $4,01 \pm 0,44$ см болды. Ал ең төменгі өсу көрсеткіштері бақылау нұсқасында (МС-R-6) анықталып, өркендердің орташа биіктігі $1,04 \pm 0,12$ см құрады. МС-R-3 және МС-R-5 қоректік орталарында бұршіктердің өнуі 12-ші күні басталып, өркендердің орташа биіктігі тиісінше $3,21 \pm 0,46$ см және $2,95 \pm 0,54$ см болды. МС-R-1 және МС-R-2 нұсқаларында өркендердің өсу қарқындылығы төменірек болып, олардың орташа биіктігі сәйкесінше $1,55 \pm 0,26$ см және $1,91 \pm 0,51$ см болды. Барлық тәжірибелік нұсқаларда бақылау ортасымен салыстырғанда өркендердің өсуі айтарлықтай жоғары болды. Сонымен қатар, пролиферация жиілігі де тәжірибелік нұсқаларда 90-94% аралығында болса, бақылау нұсқасында 90 % ғана болды. Ал өркендердің саны барлық нұсқаларда бірдей (50 дана) сақталды. Бұл нәтижелер фитогормондармен модификацияланған қоректік орталардың *Daphne altaica* Pall. өсімдігінің *in vitro* жағдайындағы өсуі мен дамуын тиімді ынталандыратынын дәлелдейді.

Талқылау

In vitro биотехнологиялық әдістерді қолдану дәрілік өсімдіктердің табиғи ресурстарын сақтай отырып, олардан үздіксіз және тұрақты түрде дәрілік шикізат алудың тиімді тәсілі болып табылады. *In vitro* жағдайында өсірудің көптеген артықшылықтары бар, олардың бастысы экологиялық немесе географиялық жағдайларға тәуелсіздік, өндірілетін метаболиттердің сапалық және сандық қасиеттерін реттеу мүмкіндігі, жыл бойы өнім алу және өндірісті кеңейту мүмкіндігі, сондай-ақ фармацевтикалық құнды компоненттерді шығару процесінің жеңілдеуі [13, 14].

In vitro жағдайда өсімдіктерді культураға енгізу кезеңінде бастапқы өсімдік материалын тиімді зарасыздандыру ерекше маңызды, себебі экзогенді және эндогенді микрофлораның болуы экспланттардың тіршілік қабілетін едәуір төмендетіп, өсімдік қорларының жойылуына әкелуі мүмкін [15].

Алынған нәтижелер басқа зерттеулерде көрсетілген деректермен сәйкес келеді, атап айтқанда *Leifert* және әріптестерінің жұмыстары көрсеткендей, *in vitro* жағдайға өсімдіктерді енгізудің сәттілігі зарасыздандыратын заттың антимикробтық тиімділігі мен оның фитотоксикалық әсерінің оңтайлы арақатынасына тікелей байланысты екені атап көрсетілген [16]. Авторлар атап өткендей, жеткіліксіз экспозиция эндофиттік және эпифиттік микрофлораның сақталуына әкеледі, ал тым ұзақ экспозиция тіндердің некрозына және регенерациялық потенциалдың төмендеуіне себеп болады. *Bhojwani* атағандай, 0,1 % HgCl_2 ерітіндісі ағаш және бұталы өсімдіктер үшін ең тиімді зарасыздадыратын заттардың бірі болып табылады, алайда өңдеу уақытын мұқият оңтайландыру қажет [17]. *Daphne altaica* Pall. бастапқы экспланттарын әртүрлі зарасыздандыру әдістерімен зерттеу нәтижелері көрсеткендей, 0,01% HgCl_2 ерітіндісінде 20 минуттық өңдеу осы түрді *in vitro* енгізудің ең тиімді тәсілі болып табылады. Бұл әдіс жоғары зарасыздандыруды қамтамасыз етіп, экспланттардың тіршілік қабілетін сақтайды. Сондай-ақ, осы нұсқада айқын некроз байқалмады, бұл меристемалық белсенділіктің сақталғанын көрсетеді және *D. altaica* бүршіктерінің әрі қарай пролиферациясы үшін маңызды шарт болып табылады. Ұқсас зерттеулерде қолданылған 0,1% HgCl_2 ерітінділері ақуыздардың денатурациясына және патогенді микроорганизмдер ферменттерінің белсенділігінің тежелуіне әкелуі мүмкін [18]. Осы зерттеуде біз HgCl_2 ерітіндісінің 0,01% концентрациясын қолдандық, яғни ұқсас зерттеулерде пайдаланылған концентрациядан он есе төмен. Бұрын жүргізген зерттеулерімізде бұл концентрацияның асептикалық экспланттарды алуға жеткілікті екені көрсетілген [19]. Өсірудің бүкіл кезеңі бойы, *in vitro* жағдайға енгізу сатысында да, микроклондық көбейтудің кейінгі кезеңдерінде де жасырын (латентті) инфекция белгілері байқалмады. Сонымен қатар, осы стерилизациялау әдісін қолдану кезінде экспланттардың некрозы тіркелмеді, ал контаминация деңгейі төмен болды.

In vitro жағдайында эндогендік фитогормон деңгейі көбінесе морфогенезді бастауға жеткіліксіз болып келеді, әсіресе ағаш және сирек кездесетін түрлерде, бұл тіндік культура бойынша классикалық зерттеулерде де атап өтілген [20]. Зерттеулер көрсеткендей, цитокининдер мен ауксиндердің арақатынасы *in vitro* жағдайында өсімдіктердің морфогенезін реттеуде шешуші рөл атқарады. Цитокинин концентрациясының артуы тыныштық күйдегі бүршіктерді белсендіріп, бүршіктенудің индукциясына ықпал етеді, ал ауксиннің шамадан тыс болуы каллус түзілуіне немесе бүршіктердің өсуін тежелуіне әкелуі мүмкін. Сирек және қиын көбейетін түрлер үшін гормондық тепе-теңдікті мұқият реттеу қажет, себебі бастапқы морфогенетикалық реакция культураның әрі қарайғы регенерациялық потенциалын анықтайды. Біздің зерттеу нәтижелері де осыны растайды, бақылау ортасы MC-R-6, өсу реттегіштерін қоспағанда, *D. altaica* экспланттарында өсу процесстері байқалмады, бұл меристемалық белсенділікті іске қосу үшін экзогендік гормондық ынталандырудың қажеттілігін көрсетеді.

Daphne altaica Pall. түрін *in vitro* жағдайында өсіру туралы мәліметтердің болмауына байланысты өсу реттегіштерін таңдау кезінде *Daphne* туысына жататын жақын түрлерге жүргізілген зерттеулердің нәтижелеріне сүйендік. *Daphne caucasica* және *Daphne mezereum* түрлеріне жүргізілген зерттеулерде БАП-тың ауксиндердің төмен концентрацияларымен үйлесуі бүршіктердің қарқынды пролиферациясын және өркендердің түзілуін қамтамасыз ететіні көрсетілген [2, 3]. Сонымен қатар, зерттеуде ағаш тектес өсімдіктерді *in vitro* жағдайында көбейтуде жоғары тиімділігімен ерекшеленетін жаңа буын цитокинині мета-тополин қолданылды.

Оның басты артықшылығы өсіру барысында цитокининдердің жағымсыз метаболиттерінің түзілуін азайтып, өркендердің морфогенезін ынталандыруы және олардың кейінгі тамырлану қабілетін жақсартуы болып табылады.

Біздің зерттеу нәтижелеріміз БАП цитокининің *D. altaica* түрінде меристемалық жасушалардың пролиферациясын және өркендердің түзілуін индукциялайтынын көрсетті. Ал НСК ауксині төмен концентрацияларда жасушалардың дифференциациясын қолдап, регенерациялық үдерістердің тұрақты жүруіне ықпал етті. Алынған нәтижелер *D. caucasica* және *D. mezereum* түрлеріне жүргізілген зерттеулердің деректерімен сәйкес келеді [1, 3]. Бұл *Daphne* туысы өкілдерінде морфогенездің гормондық реттелу механизмдерінің ұқсастығын көрсетеді. Сонымен қатар, БАП-тың өсімдік жасушаларында баяу инактивациялануы оның белсенді түрлерінің ұзақ уақыт сақталуына мүмкіндік беріп, нәтижесінде *in vitro* жағдайында тыныштық күйіндегі бүршіктердің ұзақ мерзімді стимуляциясын қамтамасыз етеді [2]. Біздің зерттеу нәтижелеріміз *D. altaica* үшін *in vitro* жағдайына енгізу кезеңінде меристемалардың жоғары белсенділігін сақтау мақсатында БАП қолданудың анағұрлым тиімді екенін көрсетті.

Өсу реттегіштері *D. altaica* бүршіктерінің өну жылдамдығына да әсер етті. Ең ерте өну МС-R-4 қоректік ортасында (10-шы күні) байқалды, ал бақылау ортасы МС-R-6 жағдайында ол тек 14-ші күні басталды. Бұл оңтайлы гормондық тепе-теңдік болмаған жағдайда меристемалық белсенділіктің баяу жүретінін көрсетеді.

Осылайша, модификацияланған МС қоректік ортасының құрамындағы өсу реттегіштерінің концентрациясы мен олардың үйлесімдерін өзгерту *D. altaica* Pall. бүршіктерінің морфогенетикалық реакциясын бағалауға және бүршік түзілуін индукциялау мен тұрақты бастапқы культураларды қалыптастыру үшін ең тиімді нұсқаларды анықтауға мүмкіндік берді.

Біздің нәтижелер *D. altaica* Pall. өсімдігінде морфогенетикалық процестерді белсендіруде өсу реттегіштерінің шешуші рөл атқаратынын дәлелдейді. Бүршік түзілуін индукциялау үшін алғашқы культура кезеңінде ең тиімді нұсқа ретінде 1 мг/л БАП және 0,1 мг/л НСК қосылған МС-R-4 ортасы анықталды. Бұл ортада өсімдіктердің қарқынды өсуі және морфологиялық жағынан толыққанды бүршіктердің түзілуі байқалды, ал гормондық ерітінделерсіз бақылау ортасы өсудің қажетті деңгейде белсендірілуін қамтамасыз етпеді.

Қорытынды

Зерттеу барысында алғаш рет Шығыс Қазақстан аумағында өсетін *Daphne altaica* Pall. эндемикалық дәрілік өсімдігін *in vitro* жағдайында енгізу және микроклоналды көбейту үшін оңтайлы жағдайлар әзірленіп, эксперименттік тұрғыдан негізделді.

Өсімдікті *in vitro* жағдайына енгізу кезеңінде экспланттарды беткі зарарсыздаудың тиімді режимі анықталды. Зерттеу нәтижелері бойынша 0,01 % HgCl_2 ерітіндісімен 20 мин өңдеу *D. altaica* экспланттарының тіршілік қабілеті мен морфогенетикалық потенциалын сақтай отырып, жоғары деңгейде асептикалық жағдайды қамтамасыз етеді. Бұл әдіс контаминация деңгейін айтарлықтай төмендетіп, экспланттарды әрі қарай тиімді өсіруге мүмкіндік береді.

Өртүрлі фитогормон комбинацияларының әсерін салыстырмалы талдау нәтижесінде 1 мг/л БАП және 0,1 мг/л НСК қосылған МС-R-4 қоректік ортасында *D. altaica* бүршіктерінің белсенді өнуі және өркендердің түзілуі байқалды. Осы ортада өсіру қарқынды бұтақтануды қамтамасыз етіп, жақсы дамыған жапырақтары бар морфологиялық тұрғыдан толыққанды микробүршіктердің қалыптасуына мүмкіндік берді.

Ұсынылған зарарсыздандыру және *in vitro* ортаға енгізу әдісі *D. altaica* табиғи популяцияларын сақтау және көбейту үшін тиімді тәсіл ретінде ұсынылуы мүмкін. Бұл тіндік өсіру әдістерін қолдану арқылы түрдің генетикалық ресурстарын сақтауға және табиғи популяцияларға түсетін антропогендік әсерді азайтуға мүмкіндік береді. Зерттеудің келесі кезеңінде алынған микробүршіктерді тамырландыру, оларды *ex vitro* жағдайына көшіру және акклиматизациялау, сондай-ақ алынған регенеранттардың генетикалық тұрақтылығын зерттеу жұмыстары жүргізілетін болады.

Авторлардың қосқан үлесі

АТ: деректерді жинаумен және талдаумен, мақала жазумен және рәсімдеумен айналысты. ОР және ДТ: ғылыми дереккөздерді талдауға және іріктеуге, жан-жақты әдебиеттерді іздестіруге

көмектесті. ОХ: қолжазбаның соңғы редакциясын және коррекциясын орындауға ат салысты. Барлық авторлар қолжазбаның соңғы редакциясын оқып, қарап, бекітті.

Қаржыландыру туралы ақпарат

Зерттеу Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігінің Ғылым комитетінің қаржылай қолдауымен жүзеге асырылды, BR28713087 «Дәрілік өсімдіктердің биологиялық белсенді заттарын *in vitro* жағдайында алудың және осы заттардың мақсатты түзілуінің іргелі және қолданбалы аспектілері» ғылыми-техникалық бағдарламасы аясында жүргізілді.

Әдебиеттер тізімі

- 1 Nowakowska, K., Pacholczak, A., Nongdam, P., Samsurizal, N.A., Pacholczak, A. (2023). An efficient micropropagation protocol for the endangered European shrub February daphne (*Daphne mezereum* L.) and identification of bacteria in culture. *Agriculture*, 13(9), 1692. DOI:10.3390/agriculture13091692.
- 2 Nowakowska, K., Pacholczak, A., Tepper, W. (2019). The effect of selected growth regulators and culture media on regeneration of *Daphne mezereum* L. 'Alba'. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 30, 197-205. DOI: 10.1007/s12210-019-00777-w.
- 3 Mala, J., Bylinsky, V. (2004). Micropropagation of endangered species *Daphne cneorum*. *Biologia Plantarum*, 48(4), 633-636.
- 4 Тергенбаева, Ж.Т., Карашолакова, Л.Н., Дакиева, К.Ж., и др. (2022). Распространение и ценофлора *Daphne altaica* (*Thymelaeaceae*) - редкого эндемичного вида из Восточного Казахстана. *Вестник КазНУ. Серия биологическая*, 2(91), 58-69.
- 5 Ku, S.S., Woo, H.-A., Shin, M.J., Jie, E.Y., Kim, H., Kim, H.-S., et al. (2023). Efficient plant regeneration system from leaf explant cultures of *Daphne genkwa* via somatic embryogenesis. *Plants*, 12(11), 2175.
- 6 Mala, J. (2004). Conservation strategies for endangered *Daphne* species. *Acta Mus Richnoviensis Sectio Naturalis*, 5, 133-160.
- 7 Moshiaşvili, G., Tabatadze, N., Mshvildadze, V. (2020). Traditional uses and phytochemistry of the genus *Daphne*. *Fitoterapia*, 143, 104540.
- 8 Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- 9 Murthy, H.N., Bandyopadhyay, S., Grisse, W. (2014). Plant secondary metabolism: Engineering and applications. *Plant Cell Reports*, 33, 1085-1102.
- 10 Thorpe, T.A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37, 169-180.
- 11 Ziv, M., Shemesh, Y. (2019). Temporary immersion - An advanced tool for improving *in vitro* plant propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 136, 253-270.
- 12 Горбунов, Ю.Н., Дзыбов, Д.С., Кузьмин, З.Е., Смирнов, И.А. (2008). *Методические рекомендации по реинтродукции редких и исчезающих видов растений (для ботанических садов)*. - Тула: Гриф и К.
- 13 Prashant S., Bhawana, M. (2024). An update on biotechnological intervention mediated by plant tissue culture to boost secondary metabolite production in medicinal and aromatic plants. *Physiologia Plantarum*, 176(4), - DOI:10.1111/ppl.14400.
- 14 Jalota K., Sharma V., Agarwal C. (2024). Eco-friendly approaches to phytochemical production: elicitation and beyond. *Natural Products and Bioprospecting*, 14(5). DOI:10.1007/s13659-023-00419-7.
- 15 Thakur R., Sood A. (2006). An efficient method for explant sterilization for reduced contamination. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84, 369-371.
- 16 Leifert, C., Cassells, A.C. (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 37. 133-138
- 17 Bhojwani, S.S., Dantu, P.K. (2013). *Plant tissue culture: An introductory text*. Springer, Dordrecht.

18 Sahu, P.K., Tilgam, J., Mishra, S., Hamid, S., Gupta, A.K.J. (2022). Surface sterilization for isolation of endophytes: Ensuring what (not) to grow. *J Basic Microbiol.* 647-668. DOI:10.1002/jobm.202100462

19 Tagimanova, D., Raiser, O., Danilova, A., Turzhanova, A., Khapilina, O. (2024). Micropropagation of Rare Endemic Species *Allium microdictyon* Prokh. Threatened in Kazakhstan Altai. *Horticulturae*, 10(9). DOI:10.3390/horticulturae10090943

20 Сельдиминова, О.А., Круглова, Н.Н., Зинатуллина, А.Е. (2017). Роль фитогормонов в индукции каллусогенеза и регуляции путей морфогенеза каллусов злаков *in vitro*: обзор проблемы *Научный результат. Физиология*, 3(1), 8-13.

References

1 Nowakowska, K., Pacholczak, A., Nongdam, P., Samsurizal, N. A., Pacholczak, A. (2023). An efficient micropropagation protocol for the endangered European shrub February daphne (*Daphne mezereum* L.) and identification of bacteria in culture. *Agriculture*, 13(9), 1692. DOI:10.3390/agriculture13091692.

2 Nowakowska, K., Pacholczak, A., Tepper, W. (2019). The effect of selected growth regulators and culture media on regeneration of *Daphne mezereum* L. 'Alba'. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 30, 197-205. DOI:10.1007/s12210-019-00777-w.

3 Mala, J., Bylinsky, V. (2004). Micropropagation of endangered species *Daphne cneorum*. *Biologia Plantarum*, 48(4), 633–636.

4 Tergenbayeva, Zh. T., Karasholakova, L.N., Dakiyeva, K.Zh. (2022). Distribution and coenoflora of *Daphne altaica* (Thymelaeaceae), a rare endemic species from Eastern Kazakhstan. *Vestnik KazNU. Biological Series*, 2(91), 58-69.

5 Ku, S.S., Woo, H.-A., Shin, M.J., Jie, E.Y., Kim, H., Kim, H.-S. (2023). Efficient plant regeneration system from leaf explant cultures of *Daphne genkwa* via somatic embryogenesis. *Plants*, 12(11), 2175. DOI:10.3390/plants12112175.

6 Mala, J. (2004). Conservation strategies for endangered *Daphne* species. *Acta Mus Richnoviensis Sectio Naturalis*, 5, 133-160.

7 Moshiaishvili, G., Tabatadze, N., Mshvildadze, V. (2020). Traditional uses and phytochemistry of the genus *Daphne*. *Fitoterapia*, , 143, 104540.

8 Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. DOI:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

9 Murthy, H.N., Bandyopadhyay, S., Grisse, W. (2014). Plant secondary metabolism: Engineering and applications. *Plant Cell Reports*, 33, 1085-1102.

10 Thorpe, T.A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37, 169-180. DOI:10.1007/s12033-007-0010-9.

11 Ziv, M., Shemesh, Y. (2019). Temporary immersion: An advanced tool for improving in vitro plant propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 136, 253-270. DOI:10.1007/s11240-018-01611-2.

12 Gorbunov, Yu.N., Dzybov, D.S., Kuzmin, Z.E., Smirnov, I.A. (2008). *Methodological recommendations for the reintroduction of rare and endangered plant species (for botanical gardens)*. Tula: Grif i K.

13 Prashant, S., Bhawana, M. (2024). An update on biotechnological intervention mediated by plant tissue culture to boost secondary metabolite production in medicinal and aromatic plants. *Physiologia Plantarum*, 176(4). DOI:10.1111/ppl.14400.

14 Jalota, K., Sharma, V., Agarwal, C. (2024). Eco-friendly approaches to phytochemical production: Elicitation and beyond. *Natural Products and Bioprospecting*, 14(5). DOI:10.1007/s13659-023-00419-7

15 Thakur, R., Sood, A. (2006). An efficient method for explant sterilization for reduced contamination. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84, 369-371. DOI:10.1007/s11240-005-9027-5.

16 Leifert, C., Cassells, A.C. (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 37. 133-138

17 Bhojwani, S.S., Dantu, P.K. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Dordrecht: Springer. DOI:10.1007/978-94-007-6540-8.

18 Sahu, P.K., Tilgam, J., Mishra, S., Hamid, S., Gupta, A.K., J. (2022). Surface sterilization for isolation of endophytes: Ensuring what (not) to grow. *Journal of Basic Microbiology*, 62, 647–668. DOI:10.1002/jobm.202100462.

19 Tagimanova, D., Raiser, O., Danilova, A., Turzhanova, A., Khapilina, O. (2024). Micropropagation of the rare endemic species *Allium microdictyon* Prokh. threatened in Kazakhstan Altai. *Horticulturae*, 10(9). DOI:10.3390/horticulturae10090943.

20 Seldimirova, O., A., Kruglova, N.N., Zinatullina, A.E. (2017). The role of phytohormones in callus induction and regulation of morphogenesis pathways in cereal calli *in vitro*: A review. *Research Result. Physiology*, 3(1), 8-13.

Оптимизация этапа введения в культуру *in vitro* *Daphne altaica* Pall.

Туменбаева А.Р., Тагиманова Д.С., Райзер О.Б., Хапилина О.Н.

Аннотация

Предпосылки и цель. *Daphne altaica* Pall. – ценное лекарственное растение, используемое в традиционной медицине для лечения множества заболеваний, является казахстанским эндемиком, распространённым на ограниченных территориях Восточного Казахстана. Ограниченный ареал, низкая семенная продуктивность и медленный рост затрудняют естественное размножение и сохранение данного вида. Биотехнологические приемы размножения могут сохранить естественное биоразнообразие дикорастущих популяций, и позволят в достаточной степени обеспечить фармацевтическую промышленность. В связи с этим целью исследования являлось изучение влияния различных методов стерилизации и концентраций фитогормонов на эффективность введения *Daphne altaica* в культуру *in vitro* и формирование микропобегов.

Материалы и методы. В качестве исходного растительного материала использовали почечные explantы *Daphne altaica* Pall. Для получения асептической культуры были протестированы различные режимы поверхностной стерилизации, наиболее эффективным оказался 0,01%-ный раствор $HgCl_2$ с экспозицией 20 минут. Микроклональное размножение проводили на питательной среде Мурасиге Скуга (МС) с различными регуляторами роста, а также оценивали влияние их комбинаций на рост и морфогенетическую активность explantов.

Результаты. Стерилизация в 0,01%-ном растворе $HgCl_2$ обеспечивала высокий уровень асептики при сохранении жизнеспособности тканей. На питательной среде наблюдалось активное прорастание почек и формирование побегов. Наилучшие показатели микроклонального размножения были получены на среде МС-R-4 с добавлением 1,0 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК, что способствовало интенсивному формированию морфологически полноценных микропобегов с хорошо развитыми листьями *in vitro*.

Закключение. Разработанная методика обеспечивает эффективное получение стерильных микропобегов *Daphne altaica* Pall. в условиях культуры *in vitro*. Применение данного подхода способствует сохранению генетических ресурсов вида, его массовому размножению и снижению антропогенной нагрузки на природные ценопопуляции.

Ключевые слова: *Daphne altaica* Pall.; фитогормоны; *in vitro*; стерилизация; питательная среда.

Optimization of the *in vitro* culture introduction stage of *Daphne altaica* Pall.

Tumenbayeva A.R., Tagimanova D.S., Raiser O.B., Khapilina O.N.

Abstract

Background and Aim. *Daphne altaica* Pall. is a valuable medicinal plant used in traditional medicine for the treatment of various diseases. It is endemic to Kazakhstan and has a restricted distribution range, occurring only in limited areas of Eastern Kazakhstan. Its narrow distribution, low seed productivity, and slow growth hinder the natural propagation and conservation of this species. Biotechnological propagation techniques can contribute to the preservation of the natural biodiversity of wild populations and ensure an adequate supply of plant material for the pharmaceutical industry. Therefore, this study aimed to investigate the effects of different sterilization methods and concentrations of phytohormones on the efficiency of introducing *Daphne altaica* into *in vitro* culture and on microshoot formation.

Materials and Methods. Bud explants of *Daphne altaica* Pall. were used as the initial plant material. Various surface sterilization regimes were tested to obtain aseptic cultures, with the most effective treatment being a 0.01% HgCl_2 solution for 20 minutes. Micropropagation was carried out on Murashige and Skoog (MS) medium with different growth regulators, and the effects of their combinations on explant growth and morphogenetic activity were evaluated.

Results. Sterilization with 0.01% HgCl_2 provided a high level of asepsis while maintaining tissue viability. Active bud sprouting and shoot formation were observed on the culture medium. The best micropropagation results were obtained on the MS-R-4 medium supplemented with 1.0 mg/L BAP and 0.1 mg/L NAA, which promoted intensive formation of morphologically complete microshoots with well-developed leaves *in vitro*.

Conclusion. The developed method enables the efficient production of sterile microshoots of *Daphne altaica* Pall. under *in vitro* conditions. This approach contributes to the conservation of the species' genetic resources, facilitates its mass propagation, and reduces anthropogenic pressure on natural populations.

Keywords: *Daphne altaica* Pall.; phytohormones; *in vitro*; sterilization; culture medium.