

МЕТОДИКА
БОТАНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ
ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

© 2020 г. О. И. Молканова^{1,*}, Ю. Н. Горбунов¹, И. В. Ширнина¹, Д. А. Егорова¹

¹ ФГБУН Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН
ул. Ботаническая, 4, Москва, 127276, Россия

*e-mail: molkanova@mail.ru

Поступила в редакцию 31.10.2019 г.

После доработки 13.01.2020 г.

Принята к публикации 14.01.2020 г.

Создание коллекций редких видов растений *in vitro* является одной из форм охраны растений природной флоры и эффективным методом сохранения генофонда *ex situ*. Впервые обобщены результаты по введению в культуру *in vitro* 82 редких видов растений Красной книги России. Разработаны протоколы клонального микроразмножения, позволяющие получить достаточное количество растений в целях восстановления численности природных популяций и сохранения редких видов растений. Для растений разных жизненных форм определены оптимальные типы эксплантов для длительного сохранения в условиях *in vitro*: для древесных и полудревесных растений – фрагменты побегов, содержащие один–два метанера, для травянистых – почки возобновления, для луковичных растений – микролуковички или их сегменты. Подобраны условия для длительного депонирования. Показана определяющая роль модификаций питательных сред и факторов культивирования для замедленного роста эксплантов исследуемых культур и сохранения их жизнеспособности.

Ключевые слова: охрана редких видов растений, Красная книга РФ, клональное микроразмножение, генетический банк *in vitro*

DOI: 10.31857/S0006813620030072

В настоящее время общее признание получил тот факт, что биологическое разнообразие является основой для поддержания экологических условий существования и экономического развития человеческого общества, следовательно, оно является всемирным достоянием. В то же время угроза сохранению отдельных видов и экосистем еще никогда не была так велика, как сегодня. Причиной этого является рост населения, вырубка лесов, уничтожение естественной среды обитания, высокие темпы развития промышленности, широкое распространение сорных агрессивных видов и интенсивное развитие сельского хозяйства. Природоохранные организации при поддержке Международных агентств и Национальных правительств предпринимают значительные усилия по развитию практических мер по сохранению биоразнообразия. Несмотря на это, число видов, находящихся на грани исчезновения, продолжает расти и значительная часть генетического разнообразия уже потеряна. В настоящее время под угрозу исчезновения поставлено более 60000 видов высших растений, т.е. около четверти общего числа их видов на планете. На XVI Международном ботаническом конгрессе, проходившем в августе 1999 г. в США, подчеркивалось, что если не принять в ближайшее время действенные меры по сохранению видово-

го разнообразия растений, то к середине XXI века могут быть потеряны от 1/3 до 2/3 из 300000 видов растений, обитающих в настоящее время на Земле (Revin, 2000).

Предпочтительным является сохранение редких видов в естественных условиях, но это не всегда возможно. Так, например, лишь около половины видов Красной книги РФ охраняется в природе (заповедниках, заказниках), генофонд другой половины видов федеральной охраны не обеспечен мерами сохранения *in situ* (Andreev, Gorbunov, 2003).

Методы сохранения *ex situ* могут быть использованы в качестве дополнения к мерам *in situ*, а для некоторых видов могут представлять единственно возможный способ их спасения. Важность сохранения генофонда растений *ex situ* получила международное признание включением в 9 статью “Конвенции о биологическом разнообразии” (Konvencija..., 1995) и в 8 цель “Глобальной стратегии сохранения растений” (Globalna..., 2002). В этих документах рекомендуется использовать интегрированный подход для сохранения редких и исчезающих растений, сочетая методы *ex situ* и *in situ*.

Охрана растений в условиях *ex situ* включает в себя сохранение в живых коллекциях и банках се-

мян. Однако и эти способы имеют свои ограничения. Например, в банках семян нельзя сохранять виды, имеющие рекальцитрантные семена, или вегетативно размножающиеся и не образующие семян. Не всегда удается вырастить и сохранять в живых коллекциях виды, характеризующиеся узкой экологической приуроченностью (меловые, болотные растения) или имеющие сложные трофические связи. Для таких видов единственно возможным способом сохранения *ex situ* является разработка технологии размножения и сохранения *in vitro*.

В последние десятилетия методы биотехнологии все шире применяются при охране редких и исчезающих растений (Butenko, 1999; Novikova, 2013; Molkanova et al., 2018). Они позволяют из небольшого количества исходного материала в короткие сроки получить большое число выровненного посадочного материала. Полученные растения можно использовать для пополнения живых коллекций, для реинтродукции и усиления ослабленных природных популяций редких видов.

Создание коллекций растений *in vitro* можно считать одной из форм охраны растений природной флоры и эффективным методом сохранения генофонда *ex situ* (Baranova et al., 2010; Vetchinkina et al., 2012). Согласно Е.Е. Бенсон (Benson et al., 2000) биотехнологические методы сохранения гермоплазмы должны быть интегрированы как дополнительная опция в существующие программы по сохранению биоразнообразия.

При формировании коллекций *in vitro* редких и исчезающих видов растений необходимо проводить строгую идентификацию растительного материала. В паспортные данные исходных образцов вносят информацию о месте сбора, включающую GPS координаты, фотографии места произрастания и сведения об экологических условиях (Reed et al., 2005). При возможности образцы должны быть взяты из разных природных популяций в количестве, достаточном для дальнейшей разработки протоколов сохранения *in vitro* (Vetchinkina et al., 2012; Trifonova et al., 2014). Паспортные данные образцов необходимы для формирования единой базы данных коллекций культур *in vitro*, что позволит не только использовать полученные клоны для пополнения живых коллекций и реинтродукции, но и включать их в программы международного обмена.

Большинство редких видов характеризуются меньшим генетическим разнообразием, чем широко распространенные, и, соответственно, они более подвержены угрозе исчезновения при изменении условий окружающей среды (Hamrick et al., 1996; Altuhov et al., 2004). Знания о генетическом разнообразии видов, очевидно, важны для разработки эффективных программ по их сохранению (Holsinger, 1997; Altuhov et al., 2004). Определить уровень внутри- и межпопуляционного генетического разнообразия и установить попу-

ляционно-генетическую структуру вида позволяют современные молекулярно-генетические методы, поэтому их применение очень важно при изучении редких видов растений и разработке стратегии их сохранения (Trifonova et al., 2014).

Использование современных молекулярно-генетических методов исследования генетической вариабельности не только позволяет контролировать стабильность хранящихся *in vitro* образцов, но также дает возможность для быстрой и точной идентификации видовой подлинности вновь поступающих растений и молекулярного маркирования растений на популяционном уровне (Vetchinkina, 2010).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал для формирования коллекции *in vitro* был получен в результате экспедиционных выездов и непосредственно сбора семян и растений в естественных местах обитания или из обменных фондов ботанических садов, играющих важную роль в поддержании, сохранении и пополнении коллекций.

Подготовку эксплантов и введение их в культуру *in vitro* проводили в стерильных условиях согласно методикам, принятым в лаборатории биотехнологии ГБС РАН (Butenko, 1999; Molkanova, 2009). В качестве исходного материала при введении в культуру *in vitro* были использованы семена или вегетативные части растений. При стерилизации семян и вегетативных частей использовали раствор фунгицида системного действия “Фундазол” в концентрации 2%, экспозиция составляла 30–60 мин и 15–30 мин соответственно. Далее семена и вегетативные части помещали в 70%-й этанол. Для семян экспозиция составляла 2 мин, для вегетативных частей – 0.5–1 мин. В качестве основного стерилизатора использовали 7%-й раствор гипохлорита кальция, экспозиция составляла 1–25 мин. В качестве детергента использовали TWEEN-20.

На стадии микроразмножения использовали питательные среды: Murashige & Skoog, Anderso, Quorin & Lepoivre, Woody Plant Medium, Gamborg & Eleleig.

В качестве регуляторов роста в питательную среду добавляли: 6-бензиламинопурин (BAP) 0.2–12 мг/л, 2-изопентениладенин (2-ip) 1.0–5.0 мг/л и сочетание этих препаратов с 3-индолилуксусной кислотой (IAA) 0.05 мг/л, альфа-нафтилуксусной кислотой (NAA) 0.1 мг/л и гиббереловой кислотой (GA) 0.1–1 мг/л.

Депонирование (до 24 месяцев) проводили на питательных средах MS и 1/2 MS, содержащих ВА (0.1–1 мг/л) и сахарозу (20–60 г/л), при температуре 5–7°C и освещенности 500–1500 лк.

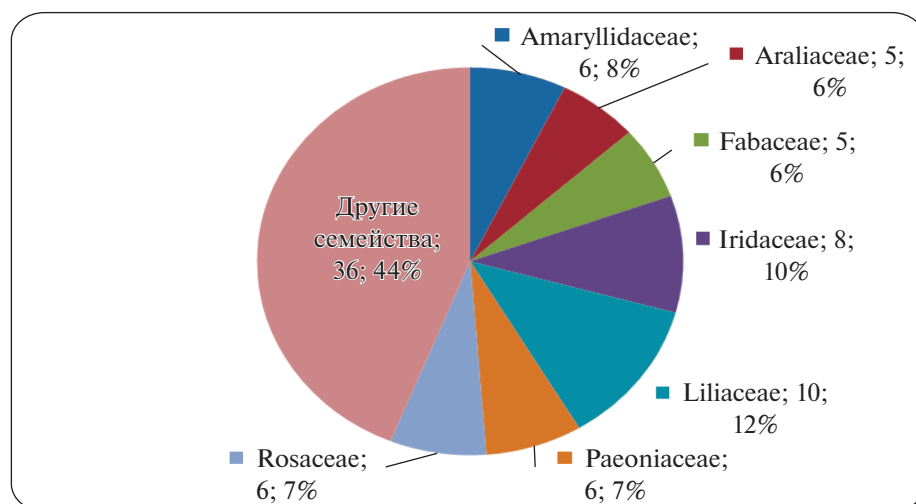


Рис. 1. Таксономический состав коллекции *in vitro* редких и исчезающих видов растений в ГБС РАН.

Fig. 1. Taxonomic composition of *in vitro* collection of rare and endangered plant species in N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of RAS.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Генетический банк *in vitro* в ГБС РАН формировался с 1996 г. и в настоящее время является уникальным и наиболее представительным в России. Он содержит 1310 наименований. Особое внимание уделяется редким и исчезающим видам растений, коллекция которых насчитывает 82 вида, что составляет 17.3% от общего числа покрытосеменных растений Красной книги РФ. 54% коллекции *in vitro* редких и исчезающих видов растений составляют виды 1 и 2 категории редкости, 2 вида относятся к 0 категории. Большинство видов представлено образцами из разных популяций (Vetchinkina et al., 2012).

В ГБС РАН впервые разработаны методики клонального микроразмножения *Gladiolus palustris* Gaudin., имеющего статус 0 (Ex), *Aristolochia manshuriensis* Kom., *Dioscorea caucasica* Lipsky, *Sanguisorba magnifica* I. Schischk. et Kom., *Euonymus nana* Weib. – статус 1(E) (Krasnaya..., 2008).

В коллекции *in vitro* ГБС РАН редких и исчезающих растений России наиболее представлены следующие семейства: Liliaceae (10 видов), Iridaceae (8 видов), Amaryllidaceae (6 видов), Paeoniaceae (6 видов), Rosaceae (6 видов), Araliaceae (5 видов), Fabaceae (5 видов). Большинство видов (90.2% от общего числа) составляют травянистые растения.

Успех введения в культуру *in vitro* во многом зависит от выбора экспланта, эффективности стерилизации и подбора питательных сред. В ходе многочисленных исследований в лаборатории биотехнологии растений ГБС РАН были оптимизированы схемы стерилизации на этапе введения в культуру *in vitro* редких и исчезающих видов растений. В качестве основного стерилизатора использовали 7%-й раствор гипохлорита кальция.

Семена помещались в раствор на 7–20 мин, вегетативные части – на 3–7 мин соответственно. Время экспозиции зависит от физиологической зрелости экспланта.

Нередко трудностью для получения стерильной культуры и дальнейшего успешного культивирования является побурение тканей первичных эксплантов и питательных сред за счет экссудации фенольных соединений. Среди изученных представителей родов *Aralia*, *Dioscorea*, *Paeonia*, *Pulsatilla* часто встречались виды растений, отличающиеся повышенным синтезом вторичных метаболитов, приводящим к снижению жизнеспособности или гибели растений-регенерантов. Целесообразно для снижения отрицательного воздействия полифенолов на развитие эксплантов на этапе собственно микроразмножения в качестве антиоксидантов добавлять в питательную среду аскорбиновую кислоту в концентрации 50–100 мг/л, глицин (4 мг/л), поливинилпирролидон (5000 мг/л), снижать освещенность до 500 лк и уменьшать период беспересадочного культивирования в 2 раза.

Помимо этого, рекомендуется добавлять в состав питательной среды активированный уголь в концентрации 100 мг/л, так как он способствует абсорбции продуктов метаболизма (Vetchinkina et al., 2012).

В экспериментальной работе с семенами многих редких видов возникает такая проблема, как покой семян. В большинстве случаев метод культивирования *in vitro* позволяет значительно сократить срок выведения семян из покоя и оптимизировать семенное размножение. Необходимо изучать биологию семян (тип покоя, гетероспермия, жизнеспособность, сезонные колебания в ритмах прорастания и т. д.) и другие харак-

Таблица 1. Типы покоя семян у представителей различных родов растений
Table 1. Seed dormancy types of representatives of various of plants genera

Тип покоя семян Type of seed dormancy		Представители родов Representatives of genera
Экзогенный/Exogenous	физический/physical	<i>Iris, Medicago</i>
Эндогенный Endogenous	морфологический/morphological	<i>Allium, Crocus</i>
	физиологический неглубокий/physiological superficial	<i>Dioscorea, Betula, Globularia, Sanguisorba</i>
	физиологический промежуточный/physiological intermediate	<i>Atropa</i>
	физиологический глубокий/physiological deep	<i>Staphylea, Acer, Ostrya</i>
	морфофизиологический простой неглубокий/ morphophysiological simple superficial	<i>Papaver, Scilla</i>
	морфофизиологический простой глубокий/ morphophysiological simple deep	<i>Bellevallia, Kalopanax</i>
	морфофизиологический глубокий эпикотильный/ morphophysiological deep epicotyl	<i>Paeonia, Cordiocrinum</i>
	морфофизиологический сложный промежуточный/ morphophysiological complex intermediate	<i>Aralia, Panax, Pulsatilla, Tulipa</i>
морфофизиологический сложный глубокий/ morphophysiological complex deep	<i>Fritillaria</i>	
Комбинированный Combined	различные сочетания экзо- и эндогенного типов покоя/ various combinations of exo- and endogenous types of dormacy	<i>Cotoneaster, Colchicum, Aristolochia</i>

теристики размножаемых видов (жизненная форма, преобладающий способ размножения, устойчивость в культуре и др.) (табл. 1).

В ходе исследований для ряда таксонов определены оптимальные режимы стратификации, позволяющие получать жизнеспособные проростки. Так, для проращивания семян *Globularia punctata* Ларег., *Matthiola fragrans* Bunge, *Papaver bracteatum* Lindl., *Iris pumila* L., *Allium regelianum* A. Beck. достаточно использование теплой стратификации (1–1.5 месяца при температуре 20–25°C). Сочетание теплой и холодной стратификации (1–1.5 месяца при 20–25°C и 3–4 месяца при 3–5°C) необходимо для *Bellevalia sarmatica* (Georgi) Woronow, *Belamcanda chinensis* (L.) DC., *Dioscorea caucasica* Lipsky. Наиболее сложные схемы стратификации необходимы для прорастания таких видов, как *Tulipa tarda* Stapf, *Iris acutiloba* С.А. Mey., *Pulsatilla vernalis* (L.) Mill. (1–1.5 месяца при температуре 20–25°C, 3–4 месяца при 3–5°C, 1–2 месяца при 20–25°C), а также видов рода *Fritillaria* L. (1–1.5 месяца при температуре 20–25°C, 3–4 месяца при 3–5°C, 1–2 месяца при 20–25°C, 3–4 месяца при 3–5 °C). Самым длительным периодом прорастания (около 30–40 суток) характеризуются семена *Atropa bella-donna* L., *Pulsatilla vernalis*, *Hyssopus cretaceus* Dubjan.

Использование семян при клональном микро-размножении имеет ряд особенностей. Например, семена *Iris pumila* и *Belamcanda chinensis* требуют культивирования на среде с добавлением 1 мг/л гиббереловой кислоты(GA). Кроме того,

использовали несколько способов предобработки семян: замачивание в растворе GA в концентрации 1 и 10 мг/л в течение суток, холодная стратификация в течение 1 и 3 месяцев. В то же время семена видов рода *Fritillaria* культивируют на безгормональной питательной среде и питательных средах с добавлением 1 мг/л BA и 1 мг/л GA в течение 2-этапной стратификации: 5–7 недель при температуре 20–22°C, 2–9–12 недель при температуре 3–5°C. Использование культуры изолированных зародышей позволяет частично или полностью снять необходимость стратификации и соответственно сократить период прорастания семян (Vetchinkina, 2010).

Растения, относящиеся к разным таксонам, различаются уровнем тотипотентности клеток и регенерационным потенциалом. Это обуславливает необходимость дифференцированного подхода к разработке методик клонального микро-размножения для различных таксонов. При выборе стратегии сохранения *in vitro* каждого вида необходимо учитывать его биологические особенности. Поскольку основной целью при длительном депонировании является сохранение гермоплазмы и поддержание ее в стабильном состоянии были выбраны методы микро-размножения, минимизирующие риск соматических вариаций (Molkanova et al., 2018). К числу таких технологий относится, прежде всего, метод активации уже существующих меристем, который считается надежным в плане генетической

Таблица 2. Рекомендуемый состав питательных сред на этапе собственно размножения и продолжительность периода длительного беспересадочного выращивания редких и исчезающих видов растений в коллекции *in vitro* ГБС РАН

Table 2. Recommended composition of nutrient medium at the propagation stage and subculture period duration of rare and endangered plant species in *in vitro* collection of N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of RAS

Семейство Family	Вид Species	Минеральная основа Mineral base	Регулятор роста Plant growth regulator	Концентрация фитогормона, мг/л Phytohormone concentration, mg/l	Длительность беспересадочного выращивания, сут. Duration of continuous cultivation, day
Alliaceae	<i>Allium grande</i> Lipsky <i>A. regelianum</i> A. Beck.	1/2 MS, MS	2-ip	1.0–3.0	45–60
Amaryllidaceae	<i>Galanthus angustifolius</i> G. Koss <i>G. caucasicus</i> (Baker) Grossh. <i>G. lagodechianus</i> Kem.-Nath. <i>G. plicatus</i> Bieb. <i>G. woronowii</i> Losinsk. <i>Leucojum aestivum</i> L.	MS	BA; NAA	10.0 0.1	30–45
Araliaceae	<i>Aralia continentalis</i> Kitag. <i>A. cordata</i> Thunb. <i>Kalopanax septemlobus</i> (Thunb.) Koidz. <i>Oplopanax elatus</i> (Nakai) Nakai <i>Panax ginseng</i> C.A. Mey.	MS; QL	BA; IAA	1.0 0.05	30–45
Aristolochiaceae	<i>Aristolochia manshuriensis</i> Kom.	MS; QL	BA; IAA	0.8 0.05	30–45
Asteraceae	<i>Artemisia salsoloides</i> Willd. <i>Jurinea cretacea</i> Bunge	MS	BA	0.2–0.5	30
Berberidaceae	<i>Epimedium colchicum</i> (Boiss.) Trautv. <i>E. koreanum</i> Nakai	B5	2-ip	0.5	30–40
Betulaceae	<i>Betula schmidtii</i> Regel	WPM; B5	BA; NAA; GA	1.5 0.1 0.2	40–50
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Crambe cordifolia</i> Stev. <i>Lepidium meyeri</i> Claus <i>Matthiola fragrans</i> Bunge	1/2 MS	BA	0.1	15–30
Campanulaceae	<i>Campanula besenginica</i> Fomin	MS	BA; IAA	0.5 0.05	25–30
Caprifoliaceae	<i>Lonicera etrusca</i> Santi <i>L. tolmachevii</i> Pojark.	QL	BA	0.8	30–40
Caryophyllaceae	<i>Silene cretacea</i> Fisch. ex Spreng. <i>S. hellmannii</i> Claus	1/2 MS	BA	0.2	25–30
Celastraceae	<i>Euonymus nana</i> Bieb.	MS	BA	1.0	30–45
Crassulaceae	<i>Rhodiola rosea</i> L.	1/2 MS, MS	2-ip	0.5–1.0	45–60
Dioscoreaceae	<i>Dioscorea caucasica</i> Lipsky <i>D. nipponica</i> Makino	MS	2-ip	1.0	30–45
Ericaceae	<i>Rhododendron fauriei</i> Franch. <i>R. schlippenbachii</i> Maxim.	Anderson	2-ip; IAA	5.0 1.0	40–60
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Calophaca wolgarica</i> (L. fil.) DC. <i>Genista tanaitica</i> P.A. Smirn. <i>Hedysarum cretaceum</i> Fisch. <i>H. grandiflorum</i> Pall. <i>H. razoumovianum</i> Fisch. et Helm	1/2 MS	BA	0.1	15
Globulariaceae	<i>Globularia punctata</i> Lapeyr.	1/2 MS	2-ip; BA	0.5	30–45

Семейство Family	Вид Species	Минераль- ная основа Mineral base	Регулятор роста Plant growth regulator	Концентрация фитогормона, мг/л Phytohormone concentration, mg/l	Длительность беспересадочного выращивания, сут. Duration of continuous cultivation, day
Hyacinthaceae	<i>Bellevallia sarmatica</i> (Georgi) Woronow <i>Muscari dolichanthum</i> Woronow et Tron <i>Scilla scilloides</i> (Lindl.) Druce	MS	BA; NAA	10.0 0.1	30–45
Hydrangeaceae	<i>Deutzia glabrata</i> Kom. <i>Hydrangea petiolaris</i> Siebold et Zucc.	QL	BA; IAA	0.5 0.1	40–50
Iridaceae	<i>Belamcanda chinensis</i> (L.) DC. <i>Gladiolus palustris</i> Gaudin <i>Iris acutiloba</i> C.A. Mey. <i>I. aphylla</i> L. <i>I. ensata</i> Thunb. <i>I. notha</i> Bieb. <i>I. pumila</i> L. s. l. <i>I. scariosa</i> Willd. ex Link	MS	BA; IAA	12.0 0.1	40–50
Lamiaceae	<i>Hyssopus cretaceus</i> Dubjan.	1/2 MS	2-ip	0.5	15–30
Liliaceae	<i>Cardiocrinum cordatum</i> (Thunb.) Makino <i>Fritillaria caucasica</i> Adams <i>F. meleagris</i> L. <i>F. ruthenica</i> Wikstr. <i>Lilium callosum</i> Siebold et Zucc. <i>L. caasicum</i> (Misch. ex Grossh.) Grossh. <i>L. cernuum</i> Kom. <i>L. lancifolium</i> Thunb. <i>Tulipa lipskyi</i> Grossh. <i>T. schrenkii</i> Regel	MS	BA; NAA	5.0 0.1	45–60
Melanthiaceae (Colchicaceae)	<i>Bulbocodium versicolor</i> (Ker-Gawl.) Spreng.	MS	BA; NAA	6.0–10.0 0.1	45–90
Paeoniaceae	<i>Paeonia caucasica</i> (Schipcz.) Schipcz. <i>P. lactiflora</i> Pall. <i>P. obovata</i> Maxim. <i>P. oreogeton</i> S. Moore <i>P. tenuifolia</i> L. <i>P. wittmanniana</i> Hartwiss ex Lindl.	MS	BA	0.1	40–60
Papaveraceae	<i>Glaucium flavum</i> Crantz <i>Papaver lisae</i> N. Busch	1/2 MS	BA	0.2	25–30
Primulaceae	<i>Cyclamen coum</i> Mill. subsp. <i>caucasicum</i> (C. Koch) O. Schwarz <i>Primula juliae</i> Kusn.	1/2 MS	BA	0.1	20–30
Rosaceae	<i>Amygdalus pedunculata</i> Pall. <i>Armeniaca mandshurica</i> (Maxim.) B. Skvortsov <i>Cotoneaster lucidus</i> Schltr. <i>Potentilla vulgarica</i> Juz. <i>Prinsepia sinensis</i> (Oliv.) Bean <i>Sanguisorba magnifica</i> I. Schischk. et Kom.	MS; QL	BA; IAA	0.5 0.01	20–35
Solanaceae	<i>Atropa bella-donna</i> L.	MS	BA	0.3	25–30

стабильности полученных регенерантов (Butenko, 1999; Rani, 2000; Molkanova et al., 2016).

Для каждой жизненной формы характерна, в частности своя активность верхушечной меристемы в онтогенезе и сроки перехода растения от вегетативного состояния к репродуктивному (Rostovceva, 1963). Для успешной регенерации меристем большинства исследованных таксонов необходимо наличие изолированного апекса с 2–3 листовыми примордиями.

Следующий этап после успешной инициации культур *in vitro* – это индукция побегообразования и собственно размножение. Успех применения любого метода определяется изучением условий, необходимых для его реализации. Это является важным для культуры изолированных органов, тканей и клеток, которые очень чувствительны к малейшим изменениям внешних условий. Для определения оптимальных условий культивирования и управления морфогенезом того или иного объекта *in vitro*, необходимо оценить морфогенетический потенциал культивируемых тканей и определить факторы, влияющие на эффективность регенерации.

Основные факторы, определяющие процесс органогенеза: эпигенетические характеристики клеток экспланта, физиологическое состояние интактных растений, сроки изоляции экспланта, состав питательной среды и условия культивирования (Molkanova, 2009).

Тканевая принадлежность эксплантов, использованных для получения культуры тканей различных видов в значительной степени определяют морфогенетический потенциал формирующихся регенерантов. Экспланты из разных органов одного вида существенно различались по способности к регенерации в условиях *in vitro*. Результаты сравнительного анализа морфологических процессов у *Aristolochia manshuriensis in vitro* показали, что при использовании апикальной меристемы почек развитие *de novo* зачатков аксиллярных побегов, а впоследствии и растений-регенерантов, происходило более интенсивно по сравнению с использованием апикальной меристемы из проростков (Molkanova, Egorova, 2017).

Экспланты, взятые с молодых растений *A. manshuriensis* (не старше 4–6 лет), характеризовались более высокой способностью к образованию побегов по сравнению с растениями, достигшими 12 лет. С увеличением возраста интактного растения *A. manshuriensis* жизнеспособность и органогенный потенциал меристемных комплексов *in vitro* резко падает, что согласуется с данными, полученными для представителей семейств Oleaceae, Rosaceae, Actinidiaceae (Molkanova, 2018).

Известно, что одним из существенных факторов, влияющих на поддержание устойчивой пролиферирующей культуры, является состав питательной среды.

Для оптимизации стадии размножения используют различные питательные среды, подбирают комбинации и концентрации регуляторов роста. В ходе исследований для модельных видов редких и исчезающих растений установлены оптимальные тип и концентрации фитогормонов, а также длительность беспересадочного выращивания (табл. 2).

Темпы развития эксплантов при культивировании разных видов существенно различаются. Выявлено, что регенерационная способность даже в пределах одного рода в культуре *in vitro* обусловлена видовыми особенностями и носит индивидуальный характер. Например, процесс выращивания из семян до взрослых особей длительный и занимает от 2–3 лет (например, *Lilium regale*) до 6–8 (например, *L. martagon*), в культуре *in vitro* этот период для *L. martagon* сокращается до 6 месяцев (Mamaeva, 2008).

Одним из эффективных способов сохранения генофонда растений является культивирование регенерантов в условиях замедленного роста. Хранение в условиях замедленного роста позволяет поддерживать биологический материал от нескольких месяцев до 2–3 лет без пересадки на питательную среду в зависимости от используемой технологии и вида растения (Cruz-Cruz et al., 2013). Замедление роста достигается за счет модификации сред или условий культивирования. Модификации сред включают снижение минеральной основы, содержания углеводов, изменение концентраций или подбор комбинаций регуляторов роста, добавление осмотически активных веществ, а также снижение температуры и интенсивности освещения (Molkanova et al., 2016). Сроки и специфика условий хранения растительного материала определяются биологическими особенностями таксонов. В процессе исследований показано, что совместное использование интенсивности освещения, состава питательной среды, концентрации осмотиков и ретардантов значительно увеличивало как беспересадочный период, так и жизнеспособность эксплантов в процессе хранения *in vitro*. Оптимальными условиями сохранения для большинства изученных редких и исчезающих видов являются: питательная среда, содержащая 1/2 MS, дополненная 0.3 мг/л ВАР, пониженная температура (3–7°C) и слабая освещенность (500 лк) (Vetchinkina et al., 2012; Novikova, 2013).

Для растений разных жизненных форм на основе комплекса показателей определены оптимальные типы эксплантов для длительного сохранения в условиях *in vitro*. Для древесных и полудревесных растений – это фрагменты побегов, содержащие один-два метамера, для травянистых – почки возобновления. Для луковичных растений (представители семейств Alliaceae, Amarilidaceae, Hyacinthaceae, Liliaceae) – пазушные луковички или их сегменты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в настоящей статье материалы основаны на многолетнем опыте работы и направлены на то, чтобы раскрыть возможности биотехнологии в области сохранения редких и исчезающих видов растений.

Применение комплексного подхода к сохранению растений *ex situ*, когда редкие и исчезающие таксоны содержатся в дублирующих коллекциях (банках семян, живых коллекциях, банках культур *in vitro*), существенно повышает надежность сохранности генофонда. В ГБС РАН сформирована и сохраняется коллекция *in vitro* из 82 видов, что составляет 17.3% от общего числа покрытосеменных растений Красной книги РФ. 54% коллекции *in vitro* редких и исчезающих видов растений составляют виды 1 и 2 категории редкости, 2 вида относятся к 0 категории.

В каждом случае при выборе стратегии сохранения таксона *in vitro* необходимо учитывать его биологические особенности, оценивать возможность используемых подходов. При формировании коллекций *in vitro* необходимо обеспечивать представительность вида максимально возможным количеством образцов, происходящих из различных точек ареала.

Разработаны общие рекомендации на этапах введения в культуру *in vitro* исходного материала, собственно микроразмножения, укоренения и депонирования. При этом следует учитывать, что каждый вид имеет свои особенности при размножении *in vitro*. С учетом этих особенностей необходимо разрабатывать индивидуальные технологии клонального микроразмножения.

Биотехнологические методы позволяют с использованием небольшого количества исходного материала в короткие сроки получить большое число выровненного посадочного материала. Полученные растения можно использовать для пополнения живых коллекций, реинтродукции и усиления ослабленных природных популяций редких видов.

Особое внимание следует уделять выбору объектов для включения в состав коллекций *in vitro*. В первую очередь в национальном масштабе нужно выделить виды 1 и 2 категорий Красной книги Российской Федерации не обеспеченные мерами охраны *in situ*. Следует выделять также таксоны со сложными трофическими связями и характеризующиеся узкой экологической амплитудой.

Актуальной задачей является объединение существующих в РФ банков *in vitro* растений в единую сеть, работающую по единой программе. Это позволит избежать дублирования в работе и наладить обмен опытом и растительным материалом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ГБС РАН (№1 18021490111-5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[Altuhov et al.] Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Курбатова О.Л., Политов Д.В., Евсюков А.Н., Жукова О.В., Захаров И.А., Моисеева И.Г., Столповский Ю.А., Пухальский В.А., Поморцев А.А., Упельник В.П., Калабушкин Б.А. 2004. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. М. 620 с.

[Andreev, Gorbunov] Андреев Л.Н., Горбунов Ю.Н. 2003. Роль ботанических садов России в сохранении биологического разнообразия растений. — В сб.: Биологическое разнообразие. Интродукция растений: Материалы 3-й Междунар. науч. конф. СПб. С. 5–7.

[Baranova et al.] Баранова О.Г., Дедюхина О.Н., Яговкина О.В. 2010. Стратегия создания и сохранения коллекционного фонда редких и исчезающих растений в Ботаническом саду Удмуртского университета. — Вестн. Удм. ун-та. Сер. Биология. Науки о Земле. 2: 48–54.

Benson E.E., Danaher J.E., Pimbley I.M. et al. 2000. *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant. — Biodivers. Conserv. 9: 711–726. <https://doi.org/10.1023/A:1008941726419>

[Butenko] Бутенко Р.Г. 1999. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М. 160 с.

Cruz-Cruz C.A., Gonzalez-Arno M.T., Engelmann F. 2013. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. — Resources. 2: 73–95. <https://doi.org/10.3390/resources2020073>

[Globalnaya...] Глобальная стратегия сохранения растений. 2002. М. 16 с.

Hamrick J.L., Godt M.J.W. Philosophical Transactions: Biological Sciences. 1996. — Plant Life Histories: Ecological Correlates and Phylogenetic Constraints. 351. 1345: 1291–1298.

Holsinger K.E., Vitt P. 1997. The future of conservation biology: What's a geneticist to do? The ecological basis of conservation: Heterogeneity, ecosystems and biodiversity. New York. P. 202–206.

[Ishmuratova, Tkachenko] Ишмуратова М.М., Ткаченко К.Г. 2009. Семена травянистых растений: особенности латентного периода, использование в интродукции и размножении *in vitro*. Уфа. 115 с.

[Konvencija] Конвенция о биологическом разнообразии. 1995. UNEP/CBD. 34 с.

[Krasnaya...] Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). 2008. М. 855 с.

[Mamaeva] Мамаева Н.А. 2008. Сравнительный анализ морфологических и биологических признаков сортов садовых Бородатых ирисов: секция *Iris* рода *Iris* L.: Дис. ... канд. биол. наук. М. 152 с.

[Molkanova et al.] Молканова О.И., Коновалова Л.Н., Стахеева Т.С. 2016. Особенности размножения и сохранения коллекции ценных и редких видов растений в условиях *in vitro*. — Бюллетень Никитского бот. сада. 120: 17–23.

[Molkanova] Молканова О.И. 2009. Генетические банки растений в ботанических садах России. — Сборник научных трудов Никитского бот. сада. Ялта. 131. С. 22–27.

[Molkanova, Egorova] Молканова О.И., Егорова Д.А. 2017. Некоторые аспекты культивирования *in vitro*

- Aristolochia manshuriensis* Kom. — Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о Земле. 27 (2): 151–157.
- [Molkanova et al.] Molkanova O.I., Egorova D.A., Mitrofanova I.V. 2018. Preservation characteristics of valuable plant species in *in vitro* genebanks at Russian botanical gardens. — *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 54: 546–547. . <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9929-7>
- [Molkanova et al.] Molkanova O.I., Shirnina I.V., Mitrofanova I.V. 2018. Conservation and micropropagation of rare and endemic species in gene pool collections of the Russian Federation. — *J. Biotechnol.* V. (280): S83–S84. <https://doi.org/10.1016/j.biotech.2018.06.274>
- [Novikova] Новикова Т.И. 2013. Использование биотехнологических подходов для сохранения биоразнообразия растений. — *Растительный мир Азиатской России.* 2 (12): 119–128. <https://doi.org/10.1007/BF00232274>
- Rani V., Raina S.N. 2000. Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: A critical reappraisal. — *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 36: 319–330. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0059-6>
- Reed B.M., Engelmann F., Dulloo E., Engels J.M.M. 2004. Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 7. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 105 p.
- [Revin] Ревин П. Речь на XVI Международном ботаническом конгрессе. 2000. — *Информ. бюлл. Совета ботанических садов России и Отделения Международного совета по охране растений.* 11: 38–47.
- [Rostovceva] Ростовцева З.П. 1963. Верхушечная меристема высших растений. М. 59 с.
- [Tihonova] Тихонова В.Л. 1999. Сохранение генофонда дикорастущих растений в банках семян. — В сб.: Семя: тез. Междунар. науч.-практ. конф. 14–16 дек. М. С. 111–113.
- [Trifonova et al.] Трифонова А.А., Кочиева Е.З., Кудрявцев А.М. 2014. Анализ генетического разнообразия редкого и эндемичного вида *Allium regelianum* на основе данных NSB-профайлинга. — В сб.: Материалы VII Международной научно-практической конференции “Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)”. Ялта. 192 с.
- [Vetchinkina et al.] Ветчинкина Е.М., Ширнина И.В., Ширнин С.Ю., Молканова О.И. 2012. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro*. — *Вестн. Балт. гос. ун-та им. И. Канта.* 7: 109–118.
- [Vetchinkina] Ветчинкина Е.М. 2010. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений: Дис. ... канд. биол. наук. М. 170 с.

USE OF BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR CONSERVATION OF GENE POOL OF RARE PLANT SPECIES

O. I. Molkanova^{a, #}, Y. N. Gorbunov^a, I. V. Shirnina^a, and D. A. Egorova^a

^a N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of Russian Academy of Sciences
Botanicheskaya Str., 4, Moscow, 127276, Russia

[#]e-mail: molkanova@mail.ru

The creation of *in vitro* collections of rare plant species is one of the forms of natural flora protection and the effective method of *ex situ* conservation of their gene pool. For the first time, the results of introducing of 82 rare plant species listed in the Red Data Book of Russia into *in vitro* culture are summarized. The protocols of clonal micropropagation were developed, they allow obtaining a sufficient number of plants in order to restore natural population levels and preserve rare plant species. The types of explants for different plant life-forms were determined: shoot fragments containing one or two metameres for woody and semi-woody plants, renewal buds for herbaceous plants, bulbils or their segments for bulbous plants. The conditions for long-term deposition were selected. The determining role of nutrient media modifications and cultivation factors for stunted growth of the studied cultures explants and preservation of their viability is shown.

Keywords: protection of rare plant species, Red Data Book of Russia, clonal micropropagation, gene pool *in vitro*

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was carried out in accordance to Institutional research project of N.V. Tsitsin Main Botanical Garden (№118021490111-5).

REFERENCES

- [Altukhov et al.] Altukhov Yu.P., Salmenkova E.A., Kurbatova O.L., Politov D.V., Evsyukov A.N., Zhukova O.V., Zakharov I.A., Moiseeva I.G., Stolpovskii Yu.A., Puhalskii V.A., Pomorcev A.A., Upelnik V.P., Kalabushkin B.A. 2004. Dinamika populatsionnykh genofondov pri antropogennykh vozdeistviyakh [Dynamics of population gene pools under anthropogenic impacts]. Moscow. 620 p. (In Russ.).
- [Andreev, Gorbunov] Andreev L.N., Gorbunov Y.N. 2003. Rol' botanicheskikh sadov Rossii v sokhranении biologicheskogo raznoobraziya rastenii [Role of Russian botanical gardens in the conservation of biological diversity of plants]. — In: *Biologicheskoye raznoobraziye*.

- Introdukciya rastenii: Materialy 3-j Mezhdunar. nauch. konf. St.Petersburg. P. 5–7 (In Russ.).
- [Baranova O.G., Dedyukhina O.N., Yagovkina O.V. 2010. Strategiya sozdaniya i sohraneniya kollekcionnogo fonda redkikh i ischezayushchikh rastenii v Botanicheskom sadu Udmurtskogo universiteta [Strategy of creation and conservation of collection fund of rare and vanishing plant species in the botanical garden of Udmurt university]. – Vestn. Udm. un-ta.Ser. Biologiya. Nauki o Zemle. 2: 48–54 (In Russ.).
- Benson E.E., Danaher J.E., Pimbley I.M. et al. 2000. In vitro micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant. – Biodivers, Conserv. 9: 711–726. <https://doi.org/10.1023/A:1008941726419>
- [Butenko] Butenko R.G. 1999. Biologiya kletok vysshikh rastenii in vitro i biotekhnologiya na ih osnove [In vitro cells biology of higher plants and biotechnology based on them]. Moscow. 160 p. (In Russ.).
- Cruz-Cruz C.A., Gonzalez-Arno M.T., Engelmann F. 2013. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. – Resources. 2: 73–95. <https://doi.org/10.3390/resources2020073>
- [Globalnaya...] Globalnaya strategiya sokhraneniya rastenii [Global Strategy for Plant Conservation]. 2002. Moscow. 16 p. (In Russ.).
- Hamrick J.L., Godt M.J.W. Philosophical Transactions: Biological Sciences. 1996. – Plant Life Histories: Ecological Correlates and Phylogenetic Constraints. 351. 1345: 1291–1298.
- Holsinger K.E., Vitt P. 1997. The future of conservation biology: What’s a geneticist to do? The ecological basis of conservation: Heterogeneity, ecosystems and biodiversity. New York. P. 202–206.
- [Ishmuratova, Tkachenko] Ishmuratova M.M., Tkachenko K.G. 2009. Semena travyanistyx rastenii: osobennosti latentnogo perioda, ispolzovanie v introdukcii i razmnozhenii *in vitro* [Seeds of herbaceous plants: features of the latent period, the use of the introduction and propagation *in vitro*]. Ufa. 115 p. (In Russ.).
- [Konventsiya] Konventsiya o biologicheskom raznoobrazii [Convention on biological diversity]. 1995. UN-EP/CBD. 34 p. (In Russ.).
- [Krasnaya...] Krasnaya kniga Rossiiskoi Federatsii (rasteniya i griby). 2008. Moscow. 855 p. (In Russ.).
- [Mamaeva] Mamaeva N.A. 2008. Sravnitelnyi analiz morfologicheskikh i biologicheskikh priznakov sortov sadovykh Borodatykh irisov: sektsiya *Iris* roda *Iris* L. [Comparative analysis of morphological and biological characteristics of varieties of garden Bearded irises: section *Iris* genus *Iris* L.]: dis. ... cand. biol. sciences. Moscow. 152 p. (In Russ.).
- [Molkanova] Molkanova O.I. 2009. Geneticheskie banki rastenii v botanicheskikh sadakh Rossii [Plants genetic banks in the botanical gardens of Russia]. – Sbornik nauchnykh trudov Nikit.botan. sada. Yalta. 131. P. 22–27 (In Russ.).
- [Molkanova et al.] Molkanova O.I., Konovalova L.N., Stakhcheva T.S. 2016. Osobennosti razmnozheniya i sohraneniya kollektsiy cennykh i redkikh vidov rastenii v usloviyakh *in vitro* [Features of reproduction and preservation of rare and valuable species collection under conditions in vitro]. – Byulleten’ Nikitskogo botanicheskogo sada. 120: 17–23 (In Russ.).
- [Molkanova, Egorova] Molkanova O.I., Egorova D.A. 2017. Nekotorye aspekty kultivirovaniya *in vitro* *Aristolochia manshuriensis* Kom. – Vestnik Udmurtskogo universiteta. 27 (2): 151–157 (In Russ.).
- [Molkanova et al.] Molkanova O.I., Egorova D.A., Mitrofanova I.V. 2018. Preservation characteristics of valuable plant species *in vitro* genebanks at russian botanical gardens. – In Vitro Cell. Devel. Biol. 54: 546–547. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9929-7>.
- [Molkanova et al.] Molkanova O.I., Shirnina I.V., Mitrofanova I.V. 2018. Conservation and micropropagation of rare and endemic species in genepool collections of the Russian Federation. – J. Biotechnol. 280: S83–S84. <https://doi.org/10.1016/j.biotech.2018.06.274>
- [Novikova] Novikova T.I. 2013. Ispol’zovanie biotekhnologicheskikh podkhodov dlya sokhraneniya bioraznobraziya rastenii [The use of biotechnological approaches for the conservation of plant diversity]. – Rastitel’nyi mir Aziatskoi Rossii. 2 (12): 119–128 (In Russ.).
- Rani V., Raina S.N. 2000. Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: A critical reappraisal. – In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 36: 319–330. <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-000-0059-6>
- Reed B.M., Engelmann F., Dulloo E., Engels J.M.M. 2004. Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 7. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 105 p.
- [Revin] Revin P. Rech’ na XVI Mezhdunarodnom botanicheskom kongresse [Speech at the 16th International Botanical Congress]. 2000. – Inform. byull. Soveta botanicheskikh sadov Rossii i Otdeleniya Mezhdunarodnogo soveta po ohrane rasteni. 11: 38–47 (In Russ.).
- [Rostovtseva] Rostovtseva Z.P. 1963. Verkhushchnaya meristema vysshikh rasteni [The apical meristem of higher plants.]. M. 59 p. (In Russ.).
- [Tikhonova] Tikhonova V.L. 1999. Sokhranenie genofonda dikorastushchikh rasteni v bankakh semyan [Preservation of wild plants gene pool in seed banks]. – In: Semya: tez. mezhdunar. nauch.-prakt. konf. 14–16 dek. Moscow. P. 111–113 (In Russ.).
- [Trifonova et al.] Trifonova A.A. Kochieva E.Z. Kudryavtsev A.M. 2014. Analiz geneticheskogo razno-obraziya redkogo i endemichnogo vida *Allium regelianum* na osnove dannykh NSB-proflayninga [Analysis of genetic diversity of rare and endemic *Allium regelianum* species based on NSB-proflayninga data.]. – In: Materialy VII Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferencii “Biotekhnologiya kak instrument sokhraneniya bioraznobraziya rastitel’nogo mira (fiziologo-biokhimicheskie, embriologicheskie, geneticheskie i pravovye aspekty)”. Yalta. 192 p. (In Russ.).
- [Vetchinkina] Vetchinkina E.M. 2010. Biologicheskie osobennosti kultivirovaniya *in vitro* semyan i zarodyshei redkikh vidov rasteni [Biological features of in vitro embryos and seeds cultivation of rare plant species]: dis. ... cand. biol. sciences. Moscow. 170 p. (In Russ.).
- [Vetchinkina et al.] Vetchinkina E.M., Shirnina I.V., Shirnina S.Y., Molkanova O.I. 2012. Sokhranenie redkikh vidov rastenii v geneticheskikh kollektsiyakh *in vitro* [Conservation of rare plant species in the genetic collections *in vitro*]. – Vestn. Balt. gos. un-ta im. I. Kanta. 7: 109–118 (In Russ.).