

Особенности развития *Astragalus uliginosus* при культивировании *in vitro*

© А.С. Пьянова¹, Ю.Н. Зинченко¹, К.С. Бердасова¹, З.В. Тещина²

¹ Ботанический сад-институт ДВО РАН, Владивосток, Россия

² Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия
e-mail: pianova@botsad.ru

В статье приведены морфологические признаки семян *Astragalus uliginosus* L., представлены результаты введения в культуру *in vitro*, особенности прорастания и роста исследуемого вида на ранних стадиях онтогенеза. Показаны эффективная стратификация концентрированной серной кислотой и двухступенчатая стерилизация с применением нитрата серебра. Средняя всхожесть зрелых семян равна 44,4 %. Экспериментально установлено, что почки возобновления множественно закладываются в базальной части побега и в дальнейшем дают монокарпические побеги, которые легко отделяются и укореняются на питательной среде без регуляторов роста.

Ключевые слова: астрагал, микроклональное размножение, особенности прорастания, семена, семенное воспроизведение .

Astragalus uliginosus L. (астрагал болотный) — травянистое многолетнее растение семейства Fabaceae (Бобовые). Стебли 30–80 (100) см длиной, прямостоячие, обычно несколько, довольно редко покрыты короткими белыми или в узлах большей частью смешанными черными и белыми волосками. Листья 10–20 см длиной, черешок 1–4 см длиной. Вид распространён в Сибири и на Дальнем Востоке, вне РФ в Казахстане, Монголии, северном Китае и на Корейском полуострове (Kotsupii, Vysochina, 2016). Сейчас *A. uliginosus* представляет интерес для фармацевтической отрасли (Lysiuk, Darmohray, 2016) за счёт перспективы использования содержащихся в надземной части растения биологически активных веществ: флавоноидов и кумаринов (Kotsupii, Vysochina, 2016). Также давно известно применение экстрактов данного вида для лечения сердечно-сосудистых заболеваний (Ionkova, 1995). Вид имеет хозяйственное значение — используется в качестве корма для скота, благодаря содержанию протеина и клетчатки в сухом веществе 26,6 % и 23,2 % соответственно (Lagin, 1951). Вид используется в селекции для получения улучшенных кормовых свойств и испытан в резко континентальном климате Забайкальского края (Andreyeva, Sidorova, 2015; Makarov, 2017). Однако такие факторы как прокладка коммуникаций и разработка карьеров,

пожары, перевыпас скота и сенокосение оказывают влияние на сокращение численности астрагала болотного. К тому же *A. uliginosus* не образует больших зарослей, что затрудняет его использование в качестве сырья.

Материалы и методы

Материалом для работы послужили зрелые семена *A. uliginosus* (156 шт.), собранные в естественных условиях произрастания, на песчаных берегах озера Ханка (Ханкайский район, Приморский край) осенью 2023 года (получены по Index seminum — VLA). Эксперимент по проращиванию проводили в трёх повторностях (по 30 семян в каждой). Морфологические признаки и качество семян оценивали при помощи стереомикроскопа Stemi DV4 (Carl Zeiss, Германия). Опираясь на ранее полученные результаты при скарификации семян с твёрдой оболочкой (Berdasova et al., 2023; Lonchakova et al., 2023; Tkhai et al., 2023), семена скарифицировали 20 минут концентрированной серной кислотой. Затем, после промывки дистиллированной водой, стерилизовали 1 % раствором нитрата серебра в течение 15 минут с последующей промывкой 1 % раствором хлорида натрия. Далее семена промывали 3 раза стерильной дистиллированной водой и высаживали на питательную среду по прописи Мурасиге и Скуга (Му-



Рисунок 1. Микроскопическое исследование семян *Astragalus uliginosus* L. (масштабная линейка равна 1 мм): А — повреждённые, В — пригодные к работе.

Figure 1. Microscopic observation of *Astragalus uliginosus* L. seeds (scale bar = 1 mm): A — damaged seeds, B — seeds suitable for use.

rashige, Skoog, 1962). Культивирование проводили при освещении 3000 люкс и световом режиме 16/8 часов свет/темнота с постоянным поддержанием температуры 23 ± 2 °С. Семя считали проросшим, если длина корешка превышала ширину семени в 2 раза (Firsova, 1969).

Результаты и обсуждение

Оценка семян с помощью стереомикроскопа показала, что 66 из 156 семян (42,3%) были сильно повреждены вредителями и болезнями (Рис. 1 А). Семена мелкие, 1–1.8 мм, по форме почковидные, реже почковидно-продолговатые, окраска варьирует от жёлто-зелёного до коричневатого. Поверхность гладкая, матовая. Дорсальный шов изогнутый, семенной рубчик находится в выемке (Рис. 1 В).

Для проращивания *in vitro* все пригодные для работы семена случайным образом были поделены на три части (повторности) по 30 семян каждая.

Результаты настоящего исследования показывают, что скарифицированные семена набухают через сутки, а первые проростки появляются на 4 сутки. Образование первых семядольных листьев происходит на 6 сутки культивирования, а первых ювенильных — на 11 сутки. К 20-м суткам 1/3 часть от общего числа сеянцев имеет сформированный сложный лист (Табл.).

Проростки *A. uliginosus* мелкие, до 1 см. Прорастание начинается с появления корешка, далее за счёт удлинения гипокотилия происходит выталкивание зародыша из семенной оболочки с уже развивающимися семядольными листьями

Таблица. Лабораторная всхожесть семян *Astragalus uliginosus* L.

Table. The laboratory seed germination of *Astragalus uliginosus* L.

	Всхожесть на 20 сутки, % Germination on the 20th day, %	Сеянцы с ювенильными листьями на 20 сутки, % Seedlings with juvenile leaves on the 20th days, %
Повторность I 1st repeated of experiments	50	33,3
Повторность II 2nd repeated of experiments	46,6	43,3
Повторность III 3rd repeated of experiments	36,6	30
Средняя Average	44,4	35,5

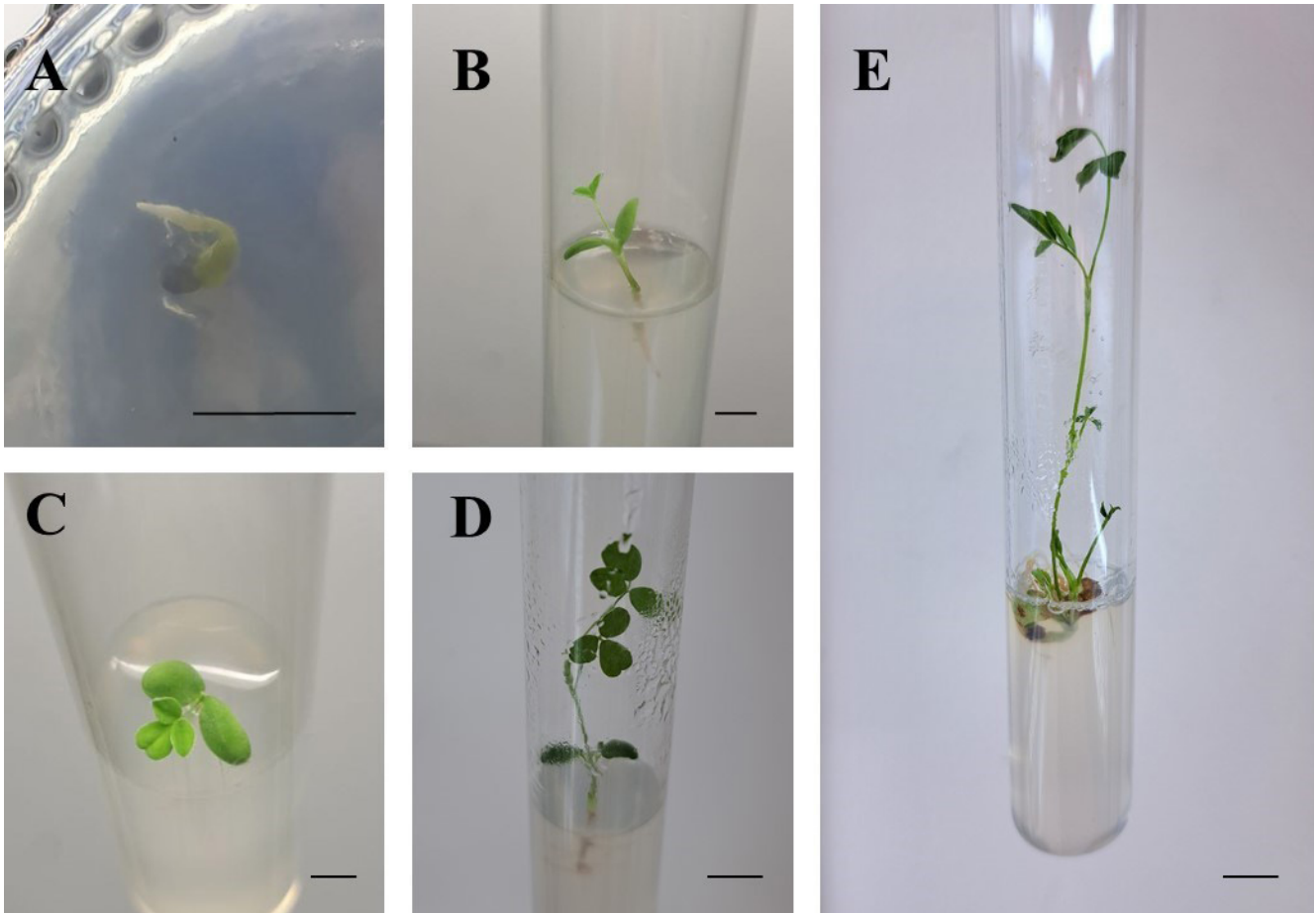


Рисунок 2. Стадии развития *Astragalus uliginosus* L. *in vitro*: А — проросток, В — сеянец с семядольными листьями и развивающимся ювенильным, С — сеянец с первым ювенильным листом, D — сеянец с двумя ювенильными листьями и развивающейся корневой системой, E — сеянец со сложными листьями. Масштабная линейка равна 1 см.

Figure 2. Development stages of *Astragalus uliginosus* L. into *in vitro* culture: A — sprout, B — seedling with cotyledonous and developing juvenile leaves, C — seedling with the first juvenile leaf, D — seedling with two juvenile leaves and a developing root system, E — seedling with compound leaves. Scale bar = 1 cm.

(Рис. 2 А). При удлинении главного корня начинает развиваться первый ювенильный лист (Рис. 2 В, С). Одновременно с развитием боковых корешков у сеянцев развивается второй ювенильный лист (Рис. 2 D). Первые ювенильные листья тройчатосложные, располагаются очередно. Образование придаточных корней сопровождается развитием сложных листьев, которые состоят из 5–7 продолговато-эллиптических листочков. Это отличается от нормального развития в нативных условиях, где образуется 10–12 пар листочков, и может объясняться ограниченным пространством культурального сосуда, а также отличиями минерального состава в питательной среде от состава почв в естественных условиях произрастания. Возможно, на морфогенез также влияет отсутствие таких факторов, как ветер, колебания влажности и освещённости, отсутствие микроорганизмов, которые в нативных условиях способствуют росту растений.

П.В. Кузина отмечает, что в условиях культуры открытого грунта *A. uliginosus* на третий год изреживается и выпадает (Kuzina, 1970). Что послужило основанием поместить часть сеянцев из каждой повторности на среду с регулятором роста 6-бензиламинопурином (6-БАП) для изучения возможности массового размножения вида. Положительный результат множественной индукции побегов был показан ранее для *Astragalus cariensis*, однако посредством индукции побегов из каллусной ткани (Erisen et al., 2011). Нами экспериментально установлено, что на питательной среде МС с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП почки возобновления множественно закладываются в базальной части побега и в дальнейшем дают монокарпические побеги, которые легко отделяются и укореняются на питательной среде без регуляторов роста. Что подтверждает возможность не только прямого органогенеза, но и массового получения растительного материала.

Заключение

Таким образом, отмечены основные этапы онтогенетического развития в условиях *in vitro* и показана возможность получения жизнеспособных асептических проростков астрагала болотного. Повышение эффективности размножения достигается путём культивирования на питательной среде, дополненной 6-бензиламинопурином. Индукция ризогенеза возможна на питательной среде без применения регуляторов роста.

Благодарности

Исследование проведено на базе уникальной научной установки «Коллекция живых растений *in vitro* Ботанического сада-института ДВО РАН» по теме государственного задания «Введение в культуру, изучение и сохранение генетических ресурсов хозяйственно ценных растений Восточной Азии». Регистрационный номер: 122040800086-1.

Список литературы

- [Andreyeva, Sidorova] Андреева О.Т., Сидорова Л.П. 2015. Астрагал болотный — ценная бобовая культура в Забайкальском крае. Вестник АПК Ставрополя. № 4(20). С. 205–208. EDN VHWQAD.
- Berdasova K.S., Pianova A.S., Kameneva L.A. 2023. The effect of abiotic factors on *in vitro* seed germination in *Oxytropis chankaensis* Jurtz., a rare endemic species of the Russian Far East. *Botanica Pacifica. A journal of plant science and conservation*. 12(2): 168–171. DOI: 0.17581/bp.2023.12206
- Erisen S., Atalay E., Yorgancilar M. 2011. The effect of thidiazuron on the *in vitro* shoot development of endemic *Astragalus cariensis* in Turkey. *Turk. J. Bot.* 35(5): 521–526. DOI: 10.3906/bot-1009-74
- [Firsova] Фирсова М.К. 1969. Семенной контроль. М. 295 с.
- Ionkova I. 1995. *Astragalus* Species (Milk Vetch): *In Vitro* Culture and the Production of Saponins, Astragaline, and Other Biologically Active Compounds. In: Bajaj, Y.P.S. (eds) *Medicinal and Aromatic Plants VIII. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 33. Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-08612-4_6
- [Kotsupii, Vysochina] Коцупий О.В., Высочина Г.И. 2016. Состав и содержание флавоноидов видов растений из секций *Eudmus* Bunge и *Melilotopsis* Gontsch. рода *Astragalus* L. Сибири. Ученые записки ЗабГУ. Серия: Биологические науки. Т. 11. № 1. С. 104–111.
- [Kuzina] Кузина П.В. 1970. Дикорастущие бобовые Приморья и их кормовое значение. В кн.: Флора и растительность Дальнего Востока. Выпуск I. Владивосток. 95 с.
- [Larin] Ларин И.В. (ред.). 1951. Кормовые растения сенокосов и пастбищ СССР. Т. 2. М., Ленинград. 947 с.
- [Lonchakova] Лончакова Т.Е., Пьянова А.С., Бердасова К.С. 2023. Введение в культуру *in vitro* *Lespedeza davurica* (Fabaceae). Растительные ресурсы. Т. 59. № 3. С. 257–261. DOI: 10.31857/S003399462303010X
- Lysiuk R., Darmohray R. 2016. Pharmacology and Ethnomedicine of the Genus *Astragalus*. *International Journal of Pharmacology Phytochemistry and Ethnomedicine*. 3: 46–53.
- [Makarov] Макаров В.П. 2017. Результаты изучения коллекции видов астрагала в Забайкальском крае. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. Т. 178. № 2. С. 5–15.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:13. 473–497.
- [Tkhai] Тхай Х.Н., Нестерова С.В., Горобец К.В., Царенко Н.А. 2023. Всхожесть и динамика прорастания семян *Astragalus uliginosus* L. и *Lespedeza cytobotrya* Miq. (сем. Fabaceae Lindl.) разных сроков хранения. Материалы региональной научно-практической конференции по естественным наукам для студентов, аспирантов и молодых учёных. Владивосток. С. 18–21.

The features of *Astragalus uliginosus* development during *in vitro* cultivation

© A.S. Pianova¹, Yu.N. Zinchenko¹, K.S. Berdasova¹, Z.V. Teshchina²

¹ Botanical Garden-Institute of the FEB RAS, Vladivostok

² Far Eastern Federal University, Vladivostok

e-mail: pianova@botsad.ru

The paper presents the morphological features of *Astragalus uliginosus* L. seeds, the results of *in vitro* culture introduction, and the features of germination and growth of the studied species. Stratification with concentrated sulfuric acid and two-stage sterilization using silver nitrate was discovered to be effective. The average germination rate is 44.4 %. It has been experimentally established that renewal buds are extensively laid in the basal part of the shoot and subsequently produce monocarpic shoots that easily detach and take root in a nutrient medium without growth regulators.

Keywords: *Astragalus*, germination characteristics, micropropagation, seeds, seed reproduction.

References

- Andreyeva O.T., Sidorova L.P. 2015. Astragal bolotnyi — tsennaya bobovaya kultura v Zabaikalskom krae [*Astragalus uliginosus*, a valuable legume crop in Zabaykalsky Krai]. Vestnik APK Stavropolya [Agricultural Bulletin of Stavropol Region]. № 4(20). С. 205–208. (In Russ.) EDN VHWQAD.
- Berdasova K.S., Pianova A.S., Kameneva L.A. 2023. The effect of abiotic factors on *in vitro* seed germination in *Oxytropis chankaensis* Jurtz., a rare endemic species of the Russian Far East. *Botanica Pacifica. A journal of plant science and conservation*. 12(2): 168–171. DOI: 0.17581/bp.2023.12206
- Erisen S., Atalay E., Yorgancilar M. 2011. The effect of thidiazuron on the *in vitro* shoot development of endemic *Astragalus cariensis* in Turkey. *Turk. J. Bot.* 35(5): 521–526. DOI: 10.3906/bot-1009-74
- Firsova M.K. 1969. *Semennoi control* [Seed control]. Moscow. 295 p. (In Russ.)
- Ionkova I. 1995. *Astragalus* Species (Milk Vetch): *In Vitro* Culture and the Production of Saponins, Astragaline, and Other Biologically Active Compounds. In: Bajaj, Y.P.S. (eds) *Medicinal and Aromatic Plants VIII. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 33. Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-08612-4_6
- Kotsupii O.V., Vysochina G.I. 2016. Sostav i sodержaniye flavonoidov vidov rastenii iz seksii *Eudmus* Bunge i *Melilotopsis* Gontsch. Roda *Astragalus* L. Sibiri [Composition and content of flavonoids in plant species from the *Eudmus* Bunge and *Melilotopsis* Gontsch. sections of the genus *Astragalus* L. in Siberia.]. *Uchenyye zapiski ZabGU. Seriya: Biologicheskkiye nauki* [Scholarly Notes of Transbaikalian State University. Series: Biological sciences]. Vol. 11. № 1. 104–111 pp. (In Russ.)
- Kuzina P.V. 1970. Dikorastushchiye bobovyye Primorya i ikh kormovoye znacheniye [Wild legumes of Primorye and their forage value]. In: *Flora i rastitelnost Dalnego Vostoka* [Flora and vegetation of the Far East]. Vol. I. Vladivostok. 95 p. (In Russ.)
- Larin I.V. (ed.). 1951. *Kormovyye rasteniya senokosov i pastbishch SSSR* [Forage plants of hayfields and pastures of the USSR]. V. 2. Moscow, Leningrad. 947 p. (In Russ.)
- Lonchakova T.E., Pianova A.S., Berdasova K.S. 2023. Vvedeniye v kulturu *in vitro* *Lespedeza davurica* (Fabaceae) [*In Vitro* Introduction of *Lespedeza davurica* (Fabaceae)]. *Rastitelnyye resursy* [Plant resources]. V. 59. № 3. 257–261 pp. (In Russ.) DOI: 10.31857/S003399462303010X
- Lysiuk R., Darmohray R. 2016. Pharmacology and Ethnomedicine of the Genus *Astragalus*. *International Journal of Pharmacology Phytochemistry and Ethnomedicine*. 3: 46–53.
- Makarov V.P. 2017. The results of the study collection of the species of *Astragalus* in Zabaykalsky kra. *Proceedings on applied botany, genetics and breeding*. 178(2): 5–15. (In Russ.)
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:13. 473–497.
- Tkhai Kh.N., Nesterova S.V., Gorobets K.V., Tsarenko N.A. 2023. Vskhozhest i dinamika prorastaniya semyan *Astragalus uliginosus* L. i *Lespedeza cyrtobotrya* Miq. (sem. Fabaceae Lindl.) raznykh srokov khraneniya [Germinating ability and germination dynamics of the seeds of *Astragalus uliginosus* L. and *Lespedeza cyrtobotrya* Miq. (family Fabaceae Lindl.) of different storage periods]. Materialy regionalnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii po yestvennym naukam dlya studentov, aspirantov i molodykh uchenykh [Materials of the regional scientific and practical conference on natural sciences for students, postgraduates and young scientists]. Vladivostok. 18–21 pp. (In Russ.)