

Конурбаева Р.У., Алдаярбек кызы Гулзар, Умралина А.Р.

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ И СОХРАНЕНИЕ В КОЛЛЕКЦИИ  
IN VITRO КОПЕЕЧНИКОВ КЫРГЫЗСТАНА

Конурбаева Р.У., Алдаярбек кызы Гулзар, Умралина А.Р.

КЫРГЫЗСТАНДАГЫ ТЫЙЫНЧАНАКТАРДЫН IN VITRO ӨСТҮРҮҮСҮН  
КИРГИЗҮҮ ЖАНА АЛАРДЫН САКТОО КОЛЛЕКЦИЯСЫ

R.U. Konurbaeva, Aldayrbek kyuzy G., A.R. Umralina

INTRODUCTION TO IN VITRO CULTURE AND  
MAINTENANCE OF IN VITRO COLLECTIONS OF HEDYSARUM GENUS SPECIES OF  
KYRGYZSTAN

УДК:576.8.093.1 (572) (04)

Разработаны протоколы введения в культуру *in vitro* копеечников (*Hedysarum*) Кыргызстана. Подобраны условия для проращивания семян и определены их морфометрические показатели. Подобраны оптимальные питательные среды для микроразмножения - B5+ИМК (0,25мг/л)+БАП (0,1мг/л) и укоренения - B5+ИМК (0,25мг/л).

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

Кыргызстандагы тыйынчанактарды *in vitro* өстүрүү ыкмалары иштелип чыкты. Уруктун өнүп чыгуу шарттары тандалды жана анын морфометриялык көрсөткүчү аныкталды. Микроразмножотуу үчүн - B5+ИМК (0,25мг/л)+БАП (0,1мг/л) жана тамырлануу үчүн B5+ИМК (0,25мг/л) оптималдуу азык чөйрөлөрү тандалды.

**Негизги сөздөр:** эндемиктер, тыйынчанак, түрлөрдү сактоо, дарылык жана декоративдик өсүмдүктөр, *in vitro* өстүрүү, микроразмножотуу.

Protocols of introduction to *in vitro* culture of *Hedysarum* genus species of Kyrgyzstan were developed. Seed germination conditions were optimized and their morphometric characteristics were determined. Optimal culture media for micropropagation – B5+IBA (0,25 mg/L) +BAP (0.1 mg/L) and rooting – B5+ IBA (0,25 mg/L) were selected.

**Key words:** endemic, kopееchnik, the conservation of the species, medicinal and ornamental plants, *in vitro* culture, micropropagation.

Род *Hedysarum* (копеечники) семейства Fabaceae является одним из многочисленных родов растений, произрастающих в Кыргызстане. Практически половина численности копеечников Кыргызстана имеет природоохранный статус эндемики и редкие растения [1]. В природных условиях

Кыргызстана произрастает до 40 видов копеечников, что составляет 14% всех видов копеечников планеты. Наибольшее разнообразие видов сконцентрировано в Памиро-Алае и Тянь-Шане. Это подтверждает значительную самобытность видообразования рода *Hedysarum*.

Этот род также является одним из перспективных в фармакологическом отношении [2,3]. Современными исследователями подтверждается биологическая активность соединений, выделенных из растений этого рода, благодаря которым, они находят применение в народной медицине как противобактериальные и противовирусные препараты.

В семенном банке Института собрано и хранится 17 видов этого рода, для определения качества семян используются такие важные параметры как морфометрическая характеристика и определение их всхожести, мониторинг всхожести семян во время хранения.

Цель работы - введение в культуру *in vitro* копеечников из собранных семян, а также подбор сред для микроразмножения и укоренения этих видов растений.

**Материалы и методы**

Объектами исследований служили следующие виды копеечников: *H. cephalotes*, *H. cumuschtanicum*, *H. ferganense*, *H. neglectum*, *H. songoricum*, *H. semenovii* (*sin.H. flavum*), *H. sultanovae*, *H. montanum*, *H. plumosum*. Из них 2 вида эндемики, 5 видов субэндемиков и 2 вида широко распространенных. Эти виды наряду с другими видами копеечников хранятся в семенном банке Института биотехнологии (табл.1).

Таблица 1 - Список изучаемых видов копеечников, хранящихся в банке семян Института биотехнологии НАН КР

№	вид	статус	год сбора	Место сбора	Места распространения*	Идентификационный Номер в банке
1	<i>Hedysarum cumuschtanicum</i> B. Sultanova	E,VU	2005	Таласский хребет, ущелье реки Кумуштаг, арчевник, 2063м	ЗТ, ПФ	BLCKg-446
2	<i>Hedysarum cephalotes</i> Franch.	SE	2006	Алайский хребет, урочище реки Оксу. 2502 м	ЗТ, А	BLCKg-511
3	<i>Hedysarum songoricum</i> B.Fedtsch.	SE	2006	Хребет Кавак-Тоо, 2079 м	СК, ПИ, ЗТ, ПФ,ВТ	BLCKg-517
4	<i>Hedysarum ferganense</i> Korsh.	SE	2007	Между хребтом Ак-Шийрак и Ферганским хребтом, перевал Ой-Кайын, 1849 м	СК, ПИ, ПФ, ВТ	BLCKg-597
5	<i>Hedysarum neglectum</i> Ledeb.	шр	2008	Ферганский хребет, между с. Кош-Дюбе и перевалом Шордобель, 2440 м	СК, ПИ, ЗТ, ПФ,ВТ,А	BLCKg -60
6	<i>Hedysarum semenovii</i> Regel et Herd. ( <i>sin. Flavum</i> Regel&Herder)	SE	2008	Таласский хребет, северный макросклон,правый приток реки Аташ-Чапкан 2085 м	СК,ПИ,ЗТ,ВТ	BLCKg -61
7	<i>Hedysarum sultanovae</i> Lazkov	Е	2009	Киргизский хребет, 11 км на северо-запад от села Юрьевка. 1070 м	СК	BLCKg-185
8	<i>Hedysarum montanum</i> ( B.Fedtsch. ) B.Fedtsch.	SE	2011	Чуйскфя область, северный макросклон, хребет Кыргызского Ала-Тоо Бассейн реки Аламедин. 1360 м	СК, ПИ, ПФ,ВТ	BLCKg-691
9	<i>Hedysarum plumosum</i> Boiss. et Hausskn	шр	2013	Хребет Ичкеле-Тоо, южный макросклон, близ с. Минг-Булак, 1110 м	ЗТ,ПФ,ВТ,А	BLCKg-1016

\***ПИ**-Иссык-Кульская котловина (включая северные склоны Кунгей Ала-Тоо, южные склоны Кунгей Ала-Тоо и долину реки Тюп)

**ПФ**-Приферганские районы Кыргызстана (включая южные склоны Чаткальского и Ферганского хребтов и северные склоны Алайского и Туркестанского хребтов)

**ЗТ**-Западный Тянь-Шань (включая Токтогульскую котловину, Таласскую и Чаткальскую долины)

**А**-Алайская долина (включая южные склоны Алайского и северные склоны Заалайского хребтов)

**ВТ**-Внутренний Тянь-Шань (район ограничен на севере Киргизским хребтом, на юго-западе Ферганским хребтом, и на юго-востоке хребтом Кокшаал-Тоо)

**СК**-Северный Кыргызстан (Чуйская долина, долина р. Чон-Кемин с прилегающими северными склонами Киргизского хребта и Кунгей Ала-Тоо)

**ЦТ**-Центральный Тянь-Шань (бассейн р.Сары-Джаз)

**Э**-эндемичный вид (встречается только в пределах Кыргызстана)

**СЭ**-субендемичный вид (ареал вида охватывает Кыргызстан, отчасти территории других среднеазиатских республик и Китая)

**КРВ**-краснокнижный

**ШР**-широкораспространенный вид (ареал вида охватывает значительные области Палеарктики, или вид распространен еще шире)

**Морфометрия семян.** Собранные семена тщательно очищались вручную, отбирались выполненные экземпляры. Проводилось морфометрическое исследование семян: определены 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. Результаты статистически обрабатывались с помощью программы Microsoft Excel.

**Стерилизация семян.** При определении всхожести семян, семена стерилизовали и высаживали для проращивания в чашки Петри с агаризованной средой Мурасиге и Скуга (MS) [4] без гормонов. Стерилизацию семян проводили несколькими

способами, в зависимости от морфологии семян. Мелкие семена с тонкой кожурой стерилизовали 30-40 секунд в 96° этиловом спирте, затем 5 минут в 5% растворе гипохлорида натрия и 5 минут в 33% перекиси водорода. После каждого этапа – несколько раз отмывали стерильной дистиллированной водой.

**Определение всхожести.** Ограниченное количество доступных семян не позволило провести определение лабораторной всхожести по общепринятым стандартам, поэтому о всхожести судили по количеству проросших стерильных семян на среде МС, при введении этих растений в культуру. Подсчет проросших семян вели ежедневно.

**Микроразмножение.** Стерильные проростки, полученные при определении всхожести, служили эксплантами для микроразмножения. Микроразмножение проводили двумя способами – микрочеренкованием при помощи гормональных добавок в питательную среду. Основой всех сред для микроразмножения были агаризованные среды МС и Стрита [5] с добавлением фитогормонов и гормоноподобных синтетических регуляторов роста в различных концентрациях и сочетаниях. Для мультипликации побегов использовались среды с добавлением: кинетина (Кин) и 6-бензиламинопурина (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(ауxin) типа:  $\gamma$ -индолилмасляную кислоту (ИМК),  $\beta$ -индолилуксусную кислоту (ИУК).

### Результаты и их обсуждение

**Морфометрические показатели** семян копеечников отличались существенно (табл.2). Длина и ширина семян варьировала от 2,55 у *H. montanum* до 4,41 мм у *H. semenovii* и от 2,12 у *H. montanum* до 3,71 мм у *H. chaitocarpum*, соответственно. Масса 1 тысячи семян также существенно отличались в зависимости от вида, так минимальный вес 4,69 г отмечен у *H. cumuschtanicu*, а максимальный 13,3 г – у *H. chaitocarpum*. Помимо видовых различий, по-видимому, сказывались такие факторы как год сбора и местообитание растений, что видно на примере *H. semenovii* сбора 2008 и 2013 годов и собранных их разных мест (табл.2).

Таблица 2 - Морфометрические характеристики копеечников

Вид	Год сбора	Размеры семян, мм		Масса 1000шт. семян, г
		Длина, min-max	Ширина, min-max	
<i>H. chaitocarpum</i>	2004	3,23 ± 0,27 2,7 - 4,0	3,71 ± 0,33 3,2 - 4,2	13,3 ± 0,14
<i>H. cumuschtanicum</i>	2005	2,79 ± 0,26 2,4-3,3	2,28 ± 0,24 2,0-2,7	4,69 ± 0,06
<i>H. neglectum</i>	2008	3,75±0,34 3,0-4,5	2,31±0,23 2,0-2,5	8,61±0,09
<i>H. sultanovae</i>	2009	3,41±0,32 2,8-3,9	2,64±0,24 2,4-3,0	13,35±0,09
<i>H. montanum</i>	2011	2,55±0,21 2,2-3,1	2,12±0,17 1,8-2,5	5,870±0,046
<i>H. plumosum</i>	2013	2,927±0,250 2,3-3,4	2,473±0,006 2,0-3,0	5,013±0,064
<i>H. semenovii</i> *	2013	4,413±0,355 3,5-5,1	3,500±0,265 3,0-4,2	11,123±0,190
<i>H. semenovii</i> *	2008	3,76±0,40 3,0-4,5	2,33±0,22 2,0-2,6	7,419±0,19

### Всхожесть семян.

Для большинства представителей семейства Fabaceae, особенно диких видов, характерна твердо-семянность, а для некоторых дополнительно и

физиологический покой различной глубины. Многие семена находятся в глубоком комбинированном покое и прорастают только после длительной холодной стратификации, перед которой семена необходимо подвергать скарификации. Поэтому мы стерилизовали и одновременно обрабатывали концентрированной серной кислотой в течение 15 мин семена копеечников. На скорость прорастания большое влияние оказал тот факт, что во время хранения при -20°C были достаточно сильно повреждены покровы семян (табл.3). Два опытных варианта *H. plumosum* сбора 2013 года имели всхожесть семян 53 и 73 %, при этом более высокий показатель всхожести принадлежал варианту с семенами, хранившимся один год при -20°C, против опытного образца, испытанному сразу после сбора (рис.1).

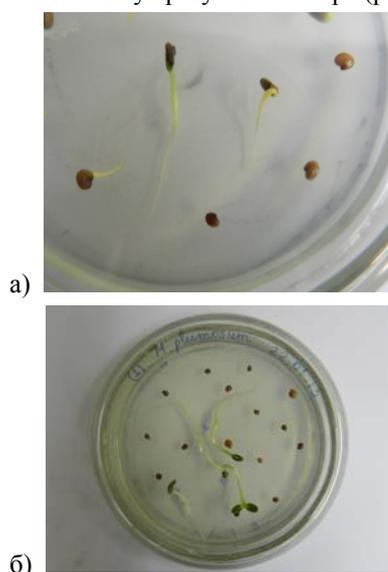


Рис. 1. а) прорастание семян *H. plumosum* испытанный сразу после сбора; б) прорастание семян *H. plumosum* испытанный после одного года хранения при -20°C

Семенные покровы полностью разрушились после обработки серной кислотой, которой подвергались семена бобовых, и семена оголились. Такая скарификация сказалась положительно на всхожесть семян, все они проросли практически одновременно, в короткие сроки. После такой обработки семена прорастали довольно быстро, начиная со второго дня у *H. neglectum*, *H. semenovii*, остальные семена проросли на третий-четвертый день (рис.2).



Рис. 2. Прорастание семян *H. neglectum*

Таблица 3 - Всхожесть семян копеечников после хранения при -20°C

№	Вид	Статус	Год сбора	Период прорастания, дней	Всхожесть, %
1	<i>H. cephalotes</i>	SE	2006	4-29	53±5,03
2	<i>H. cumuschtanicum</i>	E,VU	2005	4-20	27±1,73
3	<i>H. montanum</i>	SE	2011	4-28	57±7,21
4	<i>H. ferganense</i>	SE	2007	3-8	73±6,81
5	<i>H. neglectum</i>	шр	2008	2-9	90±8,89
6	<i>H. plumosum</i>	шр	2013	4-18	53±10,79
6a	<i>H. plumosum</i>	шр	2013	4-22	73 ±5,13
7	<i>H. sultanovae</i>	E	2009	4-22	73±5,13
8	<i>H. songoricum</i>	SE	2006	3-8	50±3,51
9	<i>H. semenovii</i>	SE	2008	2-13	97±13,61
9a	<i>H. semenovii</i>	SE	2013	4-12	57±3,47

Наилучшую всхожесть показали *H. ferganense*, *H. neglectum*, *H. semenovii*, *H. sultanovae* и *H. plumosum* (Табл.3).

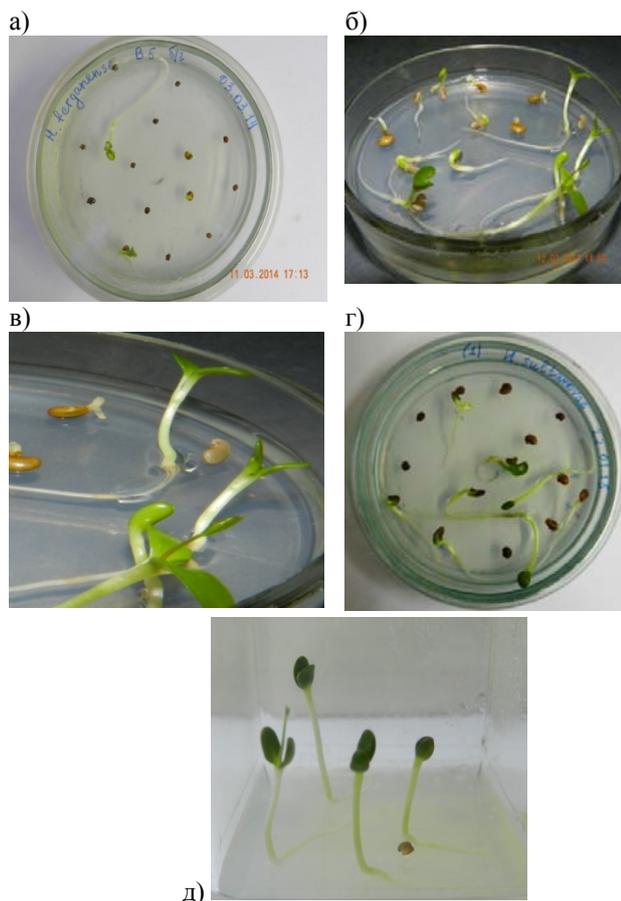


Рис. 3. Всхожесть семян: а) *H. ferganense* б) *H. neglectum* в) *H. semenovii* г) *H. sultanovae* д) *H. plumosum*.

Прорастание заканчивалось у разных видов копеечников в разные сроки - от 8 до 29 дней. Такой неравномерный выход из состояния покоя объясняется тем, что семена дикорастущих бобовых обладают различной степенью твердосемянности в образцах одного и того же сбора, а тем более разных сборов [6]. Это явление отчетливо можно проследить на примере сопоставления всхожести семян вида *H. semenovii* 2008 и 2013 годов сбора – 57 и 97%, соответственно. Такую разницу можно объяснить повреждением покровов семян при долгом низкотемпературном хранении, а также морфометрическими различиями (табл.2) и условиями местообитания.

**Введение в культуру и микроразмножение.**

Стерильные проростки двудольных растений, полученные при определении всхожести, служили эксплантами для микроразмножения. Микроразмножение проводили микрочеренкованием на агаризованных средах МС и Стрита с добавлением ИМК в концентрации 0,5 мг/л и использовалась среда Гамборга В5 с добавлением кинетина и БАП в концентрации 0,1 мг/л и ИМК в концентрации 0,25 мг/л. Подобраны среды для микроразмножения 3 видов растений:

*H. montanum*, *H. plumosum*, *H. sultanovae*.

Полученные данные показали, что лучшей средой для микроразмножения растений рода *Hedysarum* оказалась среда В5 с добавлением 0,1мг/л БАП и Кин. по отдельности (табл.4). На среде с добавлением БАПа побеги более плотные и образуют по 2-3 междоузлия, нежели на Кинетине. Однако для укоренения видов растений эти среды не подходят. На средах МС ½ и Стрита с добавлением ИМК побеги развивались слабо, рост растений был медленным. На среде МС ½ только *H. montanum* дал корни на 20-е сутки. На среде Стрита четкое корнеобразование наблюдается у растений двух видов:

*H. montanum* и *H. sultanovae*.

У третьего вида *H. plumosum* наблюдалось замедленное появление зачатков корней которые далее в рост не пошли. Несмотря на то, что побеги данных видов укоренились, скорее всего, эти среды не подходят для укоренения, так как процент укоренения меньше 50%. Однако, на среде В5 с добавлением ИМК 0,25 мг/л у всех трех видов образовались хорошо развитые корни.

Таблица 4 - Влияние состава среды и гормонов на рост и развитие эксплантов у *H. montanum*, *H.sultanovae*, *H.plumosum*

Варианты питательных сред	Количество посаженных черенков	Количество пробужденных пазушных почек	Количество нормально развивающихся побегов	Количество погибших и витрифицированных черенков	Количество укороченных побегов	Количество междоузлий у нормально развивающихся побегов	Образование корней
<b>1пассаж <i>H. montanum</i> (B.Fedtsch)- Копеечник горный (сэ)</b>							
MS 1/2+ИМК (0,5мг/л)	9	4	4	0	0	1-2	4
St +ИМК (0,5мг/л)	8	5	5	0	1	1-2	5
B5+ИМК (0,25мг/л)	10	11	8	0	3	1-2	10
<b>2 пассаж</b>							
B5+ИМК (0,25мг/л)+БАП (0,1мг/л)	5	8	3	0	0	2-3	0
B5+ИМК (0,25мг/л)+Кин (0,1мг/л)	6	6	3	1	0	1-2	0
<b>1пассаж <i>H. sultanovae</i> Lazkov- Коп. Султановой</b>							
MS 1/2+ИМК (0,5мг/л)	7	10	4	0	2	1-2	0
St +ИМК (0,5мг/л)	10	2	3	2	5	1-2	3
B5+ИМК (0,25мг/л)	4	7	4	0	0	1-2	4
<b>2 пассаж</b>							
B5+ИМК (0,25мг/л)+БАП (0,1мг/л)	3	13	3	0	0	2-3	0
B5+ИМК (0,25мг/л)+Кин (0,1мг/л)	4	7	4	0	1	1-2	0
<b>1пассаж <i>H. plumosum</i> Boiss. et. Hausskn.- Коп. оперенный (шр.)</b>							
MS 1/2+ИМК (0,5мг/л)	7	7	4	1	2	1-2	0
St +ИМК (0,5мг/л)	8	9	3	0	0	1-2	0
B5+ИМК (0,25мг/л)	6	15	5	1	0	2-3	5
<b>2пассаж</b>							
B5+ИМК (0,25мг/л)+БАП (0,1мг/л)	4	8	4	0	0	1-2	0
B5+ИМК (0,25мг/л)+Кин (0,1мг/л)	4	5	3	1	1	1-2	0

*H.montanum* на Стрита +ИМК (0,5мг/л) растет средне, таких заметных подсыханий, как у других видов, нет. Корни образовали из 8 посаженных 5 довольно хор., у трех только образуют (на второй неделе дал корни). Стебли тонкие тянущиеся кверху, междоузлий образовал 1-2. На среде MS 1/2+ИМК (0.5мг/л) образование корней наблюдается на 20-е сутки. На среде B5 с добавлением БАПа и Кинетина корней не образовало, только каллус, но побеги растут лучше и образуют 2-3 междоузлия. Их можно использовать для микроразмножения. С добавлением ИМК (0,25мг/л) на среде B5 побеги более плотные, цвет более насыщенный и наблюдается образование хорошо развитых корней.

*H.sultanovae* на Стрита +ИМК (0,5мг/л) растет плохо, стебли тонкие, образовало только 1-2 междоузлий, корни темного цвета, из 10 посаженных, только 3 побега образовало корни, верхняя часть подсыхает, на второй неделе дал корни. На среде MS 1/2+ИМК (0.5мг/л) корней не дал. На среде B5 с добавлением БАПа побеги растут лучше и образуют больше междоузлий чем с Кинетином. На B5 с добавлением ИМК (0,25мг/л) растение образовало плотные хорошо растущие побеги и мощные корни.

*H.plumosum* на Стрита +ИМК (0,5мг/л) растет плохо, наблюдается появление зачатков корней (очень медл.) которые далее в рост не пошли, подсыхают верхушки, (раст. обр. красноватый оттенок). На среде MS 1/2+ИМК (0.5мг/л) тоже не дал корней. На среде B5 с добавлением БАПа и Кинетина корней не образовало, только каллус, но побеги растут лучше и образуют 1-2 междоузлия, побеги поплотнее и цвет не белесый, а с добавлением ИМК (0,25мг/л) образовали хорошо развитые корни.

В предыдущих работах [7] был проведен опыт с вариацией сред в различных концентрациях вида *H.chaitocarpum*, где лучшей средой для микроразмножения оказалась среда с добавлением 0,1мг/л БАП. На данной среде у каждого листа образуются хорошие боковые побеги, образуют хорошие междоузлия и легко черенкуются.

В результате наших и предыдущих опытов, можно отметить, что с добавлением гормона БАП мы получили оптимальный рост побегов, с образованием оптимального количества пазушных почек и междоузлий у видов копеечников *H.montanum*, *H.plumosum*, *H.sultanovae*. Для укоренения и для поддержания коллекции растений можно использовать среду В5 с добавлением ИМК 0,25 мг/л.

Таким образом, нами были введены в культуру *in vitro* 9 видов копеечника. Подобраны условия для проращивания семян. Подобран способ микроразмножения - микрочеренкование. Подобраны оптимальные питательные среды для микроразмножения - В5+ИМК (0,25мг/л)+БАП (0,1мг/л) и укоренения - В5+ИМК (0,25мг/л).

Результаты могут быть использованы для последующих исследований копеечников. Микрочеренкование позволит получить большое количество растений для поддержания коллекции растений.

#### Литература

1. Пеккер, Е.Т. К биохимической характеристике растений рода *Hedysarum* L. Юго-Восточного Алтая [Текст] / Е.Т. Пеккер // Актуальные вопросы ботанического ресурсоведения в Сибири. Новосибирск, 1976. - С.146-149.
2. Chen, S.G. Prenylisoflavone derivatives from the roots of *Hedysarum scoparium* [Text] / S.G. Chen, J.J. Chen, K. Gao // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)– 2007.– V.55.– N 8. – P. 1181-1184.
3. Yang M. Characterization of phenolic compounds in the crude extract of *Hedysarum multijugum* by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. [Text]/ M. Yang , W. Wang, J. Sun , Y. Zhao , Y. Liu , H. Liang, D.A. Guo // Rapid Commun Mass Spectrom.– 2007.– V.21(23). – P. 33-41.
4. 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.
5. Street, H.E. Growing roots without plants [Text] / H.E Street // Discovery. – 1954. – V. 15. – P. 286-292.
6. Ракова, М.В. Особенности покоя семян дикорастущих бобовых [Текст] / М.В. Ракова // Биологические основы семеноведения и семеноводства интродуцентов. - Новосибирск, 1974. - С. 228-229.
7. Умралина А.Р. Теоретические аспекты сохранения и практическое использование эндемиков и редких видов растений Кыргызстана / А.Р. Умралина // дисс...д-ра. биол. наук.-Бишкек-2013.

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