

УДК 57.085.23

РАЗМНОЖЕНИЕ АСТРАГАЛА МОНГОЛЬСКОГО
{*ASTRAGALUS MONGHOLICUS* BGE.) В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Э. АЛТАНЦЭЦЭГ, Е.А. КАЛАШНИКОВА

(РГАУ-МСХА имени КА. Тимирязева)

*В статье обсуждается вопрос о влиянии гормонального состава питательной среды на морфогенетический потенциал изолированных эксплантов астрагала монгольского. Установлены оптимальные условия культивирования семян и изолированных эксплантов (минеральный и гормональный состав питательной среды), обеспечивающие интенсивную пролиферацию побегов и формирование микропобегов астрагала монгольского (*Astragalus mongholicus* Bge.) in vitro.*

Ключевые слова: астрагал монгольский, морфогенез, микроразмножение, адвентивные почки, изолированные экспланты, in vitro.

В последнее время особый интерес представляют лекарственные растения — продуценты веществ вторичного синтеза, которые могут воздействовать различным образом на микроорганизмы, животных и человека. Из 250000-500000 видов высших сосудистых растений планеты около 80000 имеют лекарственное значение и лишь 0,5% из них прошли скрининг на выявление лекарственных свойств [4]. Одним из преимуществ получения биологически активных веществ из растений является широкий их спектр активности и экологическая безопасность их получения [3]. В то же время использование лекарственных растений в будущем может быть существенно ограничено в связи с проблемой истощения биологических ресурсов. Прогнозируется увеличение числа видов растений, находящихся под угрозой исчезновения, от 18 тыс. в настоящее время до 60 тыс. к середине XXI в. Лекарственные растения среди них составят большую часть, так как являются категорией, особо уязвимой вследствие интенсивной, нерациональной, недостаточно контролируемой заготовки сырья [4].

Астрагалы относятся к семейству бобовых и представляют обширный род, насчитывающий до 2500 видов. Монгольское название — Хунчир, тибетское — Нян-ар. В Монголии этот род представляют до 59 видов астрагала. Все они многолетние травянистые растения до 70 см высоты с обильными стеблями и большим количеством листьев. Корни толстые, стержневые (рис. 1).



а

б

Рис. 1. Астрагал монгольский (*Astragalus mongholicus* Vge.): а — цветки, б — общий вид растения

Астрагал монгольский (*Astragalus mongholicus* Vge.) — редкий узколокальный эндемик флоры Монголии, встречается в Хангае, долине и котловине озер по песчаным степям, каменистым склонам, в зарослях кустарников и на опушках лиственных лесов (рис. 2). Размножается только семенами, однако всхожесть их низкая.

В китайской, тибетской и монгольской медицине астрагал монгольский применяют при злокачественных опухолях, сахарном диабете, нарушении обмена веществ, сердечно-сосудистых и других заболеваниях.

В связи с этим изучение особенностей культивирования изолированных тканей астрагала монгольского в условиях *in vitro* и усовершенствование технологии клонального микроразмножения с использованием различных первичных эксплантов на сегодняшний день является весьма перспективным направлением исследований.

Методика

Объектом исследования служили семена астрагала монгольского, собранные в Монголии. Семена поверхностно стерилизовали раствором сулемы (0,1%) в течение 10 мин., после чего их трижды промывали стерильной дистиллированной водой и помещали для проращивания на безгормональную питательную среду Мурасига и Скуга (МС) [5], содержащую сахарозу в концентрации 3% и агар — 0,7%. Стерилизацию питательных сред, посадочного материала и работу в асептических условиях проводили согласно методикам, разработанным на кафедре генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА [1].

Для индукции образования адвентивных почек и побегов в состав питательной среды добавляли БАП, 2ip, кинетин и препарат дропп в различных концентрациях (1-2 мг/л) в сочетании с ИУК — 1 мг/л.



Рис. 2. Ареалы произрастания астрагала монгольского (*Astragalus mongholicus* Bge.)

Экспланты культивировали при температуре 24 °С, 16-часовом фотопериоде, освещении белыми люминесцентными лампами с интенсивностью 3 тыс. лк.

Пересадку микрокультуры осуществляли с подбором оптимального времени культивирования, которое определялось скоростью роста микропобегов.

Опыты проводили в четырехкратной повторности. Данные экспериментов представлены в виде $\bar{x} \pm t_{05} \cdot S_{\bar{x}}$, где \bar{x} — среднее значение; $S_{\bar{x}}$ — ошибка средней; t_{05} — значение критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что исследуемые семена астрагала монгольского обладают 100% всхожестью. Уже на 3-и сут. наблюдали прорастание семян и развитие корешка, а через 2 нед. — формирование хорошо развитого проростка (рис. 3).

Состав питательной среды играет определяющую роль на этапе микроразмножения. С этой целью исследовали среды, содержащие БАП в различных концентрациях (1–3 мг/л) в сочетании с НУК 0,5 мг/л. На этих средах культивировали различные экспланты (сегменты семядолей, гипокотили, апикальные почки), изолированные со стерильных проростков. Для клонального микроразмножения был выбран метод индукции образования адвентивных почек на первичном экспланте.

Экспериментально установлено, что присутствие в составе питательной среды БАП в концентрации 3 мг/л приводило к образованию адвентивных почек только в случае использования верхушечных меристем. В этом варианте в базальной части почек формировалось от 3 до 5 микропобегов, которые в дальнейшем развивались в растения (рис. 4).

В остальных вариантах образование почек *de novo* не наблюдали, а было отмечено лишь формирование каллусной ткани.

На этапе собственно микроразмножения необходимо добиться получения максимального количества мериклонов, учитывая при этом, что с увеличением числа



а

б

в

Рис. 3. Формирование проростков астрагала монгольского in vitro: а — на 7-е сут.; б — на 15-е сут.; в — на 21-е сут.



а

б

в

Рис. 4. Образование адвентивных побегов и каллусной ткани астрагала монгольского (*A. mongholicus* Vge.): а — верхушечная почка; б — семядоли; в — гипокотиль

субкультивирований увеличивается число растений-регенерантов с ненормальной морфологией и возможно образование растений-мутантов. Основную роль при подборе оптимальных условий культивирования эксплантов играют соотношение и концентрация внесенных в питательную среду ауксинов и цитокининов.

Исследования показали, что в процессе культивирования микрочеренков астрагала монгольского на питательных средах, содержащих различные гормоны, или на безгормональной среде формировались побеги, отличающиеся по скорости роста. На II пассаже было отмечено, что в вариантах с присутствием гормонов в питательной среде высота микропобегов была в 1,6 раза меньше по сравнению с контрольным вариантом (безгормональная среда) (рис. 5).

Однако в вариантах с гормонами отмечается высокая способность эксплантов к регенерации, в частности, к образованию адвентивных побегов. Число их составило в среднем 5,4 шт. на среде с 2ip (рис. 6, 7 а) и 7,2 шт. — на среде с дроп (рис. 6, 7 б), что соответственно в 1,7 и 2,3 раза выше контрольного варианта (3,2 шт.) (рис. 6, 7 в).

При дальнейшем культивировании микропобегов в течение трех последующих пассажей на тех же вариантах питательных сред наблюдали увеличение скорости роста образовавшихся микроклонов по сравнению с результатами 2-го пассажа (рис. 6). Следует отметить, что длительное культивирование микропобегов на средах, содер-

Длина микробегов , см

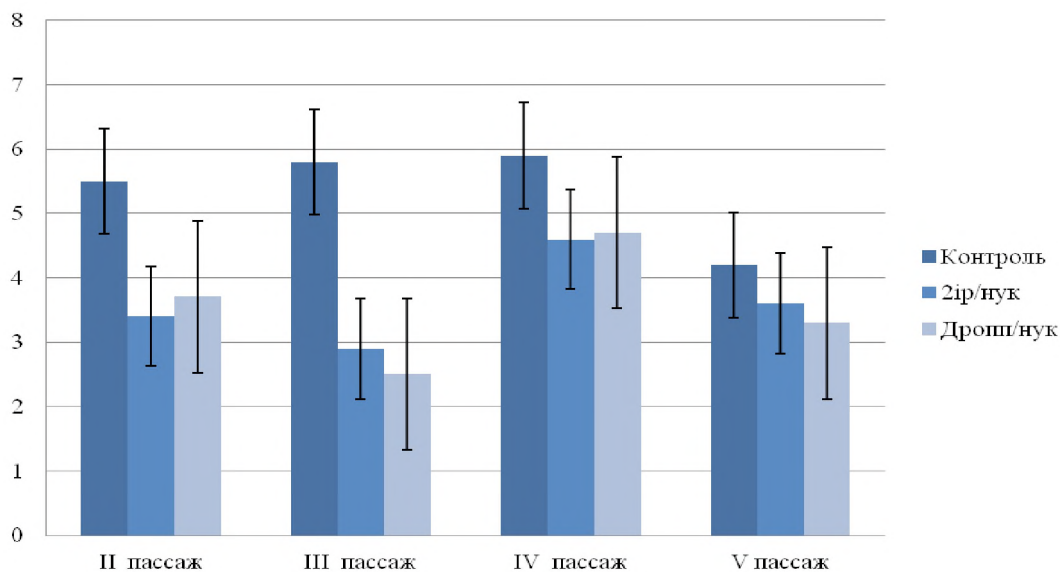


Рис. 5. Длина микробегов астрагала монгольского (*Astragalus mongholicus* Вге.)

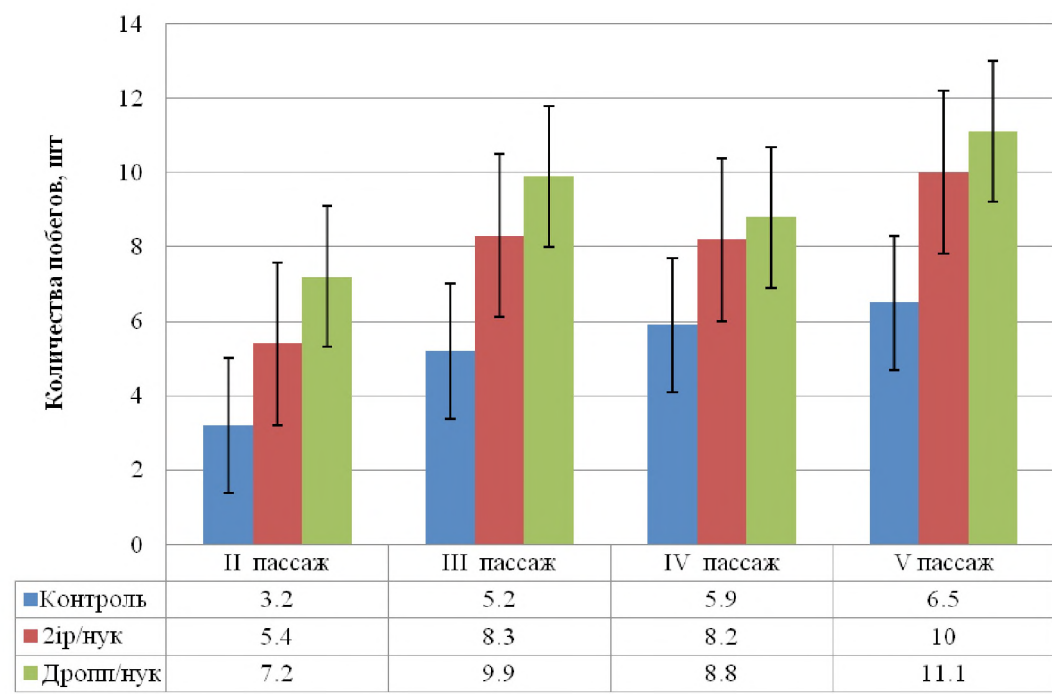


Рис. 6. Количество микробегов на одном экспланте астрагала монгольского (*Astragalus mongholicus* Вге.)

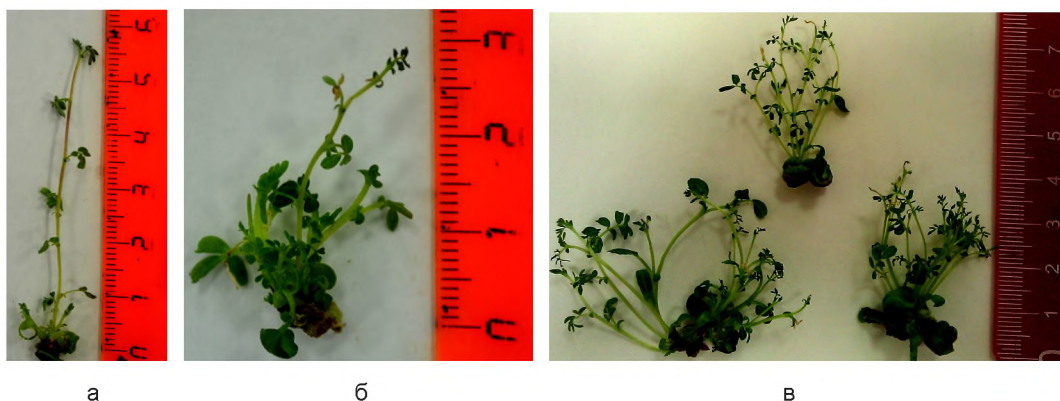


Рис. 7. Микропобеги астрагала монгольского на II пассаже: а — безгормональная питательная среда; б — питательная среда с добавлением 2ip; в — с добавлением препарата дропп

жащих гормоны, приводило к увеличению морфогенетической активности эксплантов. Учитываемый показатель (число адвентивных побегов) на 5-м пассаже составил в среднем 10,0 шт. на среде с 2ip и 11,1 шт. — на среде с препаратом дропп, что в 1,5-1,8 раза выше по сравнению с результатами 2-го пассажа (рис. 8).



Рис. 8. V пассаж культивирования астрагала монгольского на питательной среде: а — содержащей 2ip; б — содержащей препарат дропп

Однако проведенные визуальные наблюдения позволили выявить некоторые морфологические изменения, которые проявлялись в большей степени в вариантах с присутствием гормонов (рис. 9). Отмечено образование побегов с утолщенным стеблем и формирование листьев с ярко-зеленой окраской. По-видимому, это связано с присутствием в составе питательной среды факторов гормональной природы. Из литературных данных известно, что именно ауксины в сочетании с цитокининами приводят к таким ответным реакциям, которые, как правило, проявляются в формировании витрифицированных побегов.

При длительном культивировании растительных тканей на питательных средах с повышенным содержанием гормонов происходит постепенное их накопление в тканях выше необходимого физиологического уровня, что приводит к появлению

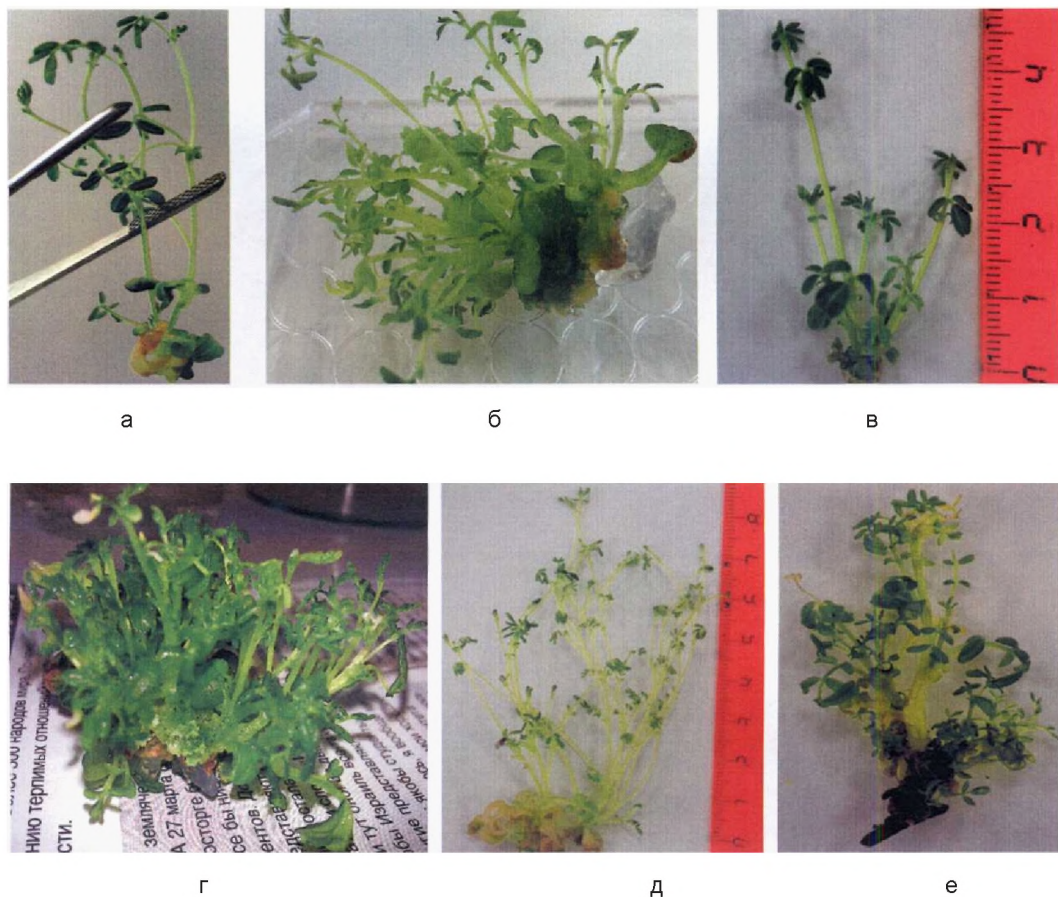


Рис. 9. Растения-регенеранты, выращенные на разных вариантах питательных сред: а — безгормональная питательная среда; б — среда с добавлением 2ip (II пассаж); в — среда с добавлением препарата дропп (III пассаж); г — среда с добавлением 2ip (IV пассаж); д — среда с добавлением препарата дропп (IV пассаж); е — среда с добавлением препарата дропп (V пассаж)

токсического действия и формированию растений с измененной морфологией. Вместе с тем можно наблюдать такие нежелательные для клонального микроразмножения эффекты, как подавление пролиферации пазушных меристем, образование оводненных побегов и уменьшение способности растений к укоренению.

Отрицательное действие цитокининов можно преодолеть, по данным Н.В. Катаевой и Р.Г. Бутенко, используя питательные среды с минимальной концентрацией цитокининов, обеспечивающих стабильный коэффициент микроразмножения, или чередованием циклов культивирования на средах с низким и высоким уровнем фитогормонов [2].

В наших исследованиях было изучено влияние условий культивирования на содержание свободной воды в клетках микроклонов астрагала монгольского (рис. 10).

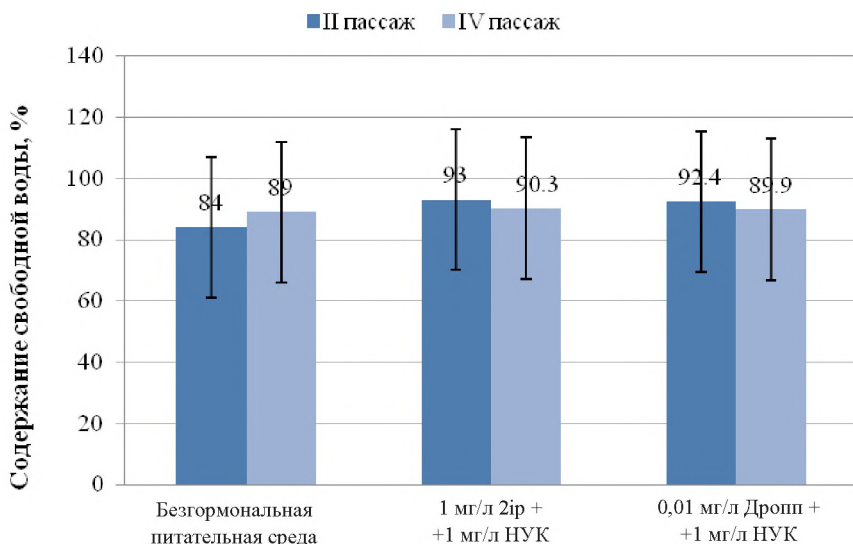


Рис. 10. Биометрические показатели количества микропобегов Астрагала монгольского (*Astragalus mongholicus* Bge.)

Исследования показали, что в контрольном варианте (безгормональная среда) содержание свободной воды составило 84%, в то время как в вариантах с 2ip и дроп этот показатель был выше и составил в среднем 93%. Эти показатели согласуются с ранее полученными нами данными, а именно, что в контрольном варианте наблюдали более интенсивный рост побегов по сравнению с опытными вариантами. При дальнейшем культивировании микропобегов в течение трех последующих пассажей на тех же вариантах питательных сред наблюдали уменьшение содержания в тканях микропобегов свободной воды, что отразилось на скорости роста побегов и на морфогенетическом потенциале культивируемых тканей *in vitro*.

Таким образом, в результате проведенной работы нами были подобраны условия культивирования семян и изолированных эксплантов из стерильных проростков на первом этапе клонального микроразмножения астрагала монгольского (*Astragalus mongholicus* Bge.) и подобраны условия для размножения.

Библиографический список

1. Калашникова Е.А., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. М.: КолосС, 2006. 162 с.
2. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. 96 с.
3. Пасеичниченко В.А. Растения — продуценты биологически активных веществ // Соровский образовательный журнал. 2001. т. 7. №8. С. 13—19.
4. Редькина Н.Н. Оптимизация сохранения биологического разнообразия лекарственных растений на популяционной основе: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. Оренбург, 2008. 38 с.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. 15 (13): 473—497.

PROPAGATION OF *ASTRAGALUS MONGHOLICUS* IN VITRO

E. ALTANTSETSEG, E.A. KALASHNIKOVA

(RSAU-MAA named after K. A. Timiryazev)

This article discusses the influence of hormonal composition of culture medium on morphogenetic potential of isolated explants (Astragalus mongholicus Bge.). The optimal conditions for cultivation of seeds (mineral and hormonal composition of culture medium), providing intensive proliferation of shoots and formation of microplants Mongolian Milk vetch (Astragalus mongholicus Bge.) in vitro.

Key words: morphogenesis, micropropagation, adventitious buds, axillaries buds, isolated explants, in vitro.

Энхтайван Алтанцэцэг — асп. кафедры генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 976-40-72; e-mail: altantsetseg_916@yahoo.com).

Калашникова Елена Анатольевна — д. б. н., проф. кафедры генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 976-40-72; e-mail: kalaslimkova@timacad.ru).