

*Е. М. Ветчинкина, И. В. Ширнина,  
С. Ю. Ширнин, О. И. Молканова*

## **СОХРАНЕНИЕ РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ В ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОЛЛЕКЦИЯХ *IN VITRO***

*Наряду с традиционными способами сохранения растений *ex situ* все большее значение приобретает использование для этой цели генетических банков *in vitro*. Разрабатываются научные основы формирования и методологические аспекты сохранения генетических банков семян и меристем редких и ценных растений. При создании таких банков особое внимание уделяется репрезентативности и сохранению генетической стабильности видов растений. Значительная часть растительного материала хранится в условиях замедленного роста.*

*Alongside the traditional *ex situ* plant conservation methods, the creation of gene banks *in vitro* is increasing in importance. The research and methodological framework for the creation and conservation of rare and valuable plant seed and meristem gene banks is being developed. In the creation of gene*



*banks, special attention is paid to plant species representativeness and genetic stability preservation. Most of the plant material is stored in conditions of decelerated growth.*

**Ключевые слова:** биологическое разнообразие, генетические банки, покой семян, длительность пассажа.

**Key words:** biological diversity, gene banks, seed dormancy, duration of passage.

В настоящее время редкими и находящимися под угрозой исчезновения признаны 533 вида растений [5]. На территории РФ насчитывается более 85 ботанических садов и других интродукционных центров, являющихся основой сохранения биоразнообразия растительного мира *ex situ*, их главная задача — изучение и сохранение генетических ресурсов природной флоры.

Проблемы сохранения разнообразия растительного мира в контексте устойчивого использования биологических ресурсов и развития биотехнологии впервые рассмотрены в Международной конвенции о биологическом разнообразии [14].

Сегодня для решения задач сохранения и восстановления генофонда редких и исчезающих видов растений широкое применение получил метод культуры *in vitro*. С ним связано, во-первых, формирование банков каллусных, суспензионных, меристематических культур, культуры семяпочек, пыльников и пыльцы, криосохранение растительных тканей; во-вторых, развитие технологий размножения растений с перспективой их дальнейшей интродукции и реинтродукции. Создание коллекций растений *in vitro* можно считать одной из форм охраны растений природной флоры и эффективным методом сохранения их биоразнообразия *ex situ*, что составляет часть общей стратегии охраны растений [1].

При культивировании *in vitro* в качестве эксплантов берут семена, надземные и подземные органы или их фрагменты, растительные ткани. Применение последних не всегда возможно, так как большинство редких видов растений не культивируется в ботанических садах, а доставка эксплантируемых тканей из мест естественного произрастания технически сложна. Возможности непрерывного использования надземных или подземных органов ограничены продолжительностью вегетационного периода растений [7].

Считается, что при формировании генетических банков для многих видов растений в качестве первичного экспланта предпочтительно применение семян [12]. Подобный подход имеет ряд значительных преимуществ, наиболее важными из которых являются освобождение растений-регенерантов от накопившихся при вегетативном размножении вирусных заболеваний и мутаций, низкий травматизм и потери исходного материала на этапе введения в культуру *in vitro*, снижение антропогенного воздействия на структуру природных популяций при отборе растительного материала. Однако значительный его недостаток — комплекс сложностей, возникающих в результате наличия у семян многих видов растений периода покоя. Это сильно замедляет процесс создания / пополнения генетических банков.



Растительный материал для работы поступает 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.

При получении семян через обменные фонды ботанические сады, как правило, сталкиваются с рядом проблем. Наиболее частая из них — достоверность таксономического определения материала. Другая проблема — нередко низкое качество семенного материала, вследствие чего вырастить растения не представляется возможным. Причиной этого является частое несоблюдение условий хранения семян, а для некоторых редких видов таковые еще просто неизвестно. Поэтому важно составить список таксонов, генофонд которых нуждается в приоритетном сохранении, и создать информационный банк данных по длительному хранению семян, разработать единые методики сбора и хранения семян редких и исчезающих видов [7; 13].

Цель исследования — изучение возможности сохранения редких и исчезающих видов растений в банках *in vitro*, а основная задача — комплексное изучение биологических особенностей редких видов в культуре *in vitro*.

Объектами изучения являются виды растений (Красная книга РФ, а также региональные Красные книги), относящиеся к различным жизненным формам.

Исходным материалом для включения таксонов в банк *in vitro* становятся семена, реже — сегменты вегетативных органов растений, как собранные в природных местах обитания, так и полученные из состава коллекционных фондов ботанических садов и дендрариев.

В зависимости от типа покоя семян в исследовании использованы различные схемы стратификации *in vitro* [11]:

- 1) 1–1,5 месяца — 20–25 °С, 3–4 месяца — 3–5 °С;
- 2) 1–1,5 месяца — 20–25 °С, 3–4 месяца — 3–5 °С, 1–2 месяца — 20–25 °С;
- 3) 1–1,5 месяца — 20–25 °С, 3–4 месяца — 3–5 °С, 1–2 месяца — 20–25 °С, 3–4 месяца — 3–5 °С.

Методика биотехнологических исследований основана на общепринятых классических приемах работы с культурой изолированных тканей и органов растений [2].

Банк *in vitro* Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН (ГБС РАН), представленный культурами различного назначения, существует с 1995 г. [10]. Сейчас в его составе доминируют фиторесурсные и редкие виды растений.

В коллекции *in vitro* соотношение категорий редкости в целом соответствует Красной книге РФ. При этом наибольшим числом видов представлены семейства *Alliaceae* — 17,2, *Iridaceae* — 14,4, *Liliaceae* — 9,7% (рис. 1).

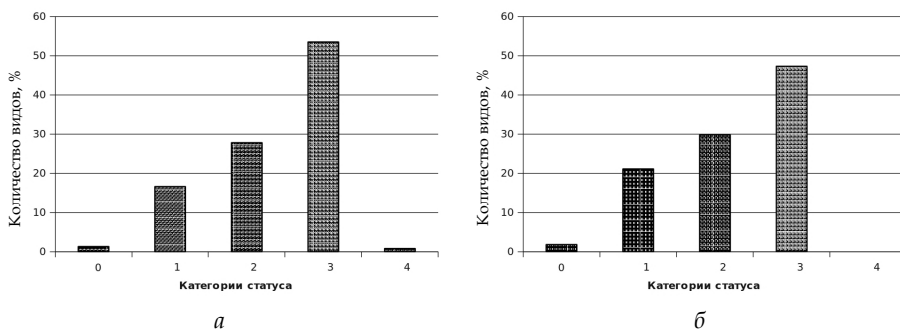


Рис. 1. Соотношение категорий редкости в Красной книге РФ (а) и коллекции *in vitro* ГБС РАН (б)

В настоящее время работа по созданию банка ведется с 76 видами растений, занесенных в Красную книгу РФ и региональные Красные книги. При этом около 35 % из них представлены несколькими (от 2 до 4) образцами из разных природных популяций. Подобный подход позволяет учесть основные аспекты (морфофизиологический, эколого-географический, генетический) современной концепции в понятии биологического вида [5].

Виды, выбранные для пополнения коллекции *in vitro* редких и исчезающих растений ГБС РАН в 2009–2011 гг., характеризуются преобладанием различных типов эндогенного покоя семян разной степени выраженности (табл. 1). Поэтому в большинстве случаев для получения проростков необходимо использование различных схем стратификации [11].

Таблица 1

Типы покоя семян у таксонов, входящих в состав банка *in vitro* ГБС

Тип покоя семян		Количество видов, %	Некоторые представители*
Экзогенный	Физический	5	<i>Iris pumila</i> , <i>Lathyrus venetus</i> , виды <i>Medicago</i>
Эндогенный	Морфологический	16	Некоторые виды <i>Allium</i> , <i>Crocus</i>
	Физиологический неглубокий	22,7	<i>Dioscorea caucasica</i> , <i>D. nipponica</i> , виды <i>Betula</i> , <i>Globularia</i> , <i>Sanguisorba</i>
	Физиологический промежуточный	1,7	<i>Atropa bella-donna</i>
	Физиологический глубокий	23,8	<i>Staphylea pinnata</i> , виды <i>Acer</i> , <i>Ostrya</i>
	Морфофизиологический простой неглубокий	1,7	Некоторые виды <i>Papaver</i> , <i>Scilla</i>
	Морфофизиологический простой глубокий	14	<i>Bellevalia sarmatica</i>
	Морфофизиологический глубокий эпикотильный	7,9	Виды <i>Paeonia</i> , <i>Cordocrinum</i>
	Морфофизиологический сложный промежуточный	3,3	<i>Aralia cordata</i> , некоторые виды <i>Pulsatilla</i> , <i>Tulipa</i>
	Морфофизиологический сложный глубокий	1,6	Виды <i>Fritillaria</i>
Комбинированный	Различные сочетания экзо- и эндогенного типов покоя	7,3	<i>Cotoneaster lucidus</i> , виды <i>Colchicum</i> , <i>Aristolochia</i>

Примечание: \* – приведены по работе [11].



В ходе исследований для ряда таксонов определены оптимальные режимы стратификации, позволяющие получать жизнеспособные проростки. Так, для проращивания семян *Globularia punctata* Lapeyr., *Matthiola fragrans* Bunge, *Papaver bracteatum* Lindl., *Rhodiola rosea* L., *Medicago daghestanica* Rupr., *Iris pumila* L., некоторых видов родов *Allium* L. и *Rhododendron* L. и других достаточно использование теплой стратификации (1–1,5 месяца при температуре 20–25 °С).

Сочетание теплой и холодной стратификации (1–1,5 месяца при 20–25 °С и 3–4 месяца при 3–5 °С) необходимо для *Bellevalia sarmatica* (Georgi) Woronow, *Stypa pennata* L., *Belamcanda chinensis* (L.) DC., некоторым видам рода *Iris* L., *Geranium pratense* L., *Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill., *Dioscorea caucasica* (Lipsky) и др.

Наиболее сложные схемы стратификации обеспечивают прорастание таких видов, как *Tulipa tarda* Stapf, *Iris acutiloba* C. A. Mey., *Pulsatilla vernalis* (L.) Mill. (1–1,5 месяца при температуре 20–25 °С, 3–4 месяца при 3–5 °С, 1–2 месяца при 20–25 °С), а также видов рода *Fritillaria* L. (1–1,5 месяца при температуре 20–25 °С, 3–4 месяца при 3–5 °С, 1–2 месяца при 20–25 °С, 3–4 месяца при 3–5 °С).

Самым длительным периодом прорастания (около 30–40 суток) характеризуются семена *Atropa bella-donna* L., *Dioscorea caucasica*, *Pulsatilla vernalis*, *Medicago daghestanica*, *Hyssopus cretaceus* Dubjan. Массовое прорастание семян (в течение 3–5 суток) характерно для *Rhododendron brachycarpum* D. Don ex G. Don, *Papaver bracteatum*, *Rhodiola rosea*, *Allium gunibicum* Misch. ex Grossh., *Matthiola fragrans* и др. При этом всхожесть колеблется от 57 (*Rhodiola rosea*) до 89 % (*Matthiola fragrans*).

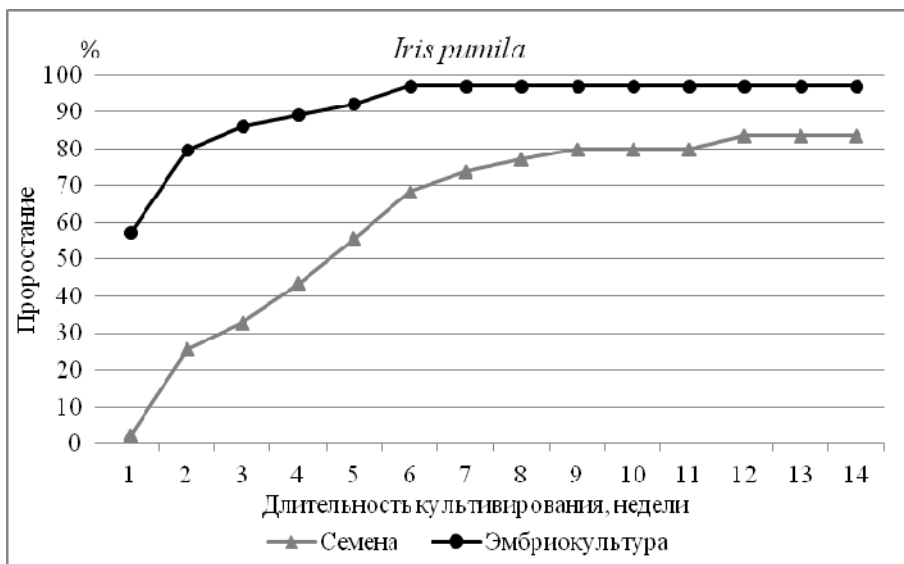
В ходе проведенных исследований на модельных представителях семейств *Paeoniaceae* и *Iridaceae* показано преимущество культивирования изолированных зародышей как метода преодоления покоя семян (рис. 2) [4; 8].

Известно, что одним из наиболее существенных факторов, влияющих на поддержание устойчиво пролиферирующей культуры, является состав питательной среды. На модельных представителях рода *Paeonia* L. установлено, что на этапе теплой стратификации оптимальна питательная среда Murashige, Skoog (1962) (MS) без добавления гормонов. Применение 6-БАП (0,1 мг/л) оказывает положительное воздействие только на начальных стадиях культивирования зародышей, ингибируя рост растений-регенерантов в дальнейшем. Добавление в питательную среду ГК<sub>3</sub> (0,1–1 мг/л) позволяет сократить период эпикотильного покоя, но не заменяет этап холодной стратификации, длительность которого зависит от видовой принадлежности объекта и продолжается от 4–5 (*Paeonia mascula*) до 7–8 недель (*P. suffruticosa*).

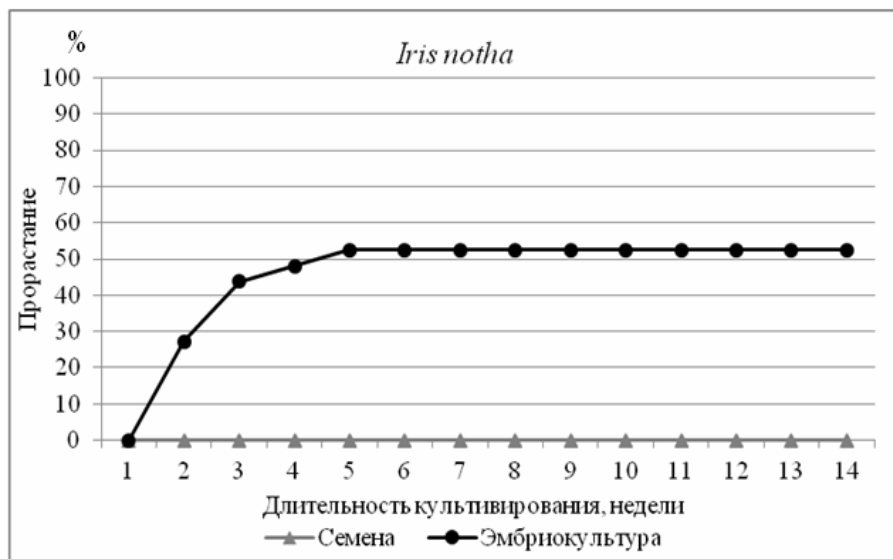
Выявлено, что один из критериев выбора сроков изоляции зародышей — достижение ими стадии относительной автономности. На модельных представителях семейства *Iridaceae* показано, что оптимальный срок изоляции зародышей — периоды 40–50 и 50–60 дней после опы-



ления (стадия дифференциации осевых органов), обеспечивающие максимальный выход растений-регенерантов (75,5 и 67 % соответственно). На стадии инициации оптимальна питательная среда с минеральной основой MS, дополненная ГК<sub>3</sub> (0,8 мг/л).



а



б

Рис. 2. Динамика прорастания *in vitro* редких видов рода *Iris* с физиологическим неглубоким (а) и глубоким (б) типом покоя семян



В ходе исследования для модельных видов редких и исчезающих растений установлены оптимальные тип и концентрация фитогормона, а также длительность пассажа (табл. 2).

Таблица 2

**Рекомендуемый состав питательных сред на этапе размножения и продолжительность периода субкультивирования некоторых видов редких и исчезающих растений**

Семейство	Модельные объекты	Минеральный состав	Фитогормон	Концентрация фитогормона, мг/л	Длительность пассажа, сут.
<i>Alliaceae</i>	<i>Allium mirzojevii</i> , <i>Al. gunibicum</i>	½ MS, MS	2ip	1,0–3,0	45–60
<i>Amaryllidaceae</i>	<i>Galanthus angustifolius</i>	MS	6-БАП; НУК	10,0 / 0,1	30–45
<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Silene cretacea</i>	½ MS	2ip; 6-БАП	0,5	до 60
<i>Celastraceae</i>	<i>Eyonymus nana</i>	MS	6-БАП; НУК	1,0 / 0,1	45–60
<i>Crassulaceae</i>	<i>Rhodiola rosea</i>	½ MS, MS	2ip	0,5–1,0	45–60
<i>Dioscoreaceae</i>	<i>Dioscorea caucasica</i> , <i>D. japonica</i>	MS	2ip; 6-БАП	1,0–2,0	60–75 (до 90)
<i>Ericaceae</i>	<i>Rhododendron schlippenbachii</i> , <i>Rh. brachycarpum</i>	Anderson (1976)	2ip; НУК	15,0 / 4,0	45–60
<i>Globulariaceae</i>	<i>Globularia punctata</i>	½ MS	2ip; 6-БАП	0,5	30–45
<i>Lamiaceae</i>	<i>Hyssopus cretaceus</i>	½ MS	2ip	0,5	до 30
<i>Liliaceae</i>	<i>Bellivalia sarmatica</i> , <i>Lilium martagon</i>	MS	6-БАП; НУК	10,0 / 0,1	60–90
<i>Papaveraceae</i>	<i>Papaver bracteatum</i>	MS	2ip; 6-БАП	0,5–1,0	20–30
<i>Ranunculaceae</i>	<i>Pulsatilla vernalis</i>	½ MS	2ip	0,5–1,0	30–45

Спонтанное укоренение отмечено для следующих таксонов: *Rhodiola rosea*, *Hyssopus cretaceus*, *Dioscorea caucasica*, *Belamcanda chinensis*, *Iris pumila*, видов рода *Allium*.

Для культивирования большинства луковичных культур (семейства *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*) необходимо высокое содержание фитогормонов, оптимальной является питательная среда, содержащая 10 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л НУК, длительность пассажа на этой среде составляет 90 дней.

В процессе культивирования *in vitro* выявлены виды редких растений, отличающиеся повышенным синтезом вторичных метаболитов, приводящим к ингибированию клеточных делений в тканях экспланта и снижению жизнеспособности (гибели) растений-регенерантов. Наиболее высокой поликонденсацией веществ фенольной природы характеризуются *Papaver bracteatum*, *Hyssopus cretaceus*, а также виды родов *Pulsatilla* Mill., *Dioscorea* L. По данным ряда авторов [3; 6], для снижения способности растений-регенерантов к синтезу вторичных метаболитов

*in vitro* эффективно сокращение периода субкультивирования, снижение температуры, а также применение в составе питательной среды различных антиоксидантов.

Хранение в условиях минимального роста — один из самых эффективных способов поддержания коллекций *in vitro* [9; 10]. При этом основной задачей является сохранение жизнеспособности эксплантов в сочетании с максимальным увеличением длительности субкультивирования.

В настоящее время в лаборатории биотехнологии ГБС РАН отрабатывается методика длительного хранения микропобегов при пониженной температуре и повышенном содержании сахарозы в питательной среде (30–120 г/л). Модельный объект в этом исследовании — вид *Medicago daghestanica* Rupr.

*Medicago daghestanica*, как и любое травянистое бобовое растение, характеризуется коротким вегетационным периодом, поэтому необходимо подобрать условия, замедляющие рост и развитие.

В качестве сдерживающего фактора в данной работе применена повышенная концентрация сахарозы в составе питательной среды. В опыте использовали следующие среды:

- 1)  $\frac{1}{2}$  MS, 30 г/л сахарозы, 7 г/л агар, 0,1 г/л мезоинозитола, 0,5 мг/л 2-ип;
- 2)  $\frac{1}{2}$  MS, 60 г/л сахарозы, 7 г/л агар, 0,1 г/л мезоинозитола, 0,5 мг/л 2-ип;
- 3)  $\frac{1}{2}$  MS, 90 г/л сахарозы, 7 г/л агар, 0,1 г/л мезоинозитола, 0,5 мг/л 2-ип;
- 4)  $\frac{1}{2}$  MS, 120 г/л сахарозы, 7 г/л агар, 0,1 г/л мезоинозитола, 0,5 мг/л 2-ип.

Стандартной средой для культивирования *Medicago daghestanica* является первый вариант, измерения проводили в два этапа через каждые 60 дней (рис. 3).

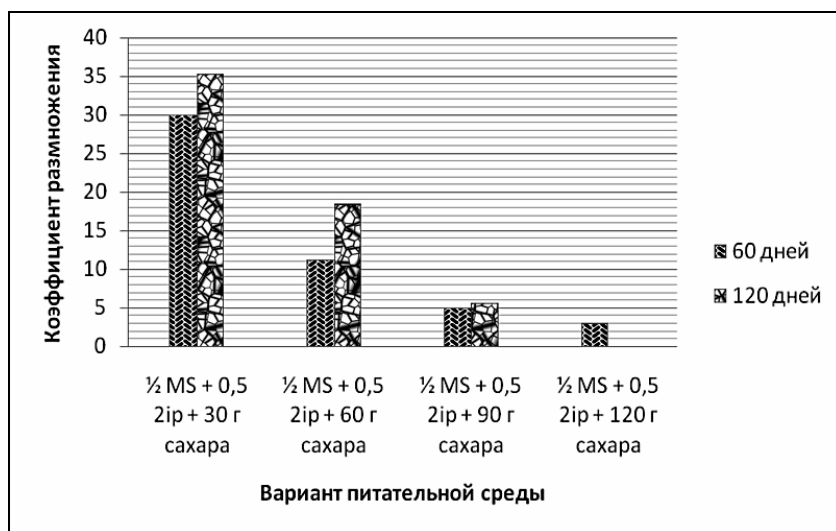


Рис. 3. Динамика ростовых процессов *Medicago daghestanica* на этапе длительного культивирования





Из рисунка 3 видно, что при повышении содержания сахарозы ростовые процессы замедляются, это наблюдается и при первом, и при втором измерениях. При последнем (120 дней после пассажа) отмечена гибель микропобегов на четвертом варианте среды ( $1/2$  MS, 120 г/л сахарозы, 7 г/л агар, 0,1 г/л мезоинозитола, 0,5 мг/л 2-ип). Поэтому для 60-дневного хранения оптимальной средой является четвертый вариант, а для более длительного – второй ( $1/2$  MS, 60 г/л сахарозы, 7 г/л агар, 0,1 г/л мезоинозитола, 0,5 мг/л 2-ип), так как он обеспечивает оптимальное замедление ростовых процессов без изменения качества материала.

Данная взаимозависимость подтверждается исследованиями других авторов на представителях родов *Actinidia*, *Clematis*, *Cymbidium*, *Rosa*, *Fragaria* [9].

Таким образом, создание генетических банков *in vitro* можно рассматривать как достаточно эффективный метод в системе мер сохранения биоразнообразия редких видов растений *ex situ*.

### Список литературы

1. Андреев Л.Н., Горбунов Ю.Н. Сохранение редких и исчезающих растений *ex situ*: достижения и проблемы // Изучение и охрана разнообразия фауны, флоры и основных экосистем Евразии : матер. междунар. конф. М., 2000. С. 19–23.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М., 1999.
3. Васильева О.Г. Биолого-морфологические основы клонального микроразмножения некоторых представителей рода *Rhododendron* L. : автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2009.
4. Ветчинкина Е.М. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений : дис. ... канд. биол. наук. М., 2010.
5. Виноградова Ю.К., Горбунов Ю.Н., Макридин А.И. и др. Разработка принципов сохранения и воспроизводства генетических фиторесурсов // Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами. М., 2005. С. 343–351.
6. Запрометов М.Г. Вторичный метаболизм и его регуляция в культурах клеток и тканей растений // Культура клеток растений. М., 1981. С. 37–50.
7. Ишмуратова М.М., Ткаченко К.Г. Семена травянистых растений: особенности латентного периода, использование интродукции и размножении *in vitro*. Уфа, 2009.
8. Мамаева Н.А. Сравнительный анализ морфологических и биологических признаков сортов садовых бородачатых ирисов (секция *Iris* рода *Iris* L.) : дис. ... канд. биол. наук. М., 2008.
9. Митрофанова И.В., Видяшвар О.П., Мязина Л.Ф. Регенерация побегов из листовых эксплантов *Actinidia chinensis* Planch. // Проблемы дендрологии, садоводства и цветоводства. Ялта, 1995. С. 107.
10. Молканова О.И. Генетические банки растений в ботанических садах России // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. Ялта, 2009. Т. 131. С. 22–27.
11. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. Л., 1985.
12. Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции Центрального Сибирского ботанического сада // Вестник ВОГиС. 2008. Т. 12, №4. С. 564–572.
13. Тихонова В.Л. Сохранение генофонда дикорастущих растений в банках семян // Семя : тез. междунар. науч.-практ. конф. 14–16 дек. М., 1999. С. 111–113.



14. *Об утверждении* стратегии сохранения редких и находящихся под угрозой исчезновения видов животных, растений и грибов : приказ Министерства природных ресурсов РФ №323 от 6 апреля 2004 г. URL: [www.allbusiness.ru/BPravo/DocumShow\\_DocumID\\_90715\\_DocumlsPrint\\_Page\\_1.html](http://www.allbusiness.ru/BPravo/DocumShow_DocumID_90715_DocumlsPrint_Page_1.html) (дата обращения: 11.05.2011).

### **Об авторах**

Екатерина Михайловна Ветчинкина — канд. биол. наук, мл. науч. сотр., Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, Москва.

E-mail: yarilko@inbox.ru

Ирина Васильевна Ширнина — инженер, Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, Москва.

E-mail: ireen-matya@yandex.ru

Сергей Юрьевич Ширнин — асп., Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, Москва.

E-mail: durandal-1707@bk.ru

Ольга Ивановна Молканова — канд. сель.-хоз. наук, ст. науч. сотр., Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, Москва.

E-mail: molkanova@mail.ru

### **About authors**

Dr Yekaterina Vetchinkina, Junior Research Fellow, Central Botanical Garden of the Russian Academy of Science, Moscow.

E-mail: yarilko@inbox.ru

Irina Shirnina, Engineer, Central Botanical Garden of the Russian Academy of Science, Moscow.

E-mail: ireen-matya@yandex.ru

Sergey Shirnin, PhD student, Central Botanical Garden of the Russian Academy of Science, Moscow.

E-mail: durandal-1707@bk.ru

Dr Olga Molkanova, Senior Research Fellow, Central Botanical Garden of the Russian Academy of Science, Moscow.

E-mail: molkanova@mail.ru