

СОХРАНЕНИЕ УЯЗВИМОГО ВИДА *OXYTROPIS CHANKAENSIS* (FABACEAE) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

©2025 г. А. С. Пьянова, К. С. Бердасова*, Р. В. Дудкин, Ю. Е. Сабуцкий

Ботанический сад-институт ДВО РАН, г. Владивосток, Россия

*e-mail: k.berdasova@mail.ru

Поступила в редакцию 23.05.2024 г.

После доработки 26.05.2024 г.

Принята к публикации 28.05.2024 г.

Впервые разработан протокол микроклонального размножения *Oxytropis chankaensis* Jurtz. – редкого эндемика Приморского края. В качестве первичных эксплантов использованы семена второго года хранения. Всхожесть семян составила 36%, жизнеспособность – 75%. Культивирование проводилось на среде Мурасиге и Скуга. Выявлено влияние четырех регуляторов роста (6-бензиламинопурина, тиодиазурина, 1-нафтилуксусной кислоты и индолил-3-масляной кислоты) в концентрациях от 0.5 до 2 мг/л, а также их сочетаний на коэффициент размножения и укоренение микроклонов в условиях *in vitro*. Показано положительное влияние 0.5 мг/л тиодиазурина и 2 мг/л индолил-3-масляной кислоты на увеличение числа побегов исследуемого вида. Коэффициент размножения на средах с вышеуказанными регуляторами роста составил 6 и 7 соответственно. Одновременное внесение двух регуляторов роста в питательную среду приводит к образованию каллусной ткани, которая в дальнейшем витрифицируется. Образование корней отмечается на средах Мурасиге–Скуга, дополненных 1 мг/л индолил-3-масляной кислоты или 0.5 мг/л 1-нафтилуксусной кислоты.

Ключевые слова: микроклональное размножение, редкие виды, сохранение биоразнообразия, эндемичный вид

DOI: 10.31857/S0033994625010067, EDN: EGOXWM

Виды со специализированной средой обитания и узким ареалом имеют больший риск исчезновения по сравнению с широко распространенными [11]. Таким видом является остролодочник ханкайский – *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae), редкий эндемик Дальнего Востока, произрастающий на песчаных отложениях по юго-западному побережью озера Ханка.

В настоящий момент в международной базе The Plant List *O. chankaensis* указывается как *O. hailarensis* subsp. *chankaensis* (Jurtz) Kitag., однако, имеется ряд исследований, в которых мнения о статусе *Oxytropis chankaensis* различаются. Так, в работе Л. И. Малышева [4] *O. chankaensis* приводится в качестве синонима *O. hailarensis*. Во Флоре Китая *O. chankaensis* и *O. hailarensis* относят в синонимы к *O. oxyphylla*, тогда как по данным Е. В. Артюковой и М. М. Козыренко [1] *O. hailarensis* и *O. oxyphylla* являются независимыми видами. Мы принимаем точку зрения

Н. С. Павловой [5] и считаем *O. chankaensis* самостоятельным видом.

O. chankaensis – многолетние травянистые растения до 20–25 см высотой с непарноперистосложными листьями, покрытыми белыми волосками. Имеют головчатое, шаровидное или продолговатое соцветие красно-фиолетового цвета [5]. Отмечается высокая декоративность вида как в период цветения, так и в период вегетации. Кроме того, остролодочник ханкайский обладает лекарственными свойствами [7, 9]. Вид имеет узко ограниченный ареал, к тому же территория его произрастания испытывает высокую антропогенную нагрузку, что может привести к его полному исчезновению. *O. chankaensis* охраняется в Ханкайском заповеднике [6]. Эксперимент по введению в культуру путем переноса растений на вегетативной стадии онтогенеза из естественного места обитания на территорию Ботанического сада-института ДВО РАН оказался не удачным, так как

растения погибали (личное сообщение с.н.с. лаборатории флоры БСИ ДВО РАН В. А. Калинкиной). В настоящее время успешным способом сохранения *O. chankaensis* является криоконсервация семян [2, 3].

Сохранить *O. chankaensis* представляется возможным с помощью методов микроклонального размножения, что и явилось целью настоящего исследования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объекты

В качестве первичных эксплантов использовали зрелые семена *Oxytropis chankaensis*, для скарификации и стерилизации которых использовали наиболее эффективный способ из проведенного ранее исследования [10], и микrorастения, полученные *in vitro*.

Реагенты

Для приготовления среды Мурасиге–Скуга (MS) использовали макро- и микроэлементы, а также витамины [16], агар-агар и регуляторы роста: 6-бензиламинопурин (6-БАП), 1-нафтилуксусная кислота (НУК) (SigmaAldrich, США), индолил-3-масляная кислота (ИМК) и тиодиазурон (ТДЗ) (Natursim, Китай).

Питательные среды и условия

Во всех экспериментах использовали питательную 0.7%-ную агаризованную среду Мурасиге–Скуга (MS) с добавлением 3%-ной сахарозы. Перед автоклавированием pH среды доводили до значения 5.6–5.8. Автоклавировали с помощью парового стерилизатора Sanyo MLS-3781L (Япония) при 121 °C в течение 20 минут. Регуляторы роста добавляли в среду после автоклавирования. Стерилизацию эксплантов и пассажи проводили в условиях асептического ламинарного бокса БАВнп-01-«Ламинар-С»-1.5 (Россия). Экспланты, полученные из сеянцев *in vitro*, помещали на поверхность питательной среды MS с добавлением выше указанных регуляторов роста. В культуральной комнате поддерживали условия освещенности 2–3 тыс. лк. с белым флуоресцентным светом (Philips, Польша) и фотопериодом 16 часов, температура помещения составляла 23 ± 2 °C. После 21 дня культивирования оценивали морфогенетный ответ. При необходимости наблюдения продолжали на той же среде.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Всхожесть семян второго года хранения составила 36%, жизнеспособность – 75%.

При исследовании влияния сочетания 6-БАП и НУК (табл. 1, рис. 1) на развитие *O. chankaensis* был отмечен процесс каллусогенеза, что не согласуется с ранее описанным протоколом для вида из этого же рода [15], кроме того каллусообразование мы наблюдали при совместном добавлении в среду 1 мг/л 6-БАП и 0.5 мг/л ТДЗ, каллусные клетки были от светло-желтого до светло-зеленого цвета, мягкие, витрифицированные.

В исследовании О. В. Юрьевой с соавторами [8] показан положительный эффект 6-БАП без использования других экзогенных регуляторов для *Oxytropis triphylla*, что также было отмечено и в нашем исследовании. Культивирование эксплантов *O. chankaensis* на среде MS дополненной 0.5 мг/л 6-БАП приводило к образованию дополнительных побегов у всех растений, коэффициент размножения был равен 4 (табл. 2), однако, при увеличении содержания данного регулятора роста до 2 мг/л дополнительные растения давали лишь единичные экземпляры.

Поскольку в биотехнологии растений все чаще стал использоваться регулятор роста тиодиазурон (ТДЗ), который выполняет как функцию цитокинина, так и ауксина [13, 14], мы использовали данный регулятор в качестве дополнительного стимулятора размножения микrorастений. Отмечено, что при использовании данного регулятора роста в концентрации 0.5 мг/л среды коэффициент размножения составляет 6, при увеличении концентрации до 1 мг/л коэффициент снижается.

Перенос полученных жизнеспособных растений-регенерантов на среды MS, дополненные 1 и 2 мг/л ИМК, приводил к пролиферации новых побегов от 2 до 7, хотя данный регулятор роста обычно используется для индукции ризогенеза [12]. Процесс ризогенеза также отмечали на этих средах: при добавлении 1 мг/л ИМК образование корней происходило у всех микроклонов, при увеличении данного регулятора роста до 2 мг/л ризогенез отмечали у единичных экземпляров.

При культивировании полученных растений на среде MS с добавлением 0.5 мг/л НУК регистрировали образование корней у всех

Таблица 1. Влияние регуляторов роста на морфогенез *Oxytropis chankaensis*
Table 1. The effect of growth regulators on the morphogenesis of *Oxytropis chankaensis*

Номер опыта Experiment number	Концентрация регуляторов роста, мг/л Concentration of growth regulators, mg/l				Морфогенетический ответ Morphogenic response
	6-БАП 6-BAP	ТДЗ TDZ	ИМК IBA	НУК NAA	
1	0.5	—	—	—	Побеги Shoots
2	2	—	—	—	Побеги у единичных экземпляров Shoots in single specimens
3	—	0.5	—	—	Побеги Shoots
4	—	1	—	—	Побеги Shoots
5	—	—	1	—	Побеги и корни Shoots. Roots
6	—	—	2	—	Побеги. Корни у единичных экземпляров Shoots. Roots in single specimens
7	—	—	—	0.5	Побеги и корни. Shoots. Roots
8	1	0.5	—	—	Каллус Callus
9	2	—	—	0.5	Каллус Callus

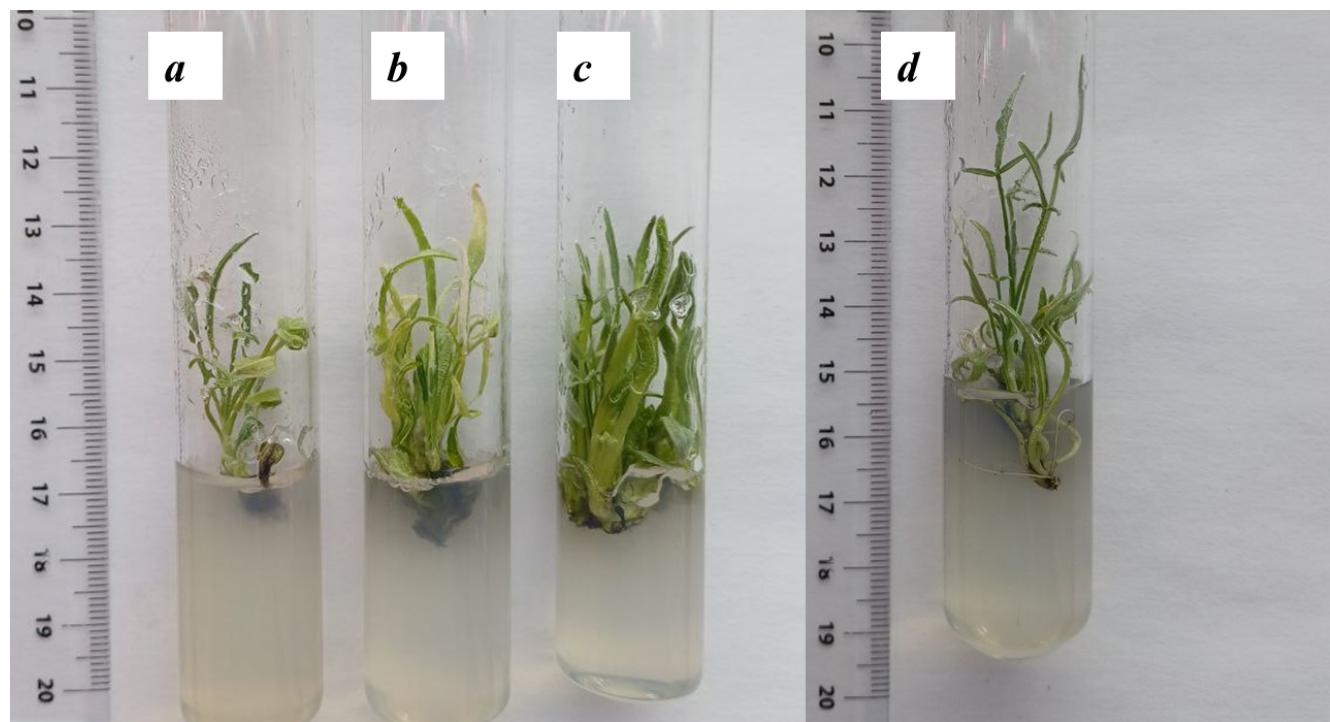


Рис. 1. Размножение *Oxytropis chankaensis* в культуре *in vitro*: а – на среде МС без регуляторов роста, б – МС + 0.5 мг/л 6-БАП; в – МС + 0.5 мг/л ТДЗ; г – МС + 0.5 мг/л НУК.

Fig. 1. Reproduction of *Oxytropis chankaensis* in vitro: a – on MS growth medium without growth regulators, b – MS + 0.5 mg/l 6-BAP; c – MS + 0.5 mg/l TDZ; d – MS + 0.5 mg/l NAA.

Таблица 2. Влияние регуляторов роста на размножение *Oxytropis chankaensis*

Table 2. The effect of growth regulators on reproduction of *Oxytropis chankaensis*

Номер опыта Experiment number	Регулятор роста Growth regulator	Коэффициент размножения Reproduction index
1	0.5 мг/л 6-БАП 0.5 mg/l 6-BAP	4
3	0.5 мг/л ТДЗ 0.5 mg/l TDZ	6
4	1 мг/л ТДЗ 1 mg/l TDZ	4
5	1 мг/л ИМК 1 mg/l IBA	2
6	2 мг/л ИМК 2 mg/l IBA	7
7	0.5 мг/л НУК 0.5 mg/l NAA	2

микроклонов. Также на данной среде мы зарегистрировали коэффициент размножения, равный 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые разработан протокол микроклонального размножения *Oxytropis chankaensis* Jurtz. Показано, что использованные регуляторы роста

способны инициировать образование новых побегов, но с разным коэффициентом размножения. Максимальный коэффициент отмечали на средах МС с добавлением 0.5 мг/л ТДЗ (6) и 2 мг/л ИМК (7). Образование корней наблюдали на средах, дополненных 1 мг/л ИМК и 0.5 мг/л НУК, у всех микроклонов. Использование комбинаций регуляторов роста 1 мг/л 6-БАП + 0.5 мг/л ТДЗ и 1 мг/л 6-БАП + 0.5 мг/л НУК приводило к образованию каллусной ткани, которая была витрифицирована. Добавление в питательную среду нескольких регуляторов роста одновременно вызывает высокую степень гидратации микrorастений и каллусов с последующей их гибелью.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ 122040800086-1 по теме «Введение в культуру, изучение и сохранение генетических ресурсов хозяйственно ценных растений Восточной Азии» на базе уникальной научной установки «Коллекция живых растений *in vitro* Ботанического сада-института ДВО РАН» (347296 – реестровый регистрационный номер на сайте <http://ckp-rf.ru>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ см. REFERENCES

Conservation of the Vulnerable Species *Oxytropis Chankaensis* (Fabaceae) Using *In Vitro* Culture

© 2025. A. S. Pianova, K. S. Berdasova*, R. V. Doudkin, Yu. E. Sabutski

Botanical Garden-Institute FEB RAS, Vladivostok, Russia

*e-mail: k.berdasova@mail.ru

Abstract. The protocol of microclonal reproduction of *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (a rare endemic species of the Primorye Territory) was developed for the first time. Seeds of the second year of storage were used as primary explants. Seed germination was 36%, and viability – 75%. Cultivation was carried out on Murashige and Skoog (MS) medium. The effect of four growth regulators (6-benzylaminopurine, thidiazuron, 1-naphthylacetic acid and indole-3-butyric acid) in concentrations from 0.5 to 2 mg/l, and of their combinations on the reproduction index and rooting of microclones *in vitro* was evaluated. In the studied species, the positive effect of 0.5 mg/l thidiazuron and 2 mg/l indole-3-butyric acid on the multiplication of shoots was observed. On the growth media supplemented with the above growth regulators, the reproduction index was 6 and 7, respectively. Simultaneous application of two growth regulators into the nutrient medium leads to the formation of callus tissue, subsequently vitrified. Root formation is observed on MS medium supplemented with 1 mg/l indole-3-butyric acid or 0.5 mg/l 1-naphthylacetic acid.

Keywords: microclonal propagation, rare species, biodiversity conservation, endemic species

ACKNOWLEDGEMENTS

The research was carried out within the framework of the state assignment 122040800086-1 “Introduction to culture, Study and conservation of genetic resources of economically valuable plants of Eastern Asia” using unique scientific facility “*In vitro* collection of live plants of the Botanical Garden Institute of the Far-Eastern branch of the Russian Academy of Sciences” (www.ckp-rf.ru website registry number: 347296).

REFERENCES

1. Арtyukova B. E., Kozыренко M. M. 2012. Филогенетические отношения *Oxytropis chankaensis* Jurtz. и *Oxytropis oxyphylla* (Pall.) DC. (Fabaceae) по данным секвенирования ITS рибосомного оперона ядерной ДНК и межгенных спейсеров хлоропластного генома. — Генетика. 48(2): 186–193.
<https://elibrary.ru/oowith>
Artyukova E. V., Kozыренко M. M. 2012. Phylogenetic relationships of *Oxytropis chankaensis* Jurtz. and *Oxytropis oxyphylla* (Pall.) DC. (Fabaceae) inferred from the data of sequencing of the ITS region of the nuclear ribosomal DNA operon and intergenic spacers of the chloroplast genome. — Russ. J. Genet. 48(2): 163–169.
<https://doi.org/10.1134/S1022795411110032>
2. Воронкова Н. М., Холина А. Б. 2010. Сохранение эндемичных видов Дальнего Востока России с помощью глубокого замораживания семян. — Известия РАН. Серия биологическая. 5: 581–586.
<https://elibrary.ru/mvntdl>
Voronkova N. M., Kholina A. B. 2010. Conservation of endemic species from the Russian Far East using seed cryopreservation. — Biol. Bull. 37(5): 496–501.
<https://doi.org/10.1134/S1062359010050092>
3. Воронкова Н. М., Холина А. Б. 2017. Биология прорастания и хранение семян эндемичных видов рода остролодка (*Oxytropis* DC., семейство Fabaceae) Сибири и Дальнего Востока России. — Вестник ДВО РАН. 2: 23–30.
<https://elibrary.ru/zizpkb>
Voronkova N. M., Kholina A. B. 2017. Germination biology and seed storage of endemic species of crazyweed genus (*Oxytropis* DC., Fabaceae family) from Siberia and Russian Far East. — Vestnik of Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences 2: 23–30.
<https://elibrary.ru/zizpkb> (In Russian)
4. Малышев Л. И. 2008. Разнообразие рода остролодка (*Oxytropis*) в Азиатской России. — Turczaninowia. 11(3): 5–141.
<https://elibrary.ru/jvhfqv>
Malyshev L. I. 2008. Diversity of the genus *Oxytropis* in Asian Russia. — Turczaninowia. 11(3): 5–141.
<https://elibrary.ru/jvhfqv> (In Russian)
5. Павлова Н. С. 1989. *Oxytropis* DC. — В кн.: Сосудистые растения советского Дальнего Востока. Л. Т. 4. С. 236–280.
Pavlova N. S. 1989. [*Oxytropis* DC.]. — In: [The vascular plants of the Soviet Far East]. Leningrad. Vol. 4. P. 236–280. (In Russian)
6. Павлова Н. С. 2008. Остролодочник ханкайский — *Oxytropis chankaensis* (Jurtz.). — В кн.: Красная книга Приморского края: Растения. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов. Владивосток. С. 136–137.
https://redbookpk.ru/index_plants.html
Pavlova N. S. 2008. *Oxytropis chankaensis* (Jurtz.). — In: [The Red Data Book of Primorye Teroootory: Plants. Rare and endangered species of plants and fungi]. Vladivostok. P. 136–137.
https://redbookpk.ru/index_plants.html (In Russian)
7. Павлова Н. С., Уланова К. П. 1971. К химическому исследованию дальневосточных видов рода *Oxytropis* DC. — В сб.: Тез. конф. Биологически активные вещества флоры и фауны Дальнего Востока и Тихого океана. Владивосток. С. 19.
Pavlova N. S., Ulanova K. P. 1971. [To the chemical study of the Far Eastern species of the genus *Oxytropis* DC.]. — In: [Proc. conf.: Biologically active substances of flora and fauna of the Far East and the Pacific Ocean]. Vladivostok. P. 19. (In Russian)

8. Юрьева О. В., Гамбург К. З., Казановский С. Г. 2008. Клональное микроразмножение *Oxytropis triphylla* (Fabaceae). — Раст. ресурсы. 44(3): 36–40.
<https://elibrary.ru/julbcv> (In Russian)
9. Шретер А. И. 1975. Остролодочник ханкайский — *Oxytropis hailarensis* Kitag. f. *chankaensis* (Jurtz.) Kitag. [*O. oxyphylla* (Pall.) DC., S.L.]. — В кн. Лекарственная флора советского Дальнего Востока. М. С. 163.
- Shreter A. I. 1975. [*Oxytropis hailarensis* Kitag. f. *chankaensis* (Jurtz.) Kitag. [*O. oxyphylla* (Pall.) DC., S.L.]]. — In: [Medicinal flora of the Soviet Far East]. Moscow. P. 163. (In Russian)
10. Бердасова К. С., Пьянова А. С., Каменева Л. А. 2023. Влияние абиотических факторов на всхожесть *in vitro* семян *Oxytropis chankaensis* Jurtz., редкого эндемичного вида Дальнего Востока России. — Botanica Pacifica. 12(2): 168–171.
<https://doi.org/10.17581/bp.2023.12206> (на англ.)
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. 12(2): 168–171.
<https://doi.org/10.17581/bp.2023.12206>
11. Burlakova L. E., Karataev A. Y., Karataev V. A., May M. E., Bennett D. L., Cook M. J. 2011. Endemic species: Contribution to community uniqueness, effect of habitat alteration, and conservation priorities. — Biological Conservation. 144(1): 155–165.
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.08.010>
12. Deepa A. V., Thomas T. D. 2020. *In vitro* strategies for the conservation of Indian medicinal climbers. — *In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant.* 56(6): 784–802.
<https://doi.org/10.1007/s11627-020-10084-x>
13. Guo B., Abbasi B. H., Zeb A., Xu L. L., Wei Y. H. 2011. Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. — *Afr. J. Biotechnol.* 10: 8984–9000.
<https://doi.org/10.5897/AJB11.636>
14. Guo B., Stiles A. R., Liu C. Z. 2012. Thidiazuron enhances shoot organogenesis from leaf explants of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. — *In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant.* 48(6): 609–612.
<https://doi.org/10.1007/s11627-012-9468-6>
15. He W., Guo B., Fan P., Guo L., Wei Ya. 2015. *In vitro* propagation of a poisonous plant *Oxytropis glabra* (Lam.) DC. — *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.* 120(1): 49–55.
<https://doi.org/10.1007/s11240-014-0577-2>
16. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. — *Physiol. Plant.* 15(3): 473–497.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>