

Умралина А.Р., Ким Донгвон

**ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ЭНДЕМИКА
Astragalus duanensis Saposhn. Ex Sumn. (астрагала дуанского)**

A.P. Umralina, Kim Dongvon

**INTRODUCTION IN *IN VITRO* CULTURE OF ENDEMIC
Astragalus duanensis Saposhn. ex Sumn species**

УДК:576.8.093.1 (572) (04)

Введен в культуру *in vitro* эндемичный вид – астрагал дуанский. Подобраны условия для проращивания семян. Определена лабораторная всхожесть семян и всхожесть после хранения при -20°C и в жидком азоте. Подобран способ микроразмножения – микрочеренкование и оптимальные питательные среды для микроразмножения - MS+0,1 мг/л БАП+0,2 мг/л ГК и укоренения - MS+1 мг/л ИУК.

Ключевые слова: эндемики, астрагал, сохранение вида, лекарственные и декоративные растения, культуры *in vitro*, микроразмножение.

In vitro culture was introduced endemic species – *Astragalus duanski*. Seed germination condition was optimized. Conditions were specified for laboratory seed germination and for seed germination after storage at -20°C and in liquid nitrogen. Method for micropropagation were determined – microcutting and were determined optimal culture media for micropropagation - MS +0,1 mg/L BAP +0.2 mg/L GA and rooting - MS +1 mg/L IAA

Keywords: endemic, *Astragalus*, the preservation of the species, medicinal and decorative plants, culture *in vitro*, micropropagation.

Много растений, внесенных в список растений, находящихся под угрозой исчезновения или исчезающих, являются эндемиками и требуют специальных мест обитания, все большее число растений переходят в разряд уязвимых [1]. Таким образом, по всему миру возникает необходимость приложить совместные усилия по сохранению и управлению растениями [2-5]. Проблемы, стоящие перед сохранностью редких растений, огромны, и многие виды уже безвозвратно потеряны. Актуальным направлением клеточных технологий в настоящее время является сохранение и воспроизводство редких и исчезающих видов растений [6]. Одним из альтернативных подходов к проблеме сохранения генофонда может стать использование методов биотехнологии растений. Преимущества метода микроклонального размножения растений с затрудненным семенным или вегетативным размножением в высоком коэффициенте размножения и в освобождении растительного материала от вирусных, бактериальных и грибных инфекций. Технология микроразмножения преимущественно используется для клонирования хозяйственно ценных видов – лекарственных, декоративных, пищевых, кормовых и других растений. Одним из таких родов является род Астрагал. Астрагал

(*Astragalus*) – одно- или многолетние травянистые растения, полукустарники, реже кустарники. Многие из астрагалов являются эндемичными, т. е. произрастающими в строго определенной географической области, а также редкими, включенными в "Красные книги". Обладают ценными декоративными свойствами. Многие виды астрагалов – кормовые растения. Есть среди астрагалов и медоносные растения. Среди такого множества астрагалов встречаются и лекарственные растения.

Астрагалы до сих пор остаются не до конца изученными, как в химическом, так и в биологическом, экологическом, фитоценологическом и ресурсном отношении. Все они содержат в себе кладезь полезных веществ: природные антиоксиданты, селен, токоферол, ценнейшие макро- и микроэлементы, БАВ, необходимые ослабленному организму. Экспериментально доказано, что вещества, входящие в астрагал, благоприятно сказываются на всех системах организма, замедляют процесс старения. Это лекарственное растение используют в народной медицине многие народы.

В Кыргызстане отмечено преобладание видов рода астрагал (*Astragalus*) - 169 видов. Большинство астрагалов совсем не изучено. Для изучения, сохранения и практического использования астрагалов необходимо разработать протоколы введения в культуру *in vitro*.

Материалы и методы

Объектом исследований служил эндемик *Astragalus duanensis* Saposhn. ex Sumn. – астрагал дуанский (рис.1). Этот вид наряду с другими четырьмя видами эндемичными видами астрагала хранится в семенном банке Института биотехнологии (табл.1).





Рис. 1. Внешний вид и местообитание астрагала дуанского [7].

Предобработка семян и морфометрия

проводились с учетом ключевых элементов стандартов генетических банков [8,9]. После сбора растения выдерживались 2 месяца при комнатной температуре для высушивания.

Закладка семян на хранение в криобанке при двух температурных режимах. Хладохранение предусматривало использование двух температурных режимов – -20°C и -196°C (жидкий азот). Семена подсушивались в силикагеле в герметичных емкостях до рекомендуемой равновесной относительной влажности 10-20% [10]. Влажность семян замерялась с помощью влагомера Rotronic Palm 3.

Определение лабораторной всхожести до и после хранения при низких температурах. Проводилась сравнительная характеристика всхожести семян перед закладкой на хранение, и после хранения при двух рекомендуемых температурных режимах – неглубокое замораживание (-20°C) и криоконсервация в жидком азоте (-196°C) [11,12].

Стерилизация семян. При определении всхожести семена стерилизовали и высаживали для проращивания в чашки Петри с агаризованной средой MS без гормонов. Стерилизацию проводили с учетом морфологии семян.

Проращивание семян. Для преодоления состояния покоя семян использовали методы химической и механической скарификации, холодной и теплой стратификации, опираясь на литературные данные по проращиванию родственных видов растений [13,14].

Микроразмножение. Подбор питательных сред. Стерильные проростки двудольных растений, полученные при определении всхожести, служили эксплантами для микроразмножения. Микроразмножение проводили двумя способами – микрочеренкованием и снятием апикального доминирования при помощи гормональных добавок в питательную среду. Основой всех сред для микроразмножения были агаризованные среды Мурасиге и Скуга (MS) [15] и St [16] с добавлением фитогормонов и гормоноподобных синтетических регуляторов роста

в различных концентрациях и сочетаниях. Для мультипликации побегов использовались среды с добавлением цитокининов: Кинетин (Кин) и 6-Бензиламинопурин (БАП). В некоторых случаях для пробуждения пазушных почек достаточно было снять апикальное доминирование, удалив верхушку. При укоренении полученных побегов применяли среды с добавлением регуляторов роста ауксинового типа: α -нафтилуксусную кислоту (НУК), γ -индолилмасляную кислоту (ИМК), 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), β -индолилуксусную кислоту (ИУК).

Результаты и их обсуждение

Семена очищались вручную, отбирались выполненные экземпляры. Морфометрическое исследование семян проводилось согласно общепринятым методам [17]. Определялись длина и ширина семян, их вес. Мелкие семена измеряли с помощью окуляра с измерительной шкалой. Массу семян определяли взвешиванием 3-х проб по 100 штук. Если семян было меньше, навеска бралась по 50, 30 и 10 семян, совсем малые количества взвешивали вместе одной навеской и вычисляли средний вес. Морфометрические данные представлены в табл.1. Результаты были статистически обработаны с помощью программы Excel.

Для закладки семян на хранение при -20°C и в жидком азоте все семена подсушивались до равновесной влажности в условиях лаборатории, отбирались пробы и герметично упаковывались в фольгу. Для хранения при -20°C пакеты с семенами помещались в герметично закрытом сосуде в морозильную камеру.

Семена всех видов семейства Fabaceae относятся к твердосемянным, поэтому они подвергались скарификации концентрированной серной кислотой в течение 15 минут и проращивались при $18-22^{\circ}\text{C}$. В этих условиях полностью проросли жизнеспособные семена *Astragalus duanensis* (сбора 2006 года). Затрудненным было проращивание семян *Astragalus duanensis* (сбора 2005 года) - они были подвергнуты многоступенчатой стратификации. Такой неравномерный выход из состояния покоя объясняется тем, что семена дикорастущих бобовых обладают различной степенью твердо семянности в образцах одного и того же сбора, а тем более разных сборов [18]. Во время хранения при -20°C были сильно повреждены покровы семян сем. Fabaceae. Они полностью разрушились после обработки серной кислотой, которой подвергались семена бобовых во всех опытах, и семена оголились. Такая скарификация отрицательно не сказалась на всхожести семян, все они проросли одновременно, в короткие сроки.

Табл. 1.

Список астрагалов - эндемиков Кыргызстана, хранящихся в банке семян Института биотехнологии НАН КР

№	Семейство, видовое название на латинском, русском и кыргызском языках	Год и место сбора	Номер коллекции	Морфометрия		
				Длина, мм min-max	Ширина, мм min-max	Вес 1000 семян, г M±m
1	<i>Astragalus caudicosus</i> Galkinaet Nabiev Астрагал стволиковый Сөңгөктүү астрагал	2005	BLCKg-440	4,06 ± 0,32 3,5-4,8	1,89 ± 0,14 1,5-2,0	1,89 ± 0,14
2	<i>Astragalus duanensis</i> Sumn А. дуанский Дуандык астрагал	2005 2006	BLCKg-441 BLCKg-510	4,37 ± 0,42 3,2-5,1 4,18 ± 0,59 3,5-5,5	1,45 ± 0,16 1,0-1,8 1,43 ± 0,15 1,1-1,7	3,60 ± 0,12 3,30 ± 0,10
3	<i>Astragalus isphairamicus</i> B.Fedtsch А. исфайрамский Исфайрамдык астрагал	2004	BLCKg-384	3,22 ± 0,36 2,5 - 4,0	3,43 ± 0,44 2,8 - 4,5	9,09 ± 2,46
4	<i>Astragalus reverdattoanus</i> Sumn. А. Ревердатто Ревердаттонун астрагалы	2005	BLCKg-442	2,20 ± 0,28 1,6-2,8	1,36 ± 0,14 1,1-1,7	1,69 ± 0,08
5	<i>Astragalus sandalashensis</i> E.Nikit. А. сандалашский Сандалаштык астрагал	2005	BLCKg-443	2,70 ± 0,38 2,0-3,4	2,13 ± 0,31 1,5-3,0	3,49 ± 0,05

Определение всхожести семян, заложенных на хранение в жидкий азот, проводилось после 1 месяца хранения. Всхожесть семян, хранившихся при температуре -20°C, проверялась после 4 месяцев хранения.

Табл. 2

Всхожесть семян до и после хранения при двух низкотемпературных режимах

Год сбора	Длительность проращивания, дни						Всхожесть, %		
	Контроль		После замораживания				Контроль		После замораживания
	начало	конец	-20°C		-196°C		-20°C		-196°C
			начало	конец	начало	конец			
2005	15	135	3	18	7	85	72	88	80
2006	3	28	2	24	3	33	90	86	90

Показатели всхожести - как в контрольном варианте, так и после хранения при -20°C и -196°C говорят о том, что качество семян удовлетворяет требованиям семенного банка (табл.2).

Микроклональное размножение пробирочных растений осуществляли с помощью черенкования. Все виды растений данного семейства образуют хорошие междоузлия и легко черенкуются. В опыте использовались следующие питательные среды: MS+ИУК (1мг/л); MS+0,2мг/л; ГК+1мг/л ИУК; MS+БАП (0,1мг/л) + ГК (0,2мг/л); MS+Кин (0,1мг/л)

+ ГК (0,2мг/л), контролем служила среда без добавления гормонов.

На среде MS+ИУК (1мг/л) побеги вытянулись, проростки имели удовлетворительный вид, хорошо укоренились. (табл.3).

Среда MS+1мг/л ИУК оказалась неподходящей для культивирования.

На среде MS+0,2мг/л ГК+1мг/л ИУК 3 проростка витрифицировались, при этом побеги были тонкими и сильно вытягивались в рост, листья формировались мелкими светло-зеленого цвета.

Табл.3.

Подбор питательных сред для микрочеренкования и ризогенеза астрагала дуанского

Варианты Питательных сред	Кол-во посаженных черенков	Кол-во пробужденных пазушных почек	Кол-во нормально развивающихся побегов	Кол-во погибших и витрифицированных черенков	Кол-во укороченных побегов	Кол-во междоузлий у нормально развивающихся побегов	Образование корней
1 пассаж							
без гормонов	10	8	6	0	2	2	0
MS+ИУК(1мг/л)	12	0	10	0	1	3-4	5
MS+1мг/л ИУК	10	4	3	0	1	2	0
MS+0,2мг/лГК+1мг/л ИУК	8	0	5	3 витриф	0	2-3	3
MS+БАП (0,1мг/л) + ГК(0,2мг/л)	10	16	10	0	6	2-3	0
MS+Кин (0,1мг/л) +ГК(0,2мг/л)	8	4	3	1 витриф	0	2	0
2 пассаж							
без гормонов	15	6	4	0	2	2	0
MS+ИУК (1мг/л)	20	0	17	0	3	3-4	14

MS+0,2мг/лГК+1мг/л ИУК	14	0	9	5 витриф	0	2-3	1
MS+БАП (0,1мг/л) + ГК(0,2мг/л)	25	28	24	0	4	2-3	0
3 пассаж							
MS+ИУК (1мг/л)	50	0	46	0	4	3-4	38
MS+БАП (0,1мг/л) + ГК(0,2мг/л)	68	72	66	0	6	2-3	0

При использовании среды MS+БАП (0,1мг/л) + ГК(0,2мг/л) оказалось, что у каждого экспланта пробуждались по 1 пазушной почке, а у шести эксплантов по 2 пазушных почки. При этом побеги были темно зеленого цвета.

На среде MS + Кин (0,1мг/л) + ГК (0,2мг/л) отмечалась витрификация 1 побега. Побеги при культивировании на этой среде были слабые, тонкие и не вытягивались в рост.

Культивирование на среде MS+0,2мг/л ГК+1мг/л ИУК вызывало витрификацию побегов.

После нескольких пассажей на разные питательные среды выяснилось, что лучшей средой для микроразмножения растений рода *Astragalus* в наших опытах оказалась среда с добавлением 0,1мг/л БАП+0,2 мг/л ГК. На данной среде у каждого листа *A. duanensis* образуются хорошо развитые боковые побеги. После первого пассажа образуются каллус на данной среде, постепенно каллус теряется после нескольких пересадок.

Процесс ризогенеза отмечался на среде MS+ИУК (1мг/л) во всех трех пассажах. Эта среда оказалась оптимальной для формирования корней у проростков.

На рис. 1 показаны этапы введения его в культуру *in vitro*.



Рис. 1. Этапы микроразмножения: 1 – проращивание семян; 2 – пробирочное растение; 3 – ризогенез.

В результате экспериментальной работы был разработан протокол микроразмножения *Astragalus duanensis*. выбран способ и подобраны оптимальные среды для микроразмножения

Вид	Способ микроразмножения	Оптимальная среда для микроразмножения	Среда для укоренения
<i>Astragalus duanensis</i>	микрочеренкование	MS+0,1мг/л БАП+0,2 мг/л ГК	MS+1мг/л ИУК

Таким образом, нами был введен в культуру *in vitro* эндемичный вид – астрагал дуанский. Подобраны условия для проращивания семян. Определена лабораторная всхожесть семян и всхожесть после хранения при -20°C и в жидком азоте. Подобран способ микроразмножения - микрочеренкование. Подобраны оптимальные питательные среды для микроразмножения - MS+0,1мг/л БАП+0,2 мг/л ГК и укоренения - MS+1мг/л ИУК.

Результаты исследования важны для сохранения в банке тканевых культур эндемика. Результаты могут быть использованы для последующей реинтродукции эндемика. Полученные протоколы микроразмножения астрагала дуанского могут быть использованы для изучения потенциально фармакологической ценности растения. Микрочеренкование позволит получить большое количество растений для использования его в декоративных целях.

Литература

- Vellak, A. Past and Present Effectiveness of Protected Areas for Conservation of Naturally and Anthropogenically Rare Plant Species. [Text] / A. Vellak, E-L. Tuvi, Ü. Reier, R. Kalamees, E. Roosaluuste, M. Zobel, M. Partel // Conservation Biology. – 2009. - V. 23. Issue 3. - P. 750-757.
- Bonner, F.T. Storage of seeds: Potential and limitations for germplasm conservation [Text] / F.T. Bonner // Forest Ecol. Management. – 1990. – V. 35. – P. 35-13.
- Нестерова, С.В. Долговременное хранение семян дикорастущих растений Приморского края [Текст] / С.В. Нестерова // Биологическое разнообразие. Интродукция растений. Материалы II Междунар. научн. конф. – СПб., 1999. – С. 363-365.
- Scarascia-Mugnozza, G.T. Managing plant genetic diversity. [Text] / G.T. Scarascia-Mugnozza, P. Perrino // IPGRI, 2002.
- Shibli, R.A. In vitro conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A review. [Text] / R.A. Shibli, R.A. Shatnawi, W.S. Subaih, M. Ajlouni // World journal of agricultural sciences. - 2006. – V. 2(4). – P. 372-382.
- Adams, R.P. Conservation of Plant Genes: DNA Banking and in vitro Biotechnology [Text] / R.P. Adams, J.E. Adams. – 1992. - Academic, San Diego.

7. Умралина, А.Р. Атлас эндемичных и редких видов растений Кыргызстана [Текст] / А.Р. Умралина, Г.А. Лазьков. - Бишкек. - 2008. - 164 с.
8. FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations [Text] / Report on the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome: FAO. - 1996.
9. Genebank standards [Text] / Food & Agriculture Organisation of United Nations. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 1994. – 13 p.
10. Post harvest handling // Technical information sheet 4. Millennium Seed Bank Project. Royal Botanic Garden. Kew. - 2007.
11. Тихонова, В.Л. Долговременное хранение семян [Текст]/ В.Л. Тихонова // Физиология растений. - 1999. - Т. 46. № 3. - С. 467-476.
12. Laliberte, B. Botanic garden seed banks/genebanks worldwide, their facilities, collections and network [Text]/ B. Laliberte // Bot. Gard. Conserv. News. – 1997. – V. 2 – P.18-23.
13. Николаева, М.Г. Справочник по проращиванию покоящихся семян [Текст]: / М.Г. Николаева, М.В. Разумова, В.Н. Гладкова – Л.: «Наука», Ленинградское отделение, 1985. – 347 с.
14. Cavanagh, T. Germination of hard-seeded species (Order Fabales) [Text] / T. Cavanagh // In Langkamp P. (ed.) Germination of Australian native plant seeds. -1987. - Inkata Press, Melbourne, Australia. – P. 15.
15. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue. [Text] / T. Murashige, F. Skoog //Physiol. Plantarum. - 1962. – V. 15. – P. 473-479.
16. Street, H.E. Growing roots without plants [Text] / H.E Street // Discovery. – 1954. – V. 15. – P. 286-292.
17. Методические указания по семеноведению интродуцентов [Текст] / М.: Наука, 1980. – 64 с.
18. Ракова, М.В. Особенности покоя семян дикорастущих бобовых [Текст] / М.В. Ракова // Биологические основы семеноведения и семеноводства интродуцентов. - Новосибирск, 1974. - С. 228-229.

Рецензент: д.б.н., профессор Быковченко Ю.Г.