

УДК 631.522.23(04)

Асанакунуов Б.А.

ПОЛУЧЕНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ СЕМЯН РАСТЕНИЙ РОДА *Scutellaria*
МЕТОДОМ ИНКАПСУЛИРОВАНИЯ

(Институт биотехнологии НАН Кыргызской Республики)

Инкапсулирование является одним из перспективных методов сохранения гермоплазмы растений. Наши исследования направлены на получение искусственных семян растений рода Scutellaria, а также регенерации искусственных семян путем высаживания в полустерильные условия.

В последнее время интенсивно развиваются технологии получения искусственных семян из размножаемых *in vitro* растений. Данная технология позволяет получать большое количество однородного растительного меристемного материала, обладающего способностью к формированию целого растения. Искусственные семена могут служить способом сохранения генетического материала редких видов растений, тем самым способствуя сохранению биоразнообразия [1]. Кроме того, они являются удобной формой обмена стерильным растительным материалом в исследовательских целях.

Технология искусственных семян перспективна для размножения сельскохозяйственных культур. Размножение некоторых видов культур не принесло успехов вследствие гетерозиготности семян, их мелкого размера, наличия недоразвитого эндосперма, требования семян в микоризных грибах для прорастания (напр. орхидей), а также в случае некоторых бессемянных сортов культур, таких как виноград, арбуз и др. Некоторые из этих видов могут размножаться вегетативными способами, однако технология вегетативного *in vivo* размножения является трудоемкой и дорогостоящей. Разработка технологии получения искусственных семян рассматривается как эффективный альтернативный метод размножения некоторых важных сельскохозяйственных культур, а также элитных видов растений с высокой коммерческой ценностью [2].

Термин "искусственное семя" часто определяется как аналог ботанического семени, состоящего из соматического эмбриона, окруженного искусственной семенной оболочкой [3]. Это определение основано на схожести соматического эмбриона с зиготным в морфологическом, физиологическом и биохимическом отношении [4]. Redenbaugh et al. отмечают, что соматический эмбрион, заключенный в искусственную семенную оболочку, наиболее эквивалентен незрелому зиготному эмбриону [3]. У многих видов растений в незрелом эмбрионе на этой стадии все еще присутствует эндосперм [5], ткань эндосперма разрушается, когда зиготный эмбрион достигает стадии полной зрелости. Следовательно, соматический эмбрион должен быть окружен не только искусственной семенной оболочкой, но также и искусственным эндоспермом для того, чтобы быть определенным как аналог ботаническому семени, состоящему из соматического эмбриона [1].

Технология получения искусственных семян заключается в инкапсулировании апикальных и пазушных меристем с целью продолжительного сохранения в условиях низких положительных температур [6]. Целью нашей работы являлась разработка протоколов получения "искусственных семян" эндемиков, редких и хозяйственно ценных видов растений Кыргызстана.

Материалы и методы

Объектами исследований служили 5 видов растений рода *Scutellaria*: *Scutellaria adenostegia* Briq., *Scutellaria andrachnoides* Vved., *Scutellaria comosa* Juz., *Scutellaria lanipes* Juz., и *Scutellaria pycnoclada* Juz.

Семена были простерилизованы по общепринятой методике [7] и посажены на питательную среду Мурасиге и Скуга (MS) для проращивания. Далее проростки размножались микрочеренкованием на среде Гамборга (B-5) для получения растительного материала для опыта. Часть эксплантов выращивалась только при +18-22°C, другая часть проходила холодовую закалку при +3-5°C в течение 1 месяца.

Для получения искусственных семян отбирались апикальные и латеральные почки. Растения разрезали на микрочеренки размером 1,5-2 мм длиной, на которых присутствовали апикальные или по 2 латеральные меристемы. Микрочеренки суспендировали в небольшом количестве 3%-ного раствора альгината натрия на среде B-5 с добавлением 1 мг/л индоллил-масляной кислоты. Затем эту суспензию стерильной пипеткой помещали в 100 мМ 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 +3-5°C [8]. Жизнеспособность проверялась после 1, 2, 3 и 5 месяцев хранения.

Результаты и их обсуждение

Было посажено по 40 искусственных семян каждого вида полученных от эксплантов не прошедших и прошедших холодовую закалку (таблица). Как видно из таблицы, образование побегов у искусственных семян видов *S. adenostegia*, *S. andrachnoides*, *S. comosa* и *S. lanipes*, не прошедших холодовую закалку, в контроле не превышает 30%, у *S. pycnoclada* образование побегов не наблюдалось. После 1 и 2 месяцев хранения искусственных семян, полученных от растений, не прошедших холодовую закалку образования побегов не

наблюдалось ни у одного из пяти видов. Искусственные семена практически полностью развивались в каллус (Рисунок 1).

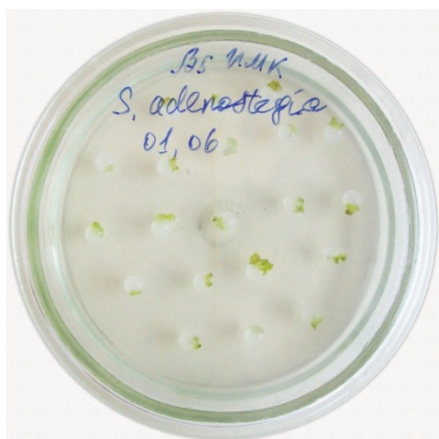


Рисунок 1 - Образование каллуса у искусственных семян *S. adenostegia*, полученных от растений, не прошедших холодovou заcalку

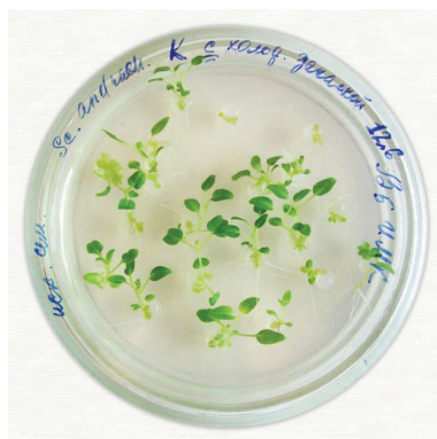


Рисунок 2 - Побеги искусственных семян, полученных из эксплантов *S. andrachnoides*, прошедших холодovou заcalку

Таблица - Жизнеспособность искусственных семян, полученных от растений, не прошедших и проходивших холодovou заcalку

Вид	Срок хранения	Без холодовой заcalки		После холодовой заcalки	
		кол-во проросших семян	жизнеспособность, %	кол-во проросших семян	жизнеспособность, %
1	2	3	4	5	6
<i>S. adenostegia</i>	контроль	6	15	18	45
	1 месяц	0	0	16	40
	2 месяца	0	0	18	45
	3 месяца	-	-	14	35
	5 месяцев	-	-	12	30
<i>S. andrachnoides</i>	контроль	10	25	40	100
	1 месяц	0	0	38	95
	2 месяца	0	0	35	88
	3 месяца	-	-	36	90
	5 месяцев	-	-	33	83
<i>S. comosa</i>	контроль	12	30	23	58
	1 месяц	0	0	21	53
	2 месяца	0	0	22	55
	3 месяца	-	-	18	45
	5 месяцев	-	-	15	38
<i>S. lanipes</i>	контроль	4	10	21	53
	1 месяц	0	0	20	50
	2 месяца	0	0	16	40
	3 месяца	-	-	12	30
	5 месяцев	-	-	9	23
<i>S. pycnoclada</i>	контроль	0	0	26	65
	1 месяц	0	0	24	60
	2 месяца	0	0	21	53
	3 месяца	-	-	18	45
	5 месяцев	-	-	12	30

Холодовая заcalка растений в течение короткого периода (до 6 недель) значительно повышает выживаемость меристем [9,10]. Образование побегов в контроле у искусственных семян из растений прошедших холодovou заcalку повышается (таблица) и превышает 50% у видов *S. comosa*, *S. lanipes* и *S. pycnoclada*, а у *S. andrachnoides* побеги дали все семена (Рисунок 2).

Нами были продолжены наблюдения за жизнеспособностью искусственных семян, хранящихся при низкой температуре (Таблица). У семян всех видов после 5 месяцев жизнеспособность снизилась незначительно. В период от 4 до 5 месяцев хранения у них началось формирование этиолированных побегов с

редуцированными листьями, появлялись корни (Рисунок 3). Жизнеспособность искусственных семян оставалась на высоком уровне, но в процессе длительного (более 4-х месяцев) хранения эти семена начинали давать побеги, и дальше хранить их было нельзя. Побеги были высажены в камеру и выращивались на свету, все они развились в зеленые растения с хорошо развитыми корнями. Для увеличения сроков хранения семян необходимо применять другие способы обработки.

Кроме проращивания искусственных семян в стерильных условиях нами был проделан опыт по высаживанию семян в полустерильные условия в почву. При посадке в почву незащищенных семян окончилась неудачей, все они заразились и погибли. Богатый питательными веществами альгинатный “эндосперм” искусственных семян нуждается в защите от бактериального и грибного заражения [11]. Нами предпринята попытка нанести второй, защитный слой. Для нанесения защитного слоя на искусственные семена при высаживании их в почву были приготовлены 100 мл 3% раствора альгината на среде В-5 без гормонов и в него внесены 150 мг фундазола и 100 мг клафорана.

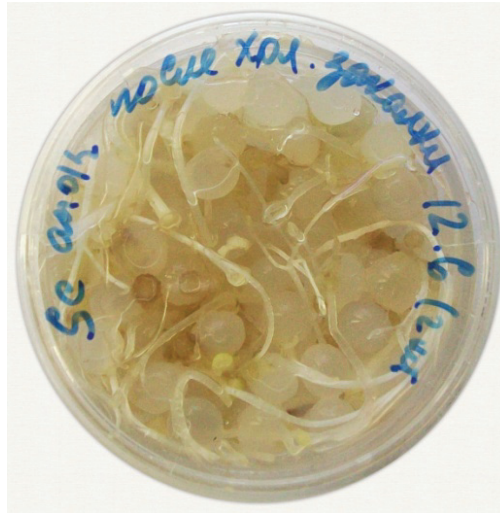


Рисунок 3 - Образование этиолированных побегов у искусственных семян *S. andrachnoides* после 4-х месяцев хранения

На заранее полученные искусственные семена *S. andrachnoides* и *S. lanipes* был нанесен второй защитный слой, и они были высажены в горшочки с простерилизованной почвой, смешанной с песком. Для поддержания влажности верхнего слоя почвы горшочки прикрывали слоем полиэтилена и ежедневно опрыскивали стерильной водой. Из 20 семян *S. andrachnoides* нами были получены 9 растений, выход растений *S. lanipes* был намного ниже (всего 5 растений).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о перспективности дальнейших исследований метода получения искусственных семян с изучением условий инкапсулирования и режимов обработки растений.

Литература

- 1 Khor E. and Loh C. *Artificial Seeds. Applications of Cell Immobilisation Biotechnology*, Vol. 8B, Part 5, 2005, P.527-537
- 2 Saiprasad G. *Artificial Seeds and their Applications. Resonance*, Vol. 6, Num. 5, 2001, P.39-47.
- 3 Redenbaugh K., Fujii J.A. and Slade D. *Encapsulated plant embryos. In: Mizrahi A. (Ed.) Advances in biotechnological processes. Vol. 9. Liss, New York, USA; 1988, P.225-248.*
- 4 Redenbaugh K. et al. *Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. Bio/Technol.* 4, 1981, P.797-801.
- 5 Esau K. *Anatomy of Seed Plants. John Wiley & Sons, New York, USA, 1977.*
- 6 Matsumoto T., Takahashi C., Sakai A. and Nako Y. *Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of hybrid statice by three different procedures. Scientia Horticulturae*, Vol. 76, 1998, P.105-114.
- 7 Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. *Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев.: «Наукова думка», 1980, 486 с.*
- 8 Adriani M. et al. *Effect of different treatments on the conversion of 'Hayward' kiwifruit synthetic seeds to whole plants following encapsulation of in vitro-derived buds. New Zealand J. of Crop and Horticultural Science*, Vol. 28, 2000, P.59-67.
- 9 Brison M., De Boucaud T. and Dosba F. *Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of two interspecific Prunus rootstock. Plant Sci.* 105, 1995, P. 235-242.
- 10 Stushnoff C. *Cryopreservation of apple genetic resources. Can. J. Plant Sci.* 67, 1987, P.1151-1154.
- 11 Ganapathi T. R. et al. *Regeneration of plants from alginate-encapsulated somatic embryos of banana cv. 'rasthali' (Musa spp. AAB group). In vitro Cell Dev Biol -Plant*, v.37, 2001, P.178-181.