

Умралина А.Р.

ПОЛУЧЕНИЕ "ИСКУССТВЕННЫХ СЕМЯН" ЭНДЕМИКОВ И РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ КЫРГЫЗСТАНА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ

A.R. Umralina

PRODUCING OF "ARTIFICIAL SEEDS" FOR ENDEMIC AND RARE PLANT SPECIES IN KYRGYZSTAN AND FOR USE IN SCIENTIFIC AND PRACTICAL PURPOSES

УДК 631.522.23(04)

Были введены в культуру и подобраны оптимальные условия для микроразмножения 17 видов эндемиков Кыргызстана. Разработаны протоколы получения искусственных семян. Определены условия стандартизации микрочеренков, используемых для инкапсуляции. Показана важность этапа закаливания растений перед получением искусственных семян.

Ключевые слова: эндемики, сохранение *ex situ*, культуры *in vitro*, микроразмножение, меристемы, искусственные семена.

Were introduced into the culture and optimized conditions for micropropagation of 17 endemic species in Kyrgyzstan. Were developed protocols to get artificial seeds. The condition was determined for standardization of micro cutting for encapsulation usage. The importance of the stage to train plants before obtaining artificial seeds was shown.

Key words: endemic species, *ex situ* conservation, culture *in vitro* micropropagation, meristem, artificial seeds.

Технология получения "искусственных семян" заключается в получении инкапсулированных апикальных и пазушных меристем с целью длительного сохранения в условиях криоконсервации. Такая технология способствует сохранению генетических признаков растений, а полимерная капсула позволяет защитить семена от воздействия внешней среды. Особенно важна эта разработка для эндемиков, редких и исчезающих видов растений с целью их сохранения *in vitro*, а также для реинтродукции в естественные условия местообитания. Семенной банк дикорастущей флоры Кыргызстана функционирует в Институте биотехнологии НАН КР с 2005 года. За эти годы собраны семена 208 эндемиков и редких видов растений. Часто количество собранных семян для некоторых видов бывает крайне ограничено, а всхожесть семян многих видов низкая из-за поражения болезнями. В такой ситуации использование методов размножения *in vitro* используется для наработки больших партий посадочных единиц для восстановления ареалов редких растений. Другое преимущество этого метода состоит в освобождении растительного материала от вирусных, бактериальных и грибных инфекций. В последнее время интенсивно развиваются технологии получения "искусственных семян" из размножаемых *in vitro* растений. Они рассматриваются как эффективный альтернативный метод размножения редких и некоторых коммерчески важных видов. "Искусственные семе-

на" могут также служить способом средне и долго-временного хранения генетического материала растений, а также удобной формой обмена стерильным материалом между лабораториями.

Материалы и методы

Объектами исследований служили эндемики и редкие виды растений, семена которых были собраны д.б.н. Лазьковым Г.А. в экспедициях 2005-2009 годов, и хранящихся в криобанке Института биотехнологии НАН КР.

В ходе работы были использованы следующие методы:

- стерилизация семян проводилась по общепринятым методикам [1,2];
- подбор оптимальных режимов проращивания семян [3,4,5];
- определение всхожести [6,7];
- подбор и оптимизация сред для микроразмножения. Основой всех сред для микроразмножения была агаризованная среда MS B-5 и Стрита с добавлением фитогормонов и гормоноподобных синтетических регуляторов роста в различных концентрациях и сочетаниях [8,9];
- подбор и оптимизация сред для укоренения полученных побегов [8,9];
- получение искусственных семян из апикальных и латеральных меристем методом инкапсулирования в альгинатный гель [10,11,12].

Проращивание семян и введение растений в стерильную культуру

Для введения растений в культуру *in vitro* и одно-временного определения всхожести семян их стерилизовали и высаживали для проращивания в чашки Петри с агаризованной средой Мурасиге и Скуга без гормонов. Стерилизацию семян проводили по общепринятым методикам [1] несколькими способами, в зависимости от морфологии семян. Мелкие семена с тонкой кожурой выдерживали 30-40 секунд в 96 этиловом спирте, 5 минут в 5% растворе гипохлорита натрия, после каждого этапа - несколько раз отмывали стерильной дистиллированной водой. Толсто-стенные семена стерилизовали концентрированной серной кислотой от 5 до 60 минут в различных вариантах. При такой стерилизации мы одновременно проводили и скарификацию толсто-стенных семян. Семена, требующие холодной стратификации, помещали в холодильник при 4-5С. Остальные семена проращивали при температуре 18 -22С°. Если при таком режиме проращивания семена не проросли,

то их подвергали холодной стратификации при температуре 4 -5С° с последующим проращиванием при 18-22С°. Для некоторых видов пришлось применять режим с неоднократной сменой температур.

Проводился подбор сред для успешного микро-размножения, при котором сохранялась бы идентичность наследственного материала с исходными растениями. Активация роста пазушных меристем при размножении микрочеренкованием или образование адвентивных побегов непосредственно из специализированных тканей экспланта, без образования каллуса, позволяют выполнить это условие [7].

Основой всех испытываемых сред были агаризованные среды Мурасиге и Скуга (MS), Стрита (S) и В-5, 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-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 типа: а - нафтилуксусную кислоту (НУК), г- индолилмасляную кислоту (ИМК), 2,4- дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4- Д), - индолилуксусную кислоту (ИУК).

Получение искусственных семян. Растения разрезали на микрочеренки размером 1,5-2 мм, на которых

были расположены по 1 или 2 апикальные или латеральные меристемы. Микрочеренки суспендировали в небольшом количестве 3%-ного раствора альгината натрия на среде MS или В-5 без гормонов или с добавлением 1мг/л ИМК. Затем эту суспензию стерильной пипеткой капали в 100мМ раствор хлористого кальция на среде MS для затвердевания геля и образования бусинок. Бусинки отмывали от хлористого кальция в жидкой среде MS и помещали в стерильную чашку Петри без среды. Часть искусственных семян сразу же подвергали проращиванию (контроль). Остальные хранили при 4°С, после одного и двух месяцев хранения шарики высаживали на среду для регенерации растений [12].

Результаты и их обсуждение

Для проведения работ по получению искусственных семян нами были введены в стерильную культуру 17 видов растений. Экспланты каждого вида высаживались на 6 сред, подобранных нами в предыдущих исследованиях для размножения растений. В следующих пассажах мы сравнивали между собой лучшие из вариантов первого опыта и уточняли состав среды. Для всех 17 видов были получены стабильно растущие, хорошо размножаемые и укореняющиеся культуры.

Все виды растений образовывали длинные междоузлия и размножались микрочеренкованием кроме *Silene viscosa*, для которого был подобран свой метод микроразмножения. Результаты подбора сред для микроразмножения приведены в табл.1.

Таблица 1.

Способы и оптимальные среды для микроразмножения эндемиков и редких видов растений

Вид	Способ микроразмножения	Оптимальная среда для микроразмножения	Среда для укоренения
<i>Allochrysa gypsophiloideis</i> (Rege I) Schischk.	микрочеренкование	MS+0,2мг/л ГК+1мг/л ИУК	MS+ 1мг/л ИУК
<i>Allochrysa parviclata</i> (Rege I) Ovcz. Et. Czuk.	микрочеренкование	MS + 0,1мг/л БАП+0,2 мг/л ГК	MS + 1мг/л ИУК
<i>Elisanthe fechtchenkavium</i> (Preobr.) Schischk.	микрочеренкование	MS + 0,1мг/л БАП+0,2 мг/л ГК	MS+ 1мг/л ИУК
<i>Silene fetisovii</i> Lazkov	микрочеренкование	MS +1мг/л ИУК	MS + 1мг/л ИУК
<i>Silene obovata</i> Schischk.	микрочеренкование	MS+Без гормонов или с добавлением 1мг/л ИУК	MS+Без гормонов или с добавлением 1мг/л ИУК
<i>Silene lachygrinae</i> Lazkov	микрочеренкование	MS +1мг/л ИУК	MS +1мг/л ИМК
<i>Silene schischkavii</i> (M.Pop.) Vved.	микрочеренкование	MS+0,1мг/л БАП+0,2 мг/л ГК	MS+ 1мг/л ИУК
<i>Silene sussumyrica</i> Lazkov	микрочеренкование	MS +1мг/л ИУК	MS + 1мг/л ИМК
<i>Silene viscosa</i>	междоузлий почти нет, растения с удаленной верхушечной почкой целиком сажали на питательную среду для пробуждения боковых почек	MS+0,1мг/л Кин.+0,2 мг/л ГК	MS+0,1мг/л Кин.+0,2 мг/л ГК; MS + 1мг/л ИУК

<i>Nepeta pseudococanica</i> Pojark.	микрочеренкование	St +1мг/л ИМК	St +1мг/л ИМК
<i>Salvia schmalhauseni</i> Regel	микрочеренкование	B-5+0,1мг/л БАП+0,2 мг/л ГК	MS+1мг/л ИУК
<i>Scutellaria andrachnoides</i> Vved	микрочеренкование	B-5+1мг/л ИМК	St +1мг/л ИМК
<i>Scutellaria lanipes</i> Juz.	микрочеренкование	B-5+1мг/л ИМК	St +1мг/л ИМК
<i>Colutea brachyptera</i> Sumn.	микрочеренкование	MS+1мг/л ИУК	MS+1мг/л ИУК
<i>Hedysarum enaffae</i> B. Sultanova	микрочеренкование	MS+0,1мг/л БАП+0,2 мг/л ГК	B-5+1мг/л ИМК
<i>Tanacetopsis setacea</i> (Regel et Schmalh.).	микрочеренкование	MS +1мг/л ИМК	St +1мг/л ИМК
<i>Trichanthesis paradoxos</i> (C. Winkl.) Tzvel.	микрочеренкование	MS +1мг/л ИУК	St +1мг/л ИМК

Следующим этапом работы было получение собственно искусственных семян. Выделяли черенки 4-5 мм длиной, на которых присутствовало по 2 супротивных меристемы. Апикальные меристемы в опыт не брали, так как они отрастают намного быстрее латеральных, что затрудняет подведение результатов. Не смотря на это у 1/3 искусственных семян, как в контроле, так и после хранения меристемы начинали давать побеги значительно позже. В результате мы пришли к выводу, что следует стандартизировать микрочеренки, выделяемые для инкапсуляции, по положению на растении и не использовать нижние черенки.

Все виды растений отлично росли на среде Гамборга В-5 с добавлением 1мг/л ИМК, поэтому мы начали получение искусственных семян, заключая меристемы в альгинат приготовленный на этой среде. С большинством видов были получены положительные результаты, но черенки шлемников практически полностью превращались в каллус, но не погибали. Для таких видов требуется индивидуальный подбор сред, поскольку состав среды, в которой хранятся меристемы, имеет большое значение для сохранения жизнеспособности искусственных семян. Оптимальной средой для выживания меристем была среда Гамборга В-5. Добавление гормона ИМК, необходимого для развития растений значительно снижало выход нормальных побегов, увеличивая каллусообразование, особенно после длительного хранения. Поэтому в дальнейших опытах со всеми видами мы исключили добавление гормонов в альгинатный гель, в котором хранятся черенки, но после хранения семена высаживались на среду, содержащую нормальную концентрацию ИМК. Некоторые исследователи наоборот применяют предварительную обработку черенков гормонами для инициации корнеоб-

разования перед заключением в гель, не содержащий гормонов.

Жизнеспособность полученных семян проверялась сразу же после инкапсулирования и через определенные промежутки времени после хранения при + 4°C для определения максимального срока сохранности искусственных семян (рис.1).



Рис.1. Восстановление и последующая регенерация растений из "искусственных семян" эндемика *Nepeta pseudococanica*

В литературе описываются протоколы получения искусственных семян из стерильных проростков и эмбрионов как без предварительной подготовки, так и с использованием холодового закаливания в течение 2-4 недель. Мы испытали оба эти варианта для всех видов растений. Результаты этих опытов подчеркивают важность этапа закаливания растений перед получением искусственных семян. Особенно

это видно на примере краснокнижного вида *Scutellaria andrachnoides* Vved, искусственные семена которого полностью теряли всхожесть в течение месяца. Тогда как после закаливания их жизнеспособность оставалась практически на уровне исходной даже после 2 месяцев хранения. Результаты определения жизнеспособности искусственных семян приведены в табл. 2.

Таблица 2.

Влияние холодной заделки на получение жизнеспособных искусственных семян

Вид	Без холодной заделки			После холодной заделки		
	Срок хранения	Посажено семян	Кол-во побегов	Срок хранения	Посажено семян	Кол-во побегов
1	2	3	4	5	6	7
<i>Silene sussamyrica</i>	Контроль	40	24	Контроль	40	32
	1 месяц	40	24	1 месяц	40	32
	2 месяца	40	22	2 месяца	40	28
	3 месяца	-	-	3 месяца	40	25
	5 месяцев	-	-	5 месяцев	40	20
<i>Silene fetissovii</i>	контроль	40	25	контроль	40	34
	1 месяц	40	26	1 месяц	40	33
	2 месяца	40	23	2 месяца	40	27
	3 месяца	-	-	3 месяца	40	24
	5 месяцев	-	-	5 месяцев	40	18
<i>Allochrysa paniculata</i>	контроль	20	8	контроль	20	11
	1 месяц	20	6	1 месяц	20	8
<i>Nepeta pseudococanica</i>	контроль	40	28	контроль	40	40
	1 месяц	40	26	1 месяц	40	36
	2 месяца	40	22	2 месяца	40	30
	3 месяца	-	-	3 месяца	40	10
	5 месяцев	-	-	5 месяцев	40	0
<i>Salvia schmalhauseni</i>	контроль	40	18	контроль	40	32
	1 месяц	40	12	1 месяц	40	21
	2 месяца	40	2	2 месяца	40	18
	3 месяца	-	-	3 месяца	40	11
	5 месяцев	-	-	5 месяцев	40	8
<i>Scutellaria andrachnoides</i>	контроль	40	10	контроль	40	40
	1 месяц	40	0	1 месяц	40	38
	2 месяца	40	0	2 месяца	40	35
	3 месяца	-	-	3 месяца	40	36
	5 месяцев	-	-	5 месяцев	40	33
<i>Scutellaria lanipes</i>	контроль	40	4	контроль	40	21
	1 месяц	40	0	1 месяц	40	20
	2 месяца	40	0	2 месяца	40	16
	3 месяца	-	-	3 месяца	40	12
	5 месяцев	-	-	5 месяцев	40	9

Таким образом, в результате исследований нами были подобраны оптимальные среды для микроразмножения и укоренения для всех 17 испытуемых видов эндемиков и редких видов растений. Разработаны протоколы получения искусственных семян. Выявлена необходимость стандартизировать микрочеренки, выделяемые для инкапсуляции, по положению на растении и не использовать нижние черенки. Оптимальной средой для выживания меристем большинства видов была среда Гамборга В-5. Для некоторых из них, таких как шлемники, в случае, если эта среда не подходит, следует оптимизировать условия индивидуально. Экспериментально показана

важность этапа закаливания растений перед получением искусственных семян.

Метод получения искусственных семян используется в научных целях, одной из которых является сохранение исчезающих растений. Эндемики и редкие виды могут быть реинтродуцированы в естественные природные условия с помощью "искусственных" семян. Кроме того, возможны новые формы использования "искусственных семян" хозяйственно ценных видов растений, например, растений - гипераккумуляторов металлов для фиторемедиации загрязненных почв и т.д.

Литература:

1. Калинин, Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений [Текст]: / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. - Киев: "Наукова думка", 1980. - 486 с.
2. 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, Melburne, Australia. - P. 15.
3. Николаева, М.Г. Долговременное хранение семян дикорастущих видов растений. Биологические свойства семян [Текст]/ М.Г. Николаева, В.Л. Тихонова, Т.В. Далецкая. - Консервация генетических ресурсов. Информ. материал. Пушино: Пушинский НЦ РАН, 1992. - 36 с.
4. Воронкова, Н.М. Прорастание семян некоторых редких и исчезающих видов Приморского края [Текст] / Н.М. Воронкова, С.В. Нестерова, Ю.Н. Журавлев // Растительные ресурсы. - 1996. - Т. 32, вып. 3. - С. 51-60.
5. Adkins, S.W. Seed dormancy mechanisms in warm season grass species [Text] / S.W. Adkins, S.M. Bellairs, D.S. Loch //Euphytica. - 2002. - V. 125. - P. 13-20.
6. Baskin, J.M. 2003. Classification, biogeography and Phylogenetic relationships of seed dormancy [Text] / J.M. Baskin, Baskin C.C. // In Smits R.D., Dickie J.B., Linington S.H., Pritchard H.W.
7. Катаева Н.В. Клональное микроразмножение растений [Текст]: / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. - М.: Наука, 1983. - 96 с.
8. Uddin, S. M. Regeneraition of multiple shoots from different explants viz. shoot tip, nodal segment and cotyledonary node of in vitro grown seedlings of *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Backer ex K. Heyne [Text] / S.M.Uddin, K. Nasirujjaman, S. Zaman, M.A. Reza // Biotechnology. - 2005. - V. 4(1). - P. 35-38.
9. Luo, J. Abscisic Acid-Responsive Protein, Bovine Serum Albumin, and Proline Pretreatments Improve Recovery of in Vitro Currant Shoot-Tip Meristems and Callus Cryopreserved by Vitrification. [Text] / J. Luo, B. M. Reed // Cryobiology. - 1997. - V. 34. - P. 240-250.
10. Zhao, Y. Cryopreservation of apple shoot tips by encapsulation-dehydration: effect of preculture, dehydration and freezing procedure on shoot regeneration. [Text]/ Y. Zhao, Y. Wu, F. Engelmann, M. Zhou, D. Zhang, S. Chen //Cryo-Letters. - 1999. - V. 20. - P. 103-108.
11. Hirai, D. Cryopreservation of in vitro-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Menta spicata* L.) by encapsulation vitrification. [Text] / D. Hirai, A. Sakai //Plant Cell Rep. - 1999. - V. 19. - P. 150-155.
12. Adriani, M. Effect of different treatments on the conversion of 'Hayward' kiwifruit synthetic seeds to whole plants following encapsulation of in vitro-derived buds [Text] / M. Adriani, E. Piccioni, A. Standardi // New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. - 2005. - Vol. 28. -P. 59-67.

Рецензент: д.б.н. Быковченко Ю.Г.