

ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO* РОСЛИН АСТРАГАЛУ ШЕРСТИСТОКВІТКОВОГО (*ASTRAGALUS DASYANTHUS* PALL)

О.Ю. КВАСКО,

кандидат біологічних наук, завідувач кафедри екобіотехнології та біорізноманіття,

<https://orcid.org/0000-0002-2878-8683>,

E-mail: kvasko_o@nubip.edu.ua

О.А. МАНЖУРА,

аспірант кафедри екобіотехнології та біорізноманіття,

<https://orcid.org/0009-0005-0156-2093>

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
Київ, Україна

Анотація. Дослідження присвячено вивченню особливостей культивування *in vitro* лікарської рослини *Astragalus dasyanthus* Pall, занесеної до Червоної книги України та має статус виду, що зникає. Вирощування астрагалу шерстистоквіткового на території України на сьогоднішній день ускладнено через недоступність сировинної бази на тимчасово окупований південній частині України, а також через низьку насінневу продуктивність культури. Перспективним є застосування методів культивування рослинних тканин *in vitro* для відновлення природних угруповань *A. dasyanthus* та розширення можливих джерел сировини для синтезу лікарських речовин. В даній роботі було досліджено умови отримання асептичних рослин астрагалу шерстистоквіткового з насіння та оцінено вплив попередньої механічної скарифікації на енергію його проростання з урахуванням відсотка отриманих стерильних проростків. Крім того, було визначено ефективність мікроклонального розмноження *A. dasyanthus* залежно від складу живильного середовища, зокрема концентрації макроелементів та наявності і концентрації регуляторів росту. Показано, що асептичні рослини астрагалу шерстистоквіткового можна отримати шляхом поверхневої стерилізації насіння, яке було попередньо піддано механічній скарифікації, або за умов його пророщування на живильному середовищі Мурасиге та Скуга із додаванням 0,1 мг/л бензиламінопурину. Визначено, що тип та концентрація цитокініну впливає на ефективність мікроклонального розмноження рослин *A. dasyanthus*, тоді як зменшення вдвічі вмісту макроелементів в живильному середовищі суттєво не впливає на даний показник. В роботі зазначено, що додавання в живильне середовище бензиламінопурину стимулює утворення більшої кількості додаткових пагонів астрагалу шерстистоквіткового в культурі *in vitro* у порівнянні з живильним

середовищем, яке містило кінетин. Отже, оптимальним для культивування *in vitro* рослин астрагалу шерстистоквіткового є живильне середовище Мурасиге та Скуга з додаванням 0,5мг/л бензиламінопурина.

Ключові слова: Астрагал шерстистоквітковий, мікроклональне розмноження, регулятори росту рослин.

Вступ.

На сучасному етапі розвитку фармацевтичної галузі лікарські засоби рослинного походження охоплюють значну частину як національного ринку, так і ринків провідних країн світу. За оцінками експертів, близько 25 % лікарських засобів, що застосовують у медичній практиці в усьому світі, отримують безпосередньо з лікарської рослинної сировини (Mirzoieva T.V., 2018).

Astragalus dasyanthus - трав'янистий багаторічник, що належить до родини Fabaceae (бобових), лікарська рослина, що занесена до Червоної книги України та має статус виду, що зникає (Kirian V.M. et al., 2018). Фармакологічні препарати, розроблені на основі Астрагалу шерстистоквітового, виявляють седативну, гіпотензивну, імуностимулюючу та гепатопротекторну активності (Ionkova et al., 1995). *A. dasyanthus* синтезує тритерпенові глікозиди (дазіантозиди), флавоноїди (кемпферол, кверцетин, ізорафнетин та астрагалозід), дубильні речовини, кумарини та оксикумарини, амінокислоти, вітаміни, зокрема, токоферол (Ionkova et al., 1995; Jaradat et al., 2017; Krasteva et al., 2016, Linnek et al., 2011). Крім того, рослини астрагалу шерстистоквітковий здатні до накопичення макро- та мікроелементів, зокрема, селену, кальцію, кремнію, алюмінію, заліза, магнію, цинку, мангану, молібдену тощо (Zudova, Khvorost, 2021).

Вирощування рослин *A. dasyanthus* на території України на сьогоднішній день має певні складнощі. Перш за все, значні площі для вирощування даного виду рослин знаходились на території окупованого Кримського півострова, отже, ця сировинна база наразі є недоступною. Крім того, вирощування астрагалу шерстистоквітового традиційними способам з насіння має низьку ефективність, оскільки даний вид рослин відрізняється низькою насінневою продуктивністю (El-Sahhar et al., 2013).

Останнім часом особливої актуальності набуває використання методів культури тканин рослин *in vitro* для запобігання зниження чисельності видів, зокрема тих, які занесені до Червоної книги України, та забезпечує збереження генетичних ресурсів. Також перспективним є створення лікарської сировини на основі культури рослинних тканин *in vitro* з метою її використання для синтезу біологічно активних речовин. Для більшості видів роду *Astragalus* кількість розроблених ефективних протоколів культивування *in vitro* є недостатньою. Підбір та оптимізація методів введення в асептичну культуру з подальшим мікроклональним розмноженням та адаптацією рослин *A. dasyanthus* є актуальним завданням, направленим на збереження біорізноманіття цих рослин, а також отримання перспективної сировини для отримання лікарських речовин.

Отже, **метою роботи** було оптимізувати склад живильного середовища для мікроклонального розмноження рослин *Astragalus dasyanthus* Pall.

Матеріали і методи дослідження.

Вихідним матеріалом для отримання асептичних рослин слугувало насіння *A. dasyanthus*. Враховуючи низьку схожість насіння астрагалу шерстистоквіткового, а також можливість підвищення даного показника через попередню механічну скарифікацію, для отримання асептичних рослин було застосовано 2 варіанти підготовки насіння до стерилізації: без попередньої механічної скарифікації та з попередньою скарифікацією насіння. Асептичні рослини астрагалу шерстистоквіткового отримували шляхом поверхневої стерилізації на-

сіння. Для цього насіння послідовно витримували у 70% етанолі (30 сек), 25%-му розчині гіпохлориту натрію (комерційний препарат «Білизна») та промивали стерильною дистильованою водою (тричі по 10 хв). Насіння пророщували на живильному середовищі Мурасиге та Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1963) без додавання регуляторів росту та на живильному середовищі МС, доповненому 1,0 мг/л бензиламінопурина (БАП). Після того визначали життєздатність та енергію проростання насіння з урахування стерильності отриманих проростків. Отримані асептичні пагони культивували на живильних середовищах МС з різним вмістом макроелементів та регуляторів росту. Так, для мікроклонального розмноження використовували середовища МС з повним вмістом макроелементів та ½ МС зі зменшеним вдвічі їх вмістом. До кожного з цих додавали

1. Склад живильних середовищ для мікроклонального розмноження рослин *A. dasyanthus*

Варіант середовища, №з/п	Вміст макроелементів (МС або 1/2МС)	Цитокінін, мг/л	Ауксин, мг/л
1.	½ МС	—	—
2.	½ МС	БАП, 0,5	ІМК, 0,05
3.	½ МС	БАП, 0,25	ІМК, 0,025
4.	½ МС	БАП, 0,1	ІМК, 0,01
5.	½ МС	Кінетин, 0,5	ІМК, 0,05
6.	½ МС	Кінетин, 0,25	ІМК, 0,25
7.	½ МС	Кінетин, 0,1	ІМК, 0,1
8.	МС	—	—
9.	МС	БАП, 0,5	ІМК, 0,05
10.	МС	БАП, 0,25	ІМК, 0,025
11.	МС	БАП, 0,1	ІМК, 0,01
12.	МС	Кінетин 0,5	ІМК, 0,05
13.	МС	Кінетин, 0,25	ІМК, 0,25
14.	МС	Кінетин, 0,1	ІМК, 0,1

регулятори росту бензиламінопурин (БАП) та кінетин у концентраціях 0,1; 0,25; 0,5 мг/л, а також індолілмасляну кислоту (ІМК) у концентраціях 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 мг/л (табл.1).

Результати дослідження та їх обговорення.

Результати досліджень показали, що механічна скарифікація суттєво підвищує енергію проростання насіння рослин астрагалу шерстистоквіткового. Так, за умов попередньої механічної скарифікації насіння відсоток життєздатних стерильних насінин складав $83,00 \pm 1,02$ %, тоді як без попередньої механічної скарифікації – $3,00 \pm 0,06$ %. Варто зазначити, що при пророщуванні насіння без попередньої скарифікації на середовищі МС, доповненому 1,0 мг/л БАП, відсоток життєздатних стерильних насінин складав $70,00 \pm 1,18$ %, що є достатньо високим показником для досліджуваного виду рослин і несуттєво (в 1,18 рази) нижчим за відсоток життєздатних стерильних насінин, яке було скарифіковано перед стерилізацією. Отже, для введення в культуру *in vitro* рослин *A. dasyanthus* доцільно використовувати насіння, яке було попередньо піддано механічній скарифікації, або пророщувати його на середовищі МС із додаванням 0,1 мг/л БАП (рис.1).

Дослідження впливу компонентів живильного середовища на ефективність мікроклонального розмноження рослин *A. dasyanthus* показало, що концентрація макроелементів суттєво не впливає на кількість утворених пагонів на одну вихідну рослину. Так, при культивуванні на середовищі $\frac{1}{2}$ МС даний показник складав $8,83 \pm 0,28$ пагонів на одну вихідну рослину, тоді



Рис. 1. Асептичні проростки *A. dasyanthus*, отримані шляхом поверхневої стерилізації насіння

як за умов культивуванні на середовищі МС – $8,50 \pm 0,25$ пагонів на одну вихідну рослину (рис. 2.).

Додавання в живильне середовище регуляторів росту, зокрема БАП та кінетину значно впливає на кількість утворених пагонів на одну вихідну рослину. Так, на живильному середовищі МС з додаванням БАП у концентрації 0,5 мг/л було отримано $20,0 \pm 1,0$ пагонів на рослину (рис. 3, А), тоді як на живильному середовищі МС з додаванням кінетину у концентрації 0,5 мг/л отримано $14,50 \pm 0,30$ пагонів на рослину (рис. 3, Б). Отже, додавання БАП є більш ефективним для мікроклонального розмноження в порівнянні з кінетином (рис. 2, 3).

На ефективність мікроклонального розмноження впливає не тільки тип цитокініну, що додається до живильного середовища, а й його концентрація. Так, зниження концентрації як БАП, так і кінетину з 0,5 мг/л до 0,25 та 0,1 мг/л в живильному середовищі МС та $\frac{1}{2}$ МС призводило до зниження кількості новоутворених пагонів в 1,78-1,91 рази.

Варто зазначити, що на усіх досліджуваних живильних середовищах, до яких було додано ауксин індоліл-

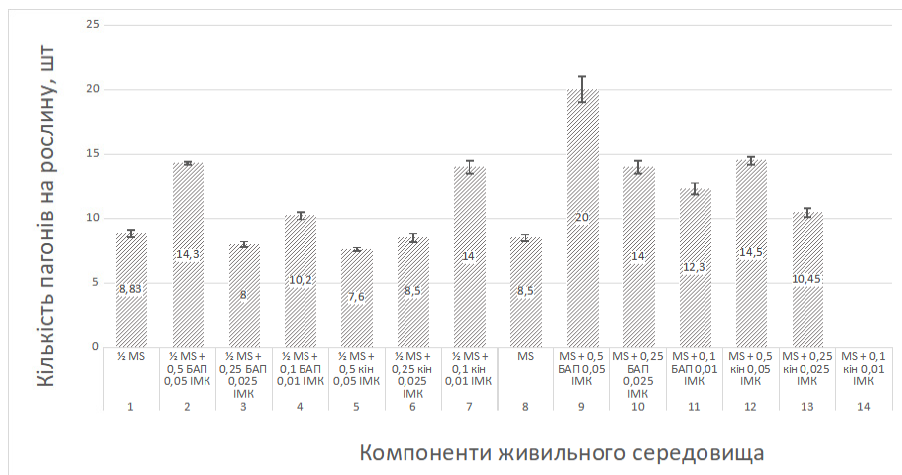


Рис. 2. Вплив складу живильного середовища на ефективність мікроклонального розмноження рослин *Astragalus dasyanthus*

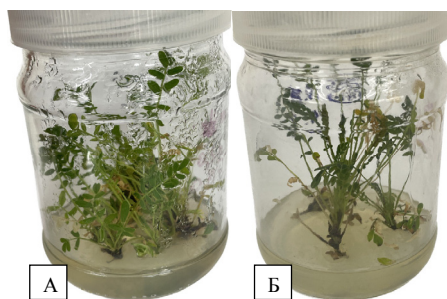


Рис. 3. Рослини астрагалу шерстистоквіткового за умов культивування на середовищах різного складу: А — *A. dasyanthus* на живильному середовищі МС 0,5 мг/л БАП 0,05 мг/л ІМК; Б — *A. dasyanthus* на живильному середовищі МС 0,5 мг/л кінетину 0,05 мг/л ІМК.

масляна кислота (ІМК) для укорінення утворених пагонів, не спостерігали формування кореневої системи (рис. 2). Таким чином, ІМК у досліджуваних концентраціях не призводить до ініціювання коренеутворення у рослин *A. dasyanthus in vitro*.

Висновки.

Асептичні рослини *A. dasyanthus* можна отримати шляхом поверхневої стерилізації насіння, яке було попередньо піддано механічній скарифікації, або за умов його пророщування на живильному середовищі МС із додаванням 0,1 мг/л БАП. Оптимальним середовищем для мікроклонального розмноження є живильне середовище Мурасиге та Скуга з додаванням 0,5 мг/л БАП.

References

1. Mirzoieva, T.V. (2018). Analiz suchasnoho stanu vyrobnytstva likarskykh roslin v Ukraini. *Pryazovskyi ekonomichnyi visnyk*, 6(11), 62-67. [in Ukrainian].
2. Kirian, V. M., Hlushchenko, L. A., Bohuslavskiy R. L. (2018). Henofond roslin liso-stepu Ukrainy. *Henetychni resursy roslin*, 23, 11-31. doi: 10.36814/pgr.2018.23.01 [in Ukrainian].
3. Khvorost, O. et al. (2023). Analysis of carboxylic acids of *Astragalus dasyanthus*

- Pall. herb. Pharmacia, 70(4), 1231–1238. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.70.e111279> [in English].
4. Shkondrov, A. et al. (2019) Production of saponins from in vitro cultures of Astragalus glycyphyllos and their antineoplastic activity. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33:1, 1413-1418. doi: 10.1080/13102818.2019.1671222 [in English].
5. Jaradat, N. A. et al. (2017). Phytochemical and biological properties of four Astragalus species commonly used in traditional Palestinian medicine. *European Journal of Integrative Medicine*, 9, 1-8. doi.org/10.1016/j.eujim.2017.01.008 [in English].
6. Krasteva, I. et al. (2016). Advances in phytochemistry, pharmacology and biotechnology of Bulgarian Astragalus species. *Phytochem Rev*, 15, 567–590. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9462-4> [in English].
7. Linnek, J. et al. (2011). Cycloartane glycosides from three species of Astragalus (Fabaceae). *Helv Chim Acta*. 94(2). 230–237. doi:10.1002/hlca.201000157 [in English].
8. Zudova Ye. Yu., Khvorost O. P. (2021). The study of the elemental composition of common domestic types of the medicinal plant raw material. *News of pharmacy*, 2(102), 14-19. <https://doi.org/10.24959/nphj.21.68> [in English].
9. El-Sahhar K. F., Emara Kh. S., Ali W.A. (2013). Comparative Systematic Studies of Astragalus L. In Flora of Arab Republic of Egypt and Syrian Arab Republic: Seed Features and Germination. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 9(2). 79-88 [in English].
10. Kulak, V. et al (2022). In Vitro Technology in Plant Conservation: Relevance to Biocultural Diversity. *Plants (Basel)*, 11(4), 503. doi: 10.3390/plants11040503 [in English].
11. Murashige T., Skoog F. A. (1962). Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology*, 15, 473-497 [in English].

Kvasko O., Manzhura O. (2024).

FEATURES OF IN VITRO CULTIVATION OF ASTRAGALUS DASYANTHUS PALL PLANTS

BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 15(1): 30-36.

<https://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/article/view/48473>

[http://dx.doi.org/10.31548/biologiya15\(1\).2024.003](http://dx.doi.org/10.31548/biologiya15(1).2024.003)

Abstract. The research is devoted to the study of the peculiarities of in vitro cultivation of the medicinal plant *Astragalus dasyanthus* Pall, which is listed in the Red Book of Ukraine and has the status of an endangered species. The cultivation of woolly-flowered astragalus in Ukraine is currently difficult due to the inaccessibility of the raw material base in the temporarily occupied southern part of Ukraine, as well as due to the low seed productivity of the crop. The use of in vitro plant tissue cultivation methods to restore natural communities of *A. dasyanthus* and expand possible sources of raw materials for the synthesis of medicinal substances is promising. In this work, we investigated the conditions for obtaining aseptic *Astragalus dasyanthus* plants from seeds and evaluated the effect of preliminary mechanical scarification on its germination energy, taking into account the percentage of sterile seedlings obtained. In addition, the efficiency of microclonal propagation of *A. dasyanthus* was determined depending on the composition of the culture medium, in particular the concentration of macronutrients and the presence and concentration of growth regulators. It has been shown that aseptic plants of *Astragalus*

dasyanthus can be obtained by surface sterilization of seeds that have been previously subjected to mechanical scarification or by germination on Murashige and Skoog nutrient medium with the addition of 0.1 mg/l benzylaminopurine. It was determined that the type and concentration of cytokinin affects the efficiency of microclonal propagation of *A. dasyanthus* plants, while halving the content of macronutrients in the nutrient medium does not significantly affect this item. It was found that the addition of benzylaminopurine to the culture medium stimulates the formation of more additional shoots of *A. dasyanthus* in vitro compared to the culture medium containing kinetin. Thus, Murashige and Skoog medium with the addition of 0.5 mg/l of benzylaminopurine is optimal for in vitro cultivation of woolly-flowered *Astragalus* plants.

Key words: *Astragalus dasyanthus* plants, micropropagation, plant growth regulators.
