

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* *LESPEDeza DAVURICA* (FABACEAE)© 2023 г. Т. Е. Лончакова¹, *, А. С. Пьянова¹, К. С. Бердасова¹¹Ботанический сад-институт ДВО РАН, г. Владивосток, Россия

*e-mail: yashma135@mail.ru

Поступила в редакцию 18.04.2023 г.

После доработки 25.04.2023 г.

Принята к публикации 02.05.2023 г.

Впервые введен в культуру *in vitro* редкий вид *Lespedeza davurica* (Laxm.) Schindl, произрастающий на территории Российской Федерации. Предложен ряд биотехнологических приемов, позволяющих размножить растения с помощью образования пазушных побегов: подобран эффективный метод стерилизации, опробованы различные питательные среды. Среда Мурасиге и Скуга без регуляторов роста подходит для культивирования и микрклонального размножения исследуемого вида, с добавлением тидиазурона может использоваться для получения дополнительного растительного материала. Результаты исследования представляют интерес для фундаментальных и прикладных аспектов изучения *L. davurica*.

Ключевые слова: *Lespedeza davurica*, редкий вид, культура *in vitro*, прорастание семян, микрклональное размножение, тидиазурон

DOI: 10.31857/S003399462303010X, EDN: RTERSC

Леспедеца даурская (*Lespedeza davurica* (Laxm.) Schindl.) — декоративный полукустарничек семейства бобовых. Представляет собой многолетнее растение до 80 см высотой с несколькими прямостоячими или восходящими, в основании одревесневающими стеблями. Листья тройчатые, на черешках; листочки до 3(4) см длиной и 2 см шириной, овально-продолговатые, на верхушке с шипиком, сверху рассеянно, снизу более густо-прижато-волосистые. Цветки в укороченных густых пазушных кистях. Имеются клейстогамные цветки [1, 2]. Венчик белый или желтоватый, с фиолетовым пятном на лодочке и фиолетовыми жилками на флаге. Бобы вдвое короче чашечки, округло-яйцевидные, густоволосистые. Цветет в августе, плоды созревают в сентябре—октябре, размножается семенами. Растет на сухих остепненных каменистых склонах, а также на песчано-галечниковых берегах рек, поодиночке или группами [2].

В России встречается на юге Дальнего Востока (Приморском крае, Амурской области, Еврейской автономной области) [1, 2] и в Восточной Сибири [3]; вне Российской Федерации — в Монголии, Китае, Корее и Японии [4]. Леспедеца даурская внесена в Красные книги Приморского края [5] и Амурской области [6].

В род *Lespedeza* входят 3 вида лекарственных растений — леспедеца головчатая (*L. capitata* Michx.), леспедеца двуцветная (*L. bicolor* Turcz.) и леспедеца копеечниковая (*L. juncea* (L. f.) Pers.) [7].

Активно ведутся исследования леспедецы даурской, произрастающей на территории Китая. Так, были исследованы морфология корней [8], фотосинтетическая активность [9], накопление натрия и фтора [10], биология опыления [11], газообмен и флуоресценция хлорофилла в листьях [12]. Проводилось сравнение продуктивности популяций леспедецы даурской [13] и наблюдения за процессом роста растений [14]. Проведены исследования влияния экологических факторов на развитие *L. davurica*: интенсивность выпаса скота на территории произрастания вида [15], внесение азота и густота посадки [16], влажность почвы, на которой произрастает вид [17].

При совместной работе исследователей из Республики Корея и Соединенных Штатов Америки было установлено, что экстракт *L. davurica* может защищать от повреждения β-клетки поджелудочной железы и регулировать уровень глюкозы в крови при диабете [18], что указывает на возможность применения сырья исследованного растения в медицине.

Леспедеца даурская, произрастающая на территории Российской Федерации, слабо изучена. В работе О.Г. Потаниной, С. Буджаповой и И.А. Самылиной исследовано анатомическое строение листа, черешка и стебля *L. davurica* под световым микроскопом, на основании чего выявлены анатомо-диагностические признаки растения [19].

Леспедеца даурская имеет хозяйственную ценность и лекарственный потенциал, но мало используется, что, скорее всего, обусловлено, согласно сообщениям М.Г. Николаевой с соавт., наличием у представителей рода *Lespedeza* высокого процента твердых семян [20]. Авторы указывают на необходимость скарификации семян при проращивании представителей исследованного рода с помощью механического повреждения или использования серной кислоты. Вероятно, *L. davurica* накапливает кратковременный семенной банк в почве, но его не всегда хватает для эффективного возобновления. В связи с этим возникает необходимость дополнительных мер по сохранению *L. davurica*. Одним из инструментов, принятых для сохранения редких видов, может служить технология введения в культуру *in vitro*. Поскольку исследования, касающиеся особенностей культивирования *in vitro* леспедецы даурской, в литературе отсутствуют, эта тема представляет научный интерес.

Цель исследования — разработка методов введения в культуру *in vitro* редкого вида *L. davurica*: подбор эффективного способа стерилизации семян, посев семян и получение всходов, подбор питательной среды для культивирования растений *in vitro*, сравнение развития растений на средах свободной от регуляторов роста и с добавлением тидиазурина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве первичных эксплантов были использованы зрелые семена *L. davurica*, собранные на окраине пос. Синельниково (Октябрьский р-он Приморского края) для получения стерильной культуры *in vitro*. Эксперимент проводили в 4-х повторностях.

Приготовление питательных сред

Для приготовления питательных сред использовали сахарозу, макро- и микроэлементы, хелат железа, витамины и агар по прописи Мурасиге и Скуга [21]. Перед автоклавированием pH среды повышали до 5.7–5.8 раствором гидроксида калия. Автоклавирование проводили при 121 °C, 1 атм. за 20 мин. После автоклавирования в часть приготовленной среды добавляли регулятор роста тидиазурон (TDZ). Среда разливали в стерильные пробирки по 10 мл.

Стерилизация семян

Перед стерилизацией семена обрабатывали серной кислотой в течение 25 мин, после чего промывали дистиллированной водой 5 раз по 30 с. Стерилизацию проводили следующим образом: часть семян обрабатывали 0.1%-ным раствором нитрата серебра, другую часть — 1%-ным раство-

ром нитрата серебра, время экспозиции для обеих концентраций составляло 25 мин. После чего все семена обрабатывали 1%-ным раствором хлорида натрия в течение 15 мин и ополаскивали дистиллированной водой 3 раза по 30 с.

Посев семян

После стерилизации семена высаживали на среды Мурасиге и Скуга без регуляторов роста (MS⁰), Мурасиге и Скуга с добавлением 0.5 и 0.1 мг/л тидиазурина (MS + TDZ). Посев семян проходил в стерильном ламинарном боксе при потоке воздуха и горячей спиртовке. Семена помещали по 1 шт. в пробирку и запечатывали фольгой.

Условия культивирования

Для культивирования пробирки с эксплантами помещали в культуральную комнату с освещением 2000–3000 люкс с холодным белым люминесцентным светом (Philips, Польша), температурой 23 ± 2 °C и 16-часовым фотопериодом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами отмечена высокая эффективность стерилизации семян *L. davurica* при использовании в качестве основного стерилизующего агента нитрата серебра (96–100%). Семена начинали прорастать на 3 сут культивирования, на 4 сут отмечали массовое прорастание семян. При культивировании на среде MS⁰ прорастало 82.2% посеянных семян *L. davurica*, на среде MS + TDZ — 73.3%. Общая всхожесть всех изученных семян составила 78.8%. У семян, хранившихся после сбора более 3 лет на момент начала эксперимента, некоторые проростки останавливались в развитии на стадии прорастания корня или стебля.

У большинства проростков *L. davurica*, полученных из семян, хранившихся менее 3 лет, к концу первой недели культивирования появляются семядоли, а к концу второй недели — настоящие листья. Закономерностей влияния TDZ на образование листьев не выявлено. На рисунке показано прорастание семян и первые стадии формирования проростка *L. davurica* в условиях *in vitro*.

На 3–4 нед. культивирования проростков *L. davurica* стали видны различия в морфологии растений на разных средах. На среде MS⁰ растения имели вытянутые междоузлия и тонкие ветвящиеся корни, у растений на среде MS + TDZ междоузлия были укороченные, корни толстые, короткие и слабо ветвящиеся. На среде с низкой концентрацией TDZ (0.1 мг/л) повреждение проростков было менее выражено — встречались проростки с нор-

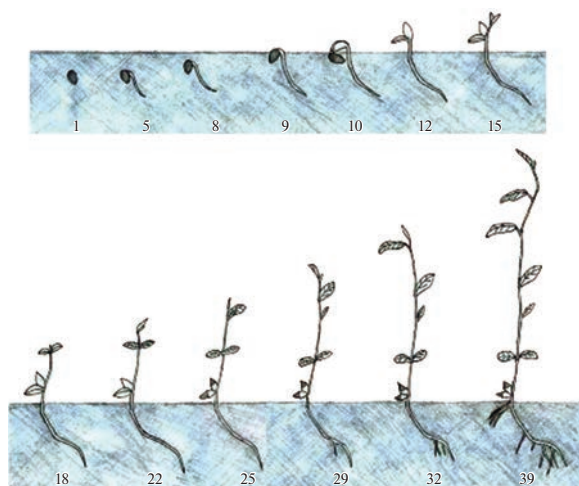


Рис. 1. Прорастание семян и первые стадии формирования проростка *Lespedeza davurica* в условиях *in vitro*. Цифрами обозначены сутки культивирования.

Fig. 1. Seed germination and the first stages of *Lespedeza davurica* seedling formation under *in vitro* conditions. The numbers indicate the days of cultivation.

мально развитыми побегами, их корни ветвились, но были укорочены.

Показано, что проростки могут начать образовывать пазушные побеги к концу первой недели культивирования. Образование боковых пазушных побегов неравномерно — на одних растениях нет ни одного побега, тогда как на других образуется 6 и более побегов, из чего следует, что множественное побегообразование носит случайный характер. В первый месяц культивирования у большинства растений на всех средах формируются 1–3 пазушных побега.

Отросшие развитые пазушные побеги, после появления на них листьев, отделяли и переносили в другие пробирки на среду MS⁰. Большинство побегов дало здоровые корни и продолжило разви-

тие. Отметим, что у побегов, отделенных от растений *L. davurica*, находившихся на среде MS⁰, и побегов растений, находившихся на среде MS + TDZ, в морфологии корней различий не обнаружено. Образовавшиеся корни были не укорочены, хотя материнские растения, развивавшиеся на среде MS + TDZ, имели укороченные плохо развитые корни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы особенности культивирования *in vitro* редкого вида *Lespedeza davurica* (Laxm.) Schindl. (Fabaceae). Показана высокая эффективность стерилизации семян 1%-ным раствором нитрата серебра с применением 1%-ного раствора хлорида натрия. Общая всхожесть семян составила 78.8%, что является достаточно высоким показателем. Отмечено, что семядольные листья у большинства растений исследованного вида появляются к концу первой недели культивирования, настоящие листья — к концу второй недели, боковые пазушные побеги начинают формироваться в первый месяц культивирования. Показана возможность получения жизнеспособных микрорастений *L. davurica* при использовании питательной среды по прописи Мурасиге и Скуга без регуляторов роста и с добавлением тидиазурона. Для индукции ризогенеза достаточно культивировать микрорастения на исследуемых средах, не прибегая к другим регуляторам роста.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена на уникальной научной установке “Коллекция живых растений *in vitro* Ботанического сада-института ДВО РАН” в рамках темы “Введение в культуру, изучение и сохранение генетических ресурсов хозяйственно ценных растений Восточной Азии”. Регистрационный номер: 122040800086-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Павлова Н.С. 1989. Секция Леспедеца. — В кн.: Сосудистые растения Дальнего Востока. Т. 4. Л. С. 201–202.
2. Павлова Н.С. 2008. Леспедеца даурская. — В кн.: Красная книга Приморского края. Владивосток. С. 131–133. http://redbookpk.ru/index_plants.html
3. Курбатский В.И. 1994. *Lespedeza* Michaux — Леспедеца. — В кн.: Флора Сибири. Т. 9. Fabaceae (Leguminosae). Новосибирск. С. 216.
4. Kitagawa M. 1979. Neo-Lineamenta Florae Manshuricae: or Enumeration of the Spontaneous Vascular Plants Hither to Known from Manchuria. Vaduz. 715 p.
5. Красная книга Приморского края: Растения. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов. 2008. Владивосток. 688 с. http://redbookpk.ru/index_plants.html
6. Красная книга Амурской области. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов. 2020. Благовещенск. 502 с.
7. Большой энциклопедический словарь лекарственных растений. 2015. СПб. 759 с.
8. Xu B., Niu F., Duan D., Xu W., Huang J. 2012. Root morphological characteristics of *Lespedeza davurica* (L.) intercropped with *Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng under water stress and P application conditions. — Pak. J. Bot. 44(6): 1857–1864. [https://pakbs.org/pjbot/PDFs/44\(6\)/06.pdf](https://pakbs.org/pjbot/PDFs/44(6)/06.pdf)

9. Xu W., Deng X., Xu B., Gao Z., Ding W. 2014. Photosynthetic activity and efficiency of *Bothriochloa ischaemum* and *Lespedeza davurica* in mixtures across growth periods under water stress. — Acta Physiol. Plant. 36(4): 1033–1044. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1481-9>
10. Xu B., Xu W., Wang Z., Chen Z., Palta J.A., Chen Y. 2018. Accumulation of N and P in the legume *Lespedeza davurica* in controlled mixtures with the grass *Bothriochloa ischaemum* under varying water and fertilization conditions. — Front. Plant Sci. 9: 165. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00165>
11. Tong L.R., Song Y., Wang P., Wang J., Ni S.G., Xia F.S. 2021. Pollination biology of *Lespedeza davurica*. — Legum. Res. 44(7): 834–837. <https://doi.org/10.18805/LR-605>
12. Lin D., Ma H., Lu Sh., Feng Ch. 2008. Characteristic of gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in leaves of *Lespedeza davurica*. — In: Proceedings of the XXI International Grassland Congress and VIII International Rangeland Congress. V. 1. Hohhot. P. 216. <http://uknowledge.uky.edu/igc/21/1-5/17>
13. Ying X., Zhao X., Dong K. 2008. Comparison of the production performance between two populations of *Lespedeza davurica*. — In: Proceedings of the XXI International Grassland Congress and VIII International Rangeland Congress. V. 1. P. 250. <http://uknowledge.uky.edu/igc/21/1-6/1>
14. Zhang W.P., Zhao X., Zhang Y., Dong K. 2008. A virtual grows model of the whole structure and dynamics of *Lespedeza dahurica*. — In: Proceedings of the XXI International Grassland Congress and VIII International Rangeland Congress. V. 1. Hohhot. P. 153. <http://uknowledge.uky.edu/igc/21/1-4/4>
15. Chen T., Christensen M., Nan Zh., Hou F. 2017. Effects of grazing intensity on seed size, germination and fungal colonization of *Lespedeza davurica* in a semi-arid grassland of northwest China. — J. Arid Environ. 144: 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2017.04.006>
16. Wang Y., Geng Q., Huang J., Wang Ch., Li L., Hasi M., Niu G. 2021. Effects of nitrogen addition and planting density on the growth and biological nitrogen fixation of *Lespedeza davurica*. — Chin. J. Plant Ecol. 45(1): 13–22. <https://doi.org/10.17521/cjpe.2020.0185>
17. Wang Sh., Liu J., Kang J., Xu B., Chen Y. 2021. Root growth and morphology of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and bush clover (*Lespedeza davurica* Schindl.) in mixed plantation under varying soil water and phosphorus supply conditions. — Pak. J. Bot. 53(4): 1227–1237. [https://doi.org/10.30848/PJB2021-4\(41\)](https://doi.org/10.30848/PJB2021-4(41))
18. Sharma B.R., Rhyu D.Y. 2015. *Lespedeza davurica* (Lax.) Schindl. extract protects against cytokine-induced β -cell damage and streptozotocin-induced diabetes. — Biomed Res. Int. 169256. <https://doi.org/10.1155/2015/169256>
19. Потанина О.Г., Буджапова С., Самылина И.А. 2009. Анатомо-диагностические признаки травы Леспедецы даурской. — Фармация. 6: 29–32. <https://elibrary.ru/item.asp?id=12882657>
20. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. 1985. Справочник по проращиванию покоящихся семян. Л. 506 с.
21. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. — Physiol. Plant. 15(3): 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

In Vitro Introduction of *Lespedeza davurica* (Fabaceae)

T. E. Lonchakova^{a, *}, A. S. Pianova^a, K. S. Berdasova^a

^aBotanical Garden-Institute FEB RAS, Vladivostok, Russia

*e-mail: yashma135@mail.ru

Abstract—Rare species *Lespedeza davurica* (Laxm.) Schindl. (Fabaceae), growing in the Russian Federation, was for the first time introduced into *in vitro* culture. Efficient sterilization protocol was selected: seeds were soaked in sulfuric acid for 25 min, then washed in distilled water 5 times for 30 s, then soaked in 1% silver nitrate solution for 25 min, then in 1% sodium chloride solution for 15 min, and washed in distilled water 3 times for 30 s. The overall seed germination was sufficiently high — 78.8%. It was observed, that cotyledon leaves in most plants appeared by the end of the first week of cultivation, true leaves — by the end of the second week, additional shoots began to form within the first month of cultivation. The resulting culture was propagated under *in vitro* conditions using additional shoots. The effect of thidiazuron at concentrations of 0.5 and 0.1 mL/L was traced. It was shown that Murashige and Skoog medium without growth regulators are suitable for cultivation and micropropagation of the species under study, and when the medium is supplemented with thidiazuron it can be used to obtain more plant material. The results of our study are of interest for the fundamental and applied aspects of the study of *L. davurica*.

Keywords: *Lespedeza davurica*, *in vitro* culture, micropropagation, seed germination, growth regulator thidiazuron, rare species

ACKNOWLEDGMENTS

The study was carried out using unique scientific installation “Collection of *in vitro* live plants of the Botanical Garden-Institute FEB RAS” as part of research topic 122040800086-1: “Introduction to the culture, study and conservation of genetic resources of economically valuable plants of East Asia”.

REFERENCES

1. Pavlova N.S. 1989. *Lespedeza*. — In: Plantae vasculares orientis extremi sovietici. V. 4. Leningrad. P. 201–202. (In Russian).
2. Pavlova N.S. 2008. *Lespedeza davurica*. — In: [Red Book of the Primorsky Territory. Plants. Rare and endangered species of plants and fungi]. Vladivostok. P. 131–133. http://redbookpk.ru/index_plants.html (In Russian)
3. Kurbatskij V.I. 1994. *Lespedeza* Michaux — *Lespedeza*. — In: Flora Sibiriae. V. 9. Fabaceae (Leguminosae). Novosibirsk. P. 216. (In Russian)
4. Kitagawa M. 1979. Neo-Lineamenta Florae Manshuricae: or Enumeration of the Spontaneous Vascular Plants Hitherto Known from Manchuria. Vaduz. 715 p.
5. [Red Book of the Primorsky Territory. Plants. Rare and endangered species of plants and fungi]. 2008. Vladivostok. 688 p. http://redbookpk.ru/index_plants.html (In Russian)
6. [Red book of the Amur region. Rare and endangered species of animals, plants and fungi]. 2020. Blagoveshchensk. 502 p. (In Russian)
7. [Big encyclopedic dictionary of medicinal plants]. 2015. St. Petersburg. 759 p. (In Russian)
8. Xu B., Niu F., Duan D., Xu W., Huang J. 2012. Root morphological characteristics of *Lespedeza davurica* (L.) intercropped with *Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng under water stress and P application conditions. — Pak. J. Bot. 44(6): 1857–1864. [https://pakbs.org/pjbot/PDFs/44\(6\)/06.pdf](https://pakbs.org/pjbot/PDFs/44(6)/06.pdf)
9. Xu W., Deng X., Xu B., Gao Z., Ding W. 2014. Photosynthetic activity and efficiency of *Bothriochloa ischaemum* and *Lespedeza davurica* in mixtures across growth periods under water stress. — Acta Physiol. Plant. 36(4): 1033–1044. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1481-9>
10. Xu B., Xu W., Wang Z., Chen Z., Palta J.A., Chen Y. 2018. Accumulation of N and P in the legume *Lespedeza davurica* in controlled mixtures with the grass *Bothriochloa ischaemum* under varying water and fertilization conditions. — Front. Plant Sci. 9: 165. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00165>
11. Tong L.R., Song Y., Wang P., Wang J., Ni S.G., Xia F.S. 2021. Pollination biology of *Lespedeza davurica*. — Legum. Res. 44(7): 834–837. <https://doi.org/10.18805/LR-605>
12. Lin D., Ma H., Lu Sh., Feng Ch. 2008. Characteristic of gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in leaves of *Lespedeza davurica*. — In: Proceedings of the XXI International Grassland Congress and VIII International Rangeland Congress. V. 1. Hohhot. P. 216. <http://uknowledge.uky.edu/igc/21/1-5/17>
13. Ying X., Zhao X., Dong K. 2008. Comparison of the production performance between two populations of *Lespedeza davurica*. — In: Proceedings of the XXI International Grassland Congress and VIII International Rangeland Congress. V. 1. P. 250. <http://uknowledge.uky.edu/igc/21/1-6/1>
14. Zhang W.P., Zhao X., Zhang Y., Dong K. 2008. A virtual grows model of the whole structure and dynamics of *Lespedeza dahurica*. — In: Proceedings of the XXI International Grassland Congress and VIII International Rangeland Congress. V. 1. Hohhot. P. 153. <http://uknowledge.uky.edu/igc/21/1-4/4>
15. Chen T., Christensen M., Nan Zh., Hou F. 2017. Effects of grazing intensity on seed size, germination and fungal colonization of *Lespedeza davurica* in a semi-arid grassland of northwest China. — J. Arid Environ. 144: 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2017.04.006>
16. Wang Y., Geng Q., Huang J., Wang Ch., Li L., Hasi M., Niu G. 2021. Effects of nitrogen addition and planting density on the growth and biological nitrogen fixation of *Lespedeza davurica*. — Chin. J. Plant Ecol. 45(1): 13–22. <https://doi.org/10.17521/cjpe.2020.0185>
17. Wang Sh., Liu J., Kang J., Xu B., Chen Y. 2021. Root growth and morphology of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and bush clover (*Lespedeza davurica* Schindl.) in mixed plantation under varying soil water and phosphorus supply conditions. — Pak. J. Bot. 53(4): 1227–1237. [https://doi.org/10.30848/PJB2021-4\(41\)](https://doi.org/10.30848/PJB2021-4(41))
18. Sharma B.R., Rhyu D.Y. 2015. *Lespedeza davurica* (Lax.) Schindl. extract protects against cytokine-induced β -cell damage and streptozotocin-induced diabetes. — Biomed Res. Int. A169256. <https://doi.org/10.1155/2015/169256>
19. Potanina O.G., Budazhapova S., Samylina I.A. 2009. The anatomic and diagnostic signs of daurian bush-clover (*Lespedeza davurica*) herb. — Farmaciya. 6: 29–32. <https://elibrary.ru/item.asp?id=12882657> (In Russian)
20. Nikolaeva M.G., Razumova M.V., Gladkova V.N. 1985. [A guide to germinating dormant seeds]. Leningrad. 506 p. (In Russian)
21. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. — Physiol. Plant. 15(3): 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>