

О. И. Молканова, ВНС, к. с.-х. н.

Т. Ю. Коновалова, нс

И. В. Ширнина, мнс

И. Л. Крахмалева, мнс

Л. Р. Ахметова, мнс

О. В. Королева, мнс

Е. Н. Раева-Богословская, мнс

ФГБУН Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН,

Россия, г. Москва

*molkanova@mail.ru*

УДК 57.085.2

DOI 10.31676/2073-4948-2019-58-253-258

## МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОХРАНЕНИЯ РАСТЕНИЙ В ГЕНЕТИЧЕСКОМ БАНКЕ *IN VITRO*

**Реферат.** Разработаны научные основы формирования и методологические аспекты сохранения редких, ценных видов и сортов растений в генетическом банке *in vitro*. Показана определяющая роль сахарозы и факторов культивирования (температуры, освещенности) для замедленного роста эксплантов. Для растений разных жизненных форм на основе комплекса показателей (частота регенерации, органогенетический индекс, эффективность микроразмножения) определены оптимальные типы эксплантов для длительного сохранения в условиях *in vitro*.

**Ключевые слова:** биологическое разнообразие, клональное микроразмножение, генетический банк *in vitro*

**Summary.** The scientific basis of formation and methodological aspects of conservation of rare, valuable plant species and varieties in the genebank *in vitro* were elaborated. The determining role of osmotic (sucrose) and cultivation factors (temperature, light intensity) for slow explant growth was shown. The most optimal explants for long-term *in vitro* conservation of different plant life-forms based on the complex of factors (regeneration frequency, organogenetic index, micropropagation efficiency) were determined.

**Keywords:** biodiversity, clonal micropropagation, genebank *in vitro*

### Введение

Сохранение биоразнообразия растений *ex situ* в настоящее время является самым эффективным и распространенным методом благодаря деятельности ботанических садов [1, 2].

Создание коллекций растений в ботанических садах — наиболее эффективный способ сохранения и рационального использования генетического разнообразия. В основе методических подходов формирования коллекций лежит принцип максимальной репрезентативности генетического разнообразия, включая дикорастущие виды, интродуцированные растения, а также растения,

---

Работа выполнена в рамках ГЗ ГБС РАН (№118021490111-5)

культивируемые *in vitro*. Эффективность сохранения растений *ex situ* может быть существенно повышена путем создания генетических банков *in vitro*.

В настоящее время развивается новая междисциплинарная наука — биотехнология сохранения растений, основной задачей которой является дополнение существующих традиционных методов сохранения биоразнообразия *in situ* и *ex situ* современными биотехнологическими приемами, обеспечивающими возможность управления генетическими ресурсами [3].

Целью данной работы является формирование коллекции *in vitro* и изучение особенностей развития регенерантов при длительном хранении.

### Материалы и методы исследований

В работе использовали общепринятые [4] и разработанные в лаборатории биотехнологии растений ГБС РАН [5] методы культуры изолированных тканей и органов растений. Экспланты сохраняли на модифицированной среде MS (Murashige and Skoog, 1962) [6] с добавлением сахарозы в концентрации 20–120 г/л и 6-БАП (6-бензиламинопурин) 0,2–1,0 мг/л. Регенеранты сохраняли при температуре 5–7 °С, освещении 500–1500 лк и 16-часовом фотопериоде.

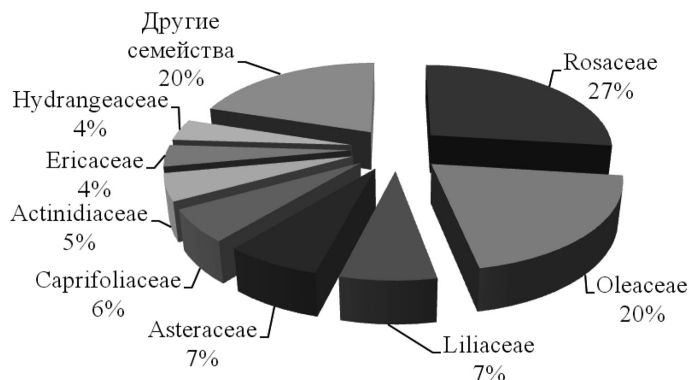
В коллекции *in vitro* сохраняются представители как культурных, так и дикорастущих видов природной флоры, которые представлены образцами из большого числа популяций естественных мест произрастания, что обеспечивает наиболее полную репрезентативность их генофонда. В качестве объектов использовали рекальцитратные виды, имеющие проблемы с семенным, вегетативным размножением или элитные генотипы растений. Особое внимание уделяли сохранению *ex situ* дикорастущих сородичей и родственных видов культивируемых сортов, отличающихся большой вариабельностью и служащих генетическим резервуаром для дальнейшей селекции.

### Результаты исследований и обсуждение

Генетический банк растений *in vitro* в ГБС РАН является уникальным и наиболее представительным в России. Он содержит 153 вида, 1157 сортов и отборных форм, относящихся к 183 родам и 61 семейству. Около 70 % коллекции относится к фиторесурсным видам. Наиболее полно представлены семейства: *Actinidiaceae*, *Asteraceae*, *Caprifoliaceae*, *Ericaceae*, *Hydrangeaceae*, *Liliaceae*, *Oleaceae*, *Rosaceae* (рис. 1).

На современном этапе развития особую значимость приобретает изучение и сохранение родовых комплексов, которые являются исходным материалом для проведения комплексных исследований. Так, в лаборатории в настоящее время сохраняется крупнейшая коллекция рода *Syringa* L. *in vitro*, насчитывающая свыше 250 наименований, 21 вид и 230 сортов и отборных форм отечественной и зарубежной селекции, в том числе более 70 сортов и уникальных отборных форм селекции Л. А. Колесникова, 12 сортов селекции Н. Л. Михайлова и 10 сортов

селекции Н. К. Вехова, которая по праву является национальным достоянием России. В дальнейшем будет продолжена работа по формированию представительных коллекций родов *Actinidia* Lindl., *Rubus* L., *Hydrangea* L., *Lilium* L. и др.



**Рис. 1.** Количественный состав наиболее представительных семейств в генетическом банке *in vitro* ГБС РАН

Особое внимание уделяется сохранению в коллекции *in vitro* редких и исчезающих видов растений, коллекция которых представлена более 80 таксонами. 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., относящиеся к видам, имеющим категорию редкости 1(E) [7, 8].

Проводятся комплексные исследования с лекарственными растениями *Codonopsis lanceolata* Benth., *Chamerion angustifolium* L. Holub., *Potentilla alba* L., *Panax ginseng* C.A. Mey., *Oplopanax elatus* (Nakai) Nakai., *Rhodiola rosea* L. и др. [8].

Изучены возможности семенного асимбиотического проращивания методом *in vitro* 60 дикорастущих видов семейства Orchidaceae с последующей их успешной интродукцией в условиях Подмосквья. Наиболее представлены роды *Dactylorhiza* (10 видов) и *Cypripedium* (12 видов) [9].

В основе работ по сохранению генофонда лежит разработка эффективных методов воспроизводства растений. Растения, относящиеся к разным таксонам, отличаются уровнем тотипотентности клеток и регенерационным потенциалом. Это обуславливает необходимость дифференцированного подхода к разработке методик клонального микроразмножения. Поскольку основной целью при длительном депонировании является сохранение гермоплазмы и поддержание ее в стабильном состоянии, выбираются методы микроразмножения, минимизирующие риск самоклональных вариаций [10]. К числу таких технологий относится прежде всего метод активации уже существующих меристем (апекс стебля, пазушных почек), который в отличие от других типов микроразмножения считается надежным в плане генетической стабильности полученных регенерантов [11].

Для определения оптимальных условий культивирования и управления морфогенезом того или иного объекта *in vitro* необходимо оценить морфогенетический потенциал культивируемых тканей и органов, определить факторы, влияющие на эффективность регенерации. Основными факторами, влияющими на процесс органогенеза, являются: эпигенетические характеристики клеток экспланта, физиологическое состояние интактных растений, сроки изоляции экспланта, состав питательной среды и условия культивирования [5].

Одним из эффективных способов сохранения генофонда растений является культивирование регенерантов в условиях замедленного роста. Сроки и специфика условий хранения растительного материала определяются биологическими особенностями конкретных таксонов. В процессе исследований показано, что совместное использование оптимальных показателей интенсивности освещения, состава питательной среды, концентрации сахарозы значительно увеличивало как период субкультивирования, так и жизнеспособность эксплантов в процессе хранения *in vitro*. Оптимальными условиями сохранения для растений-регенерантов изученных семейств являются  $\frac{1}{2}$  MS + 0,3 мг/л 6-БАП, пониженная температура (5-7 °С) и слабая освещенность (500-1500 лк, люминесцентные лампы Camelion FT8 15W / 33 / COOL LIGHT, GE F15W / 33 и GE F15W / 840 POLYLUX COOL) [12, 13].

В настоящее время совершенствуется методика длительного хранения микропобегов сирени при пониженной температуре (5-7 °С), освещенности 500-1500 лк и повышенном содержании сахарозы в питательной среде (20–120 г/л). Выявлено, что оптимальным для длительного депонирования изучаемых генотипов (Лунный Свет, Сенсация, Сумерки) было добавление в питательную среду 40 г/л сахарозы. При увеличении содержания сахарозы до 120 г/л ростовые процессы снижались (рис. 2). Подобная тенденция прослеживалась ранее на представителях семейств *Rosaceae*, *Actinidiaceae*, *Caprifoliaceae* [14].

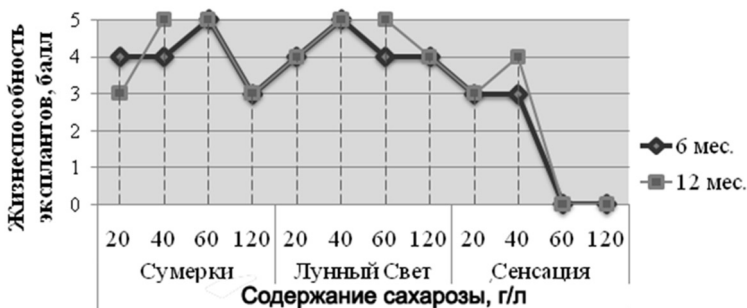


Рис. 2. Влияние содержания сахарозы на жизнеспособность эксплантов разных сортов сирени при длительном хранении

Для растений разных жизненных форм на основе комплекса показателей (частота регенерации, органогенетический индекс, эффективность микро-размножения) определены оптимальные типы эксплантов для длительного

сохранения в условиях *in vitro*: для древесных и полудревесных растений это фрагменты побегов, содержащие один-два метамера, для наземных трав — почки возобновления; для луковичных растений — микролуковички или их сегменты, для представителей семейства *Orchidaceae* — протокормы (рис. 3).

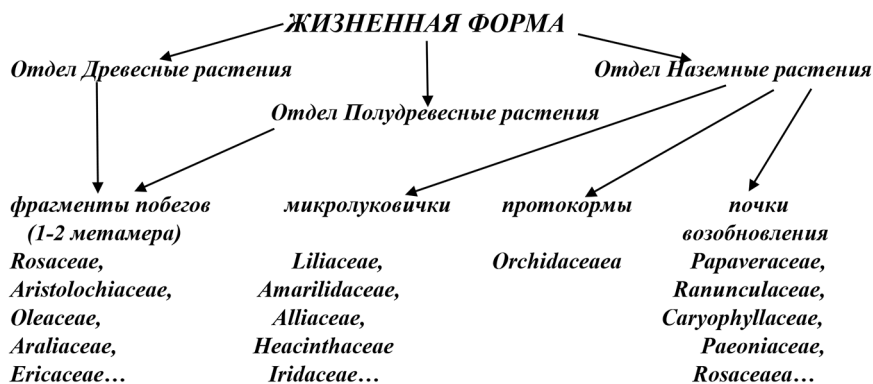


Рис. 3. Схема сохранения растений в условиях *in vitro* (оптимальный тип экспланта для депонирования)

### Выводы

Таким образом, сохранение генетических ресурсов в коллекциях *in vitro* становится важнейшим вкладом биотехнологии в стратегию сохранения *ex situ*.

Разработана комплексная методология сохранения растений разных таксономических групп при низких положительных температурах. Сформирована коллекция *in vitro* редких и ценных растений, которая насчитывает более 1300 наименований.

Разработан способ беспересадочного депонирования до 24 месяцев при температуре +5-7 °С и оптимальном комбинировании факторов: состава питательной среды ( $\frac{1}{2}$  MS + 0,3 мг/л 6-БАП), наличия сахарозы (40 г/л), освещенности 500-1500 лк.

На основе комплексов показателей и с учетом биологических особенностей определены оптимальные экспланты для длительного сохранения регенерантов в условиях *in vitro*.

Особое внимание уделялось генетической репрезентативности и сохранение аутентичности растений, сохраненных *in vitro*.

### Список использованной литературы

1. Андреев Л. Н., Горбунов Ю. Н. Роль ботанических садов России в сохранении биологического разнообразия растений // Биологического разнообразие. Интродукция растений: Материалы 3-й Международной науч. конф. — СПб., 2003. — С. 5 — 7
2. Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и отборных форм декоративных, ароматических и плодовых культур: Коллективная монография / Под общей редакцией И. В. Митрофановой. — Симферополь: ИТ «Ариал», 2018. — 260 с.

3. **Benson E. E.** Plant Conservation Biotechnology. — London: Taylor and Francis, 2003. — 309 p.
4. **Бутенко Р. Г.** Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. — М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. — 160 с.
5. **Молканова О. И., Васильева О. Г., Коновалова Л. Н.** Научные основы сохранения и воспроизводства генофонда ценных и редких видов растений в культуре *in vitro* // Бюл. ГБС РАН, 2015. — Вып. 201. — № 2. — С. 78–82.
6. **Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*, 1962. — Vol. 15. — №. 43. — P. 473-497.
7. **Molkanova O. I., Shirnina I. V., Mitrofanova I. V.** Conservation and micropropagation of rare and endemic species in genepool collections of the Russian Federation // *Journal of Biotechnology*, 2018. — Vol. 280. — P. 83–84. <https://doi.org/10.1016/j.biotech.2018.06.274>
8. **Molkanova O. I., Egorova D. A., Mitrofanova I. V.** Preservation Characteristics of Valuable Plant Species in *in vitro* Genebanks at Russian Botanical Gardens // *In Vitro Cellular & Developmental Biology — Plant*, 2018. — Vol. 58. — P. 46. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9921-2>
9. **Коновалова Т. Ю., Молканова О. И., Шевырева Н. А.** Асимбиотическое размножение орхидей открытого грунта и опыт их интродукции в Подмоскowie // Бюл. ГБС РАН, 2017. — Вып. 1. — С. 49–57.
10. **Engelmann F.** Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 2011. — Vol. 47. — P. 5-16.
11. **Rani V., Raina S. N.** Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: A critical reappraisal // *In Vitro Cellular & Developmental Biology — Plant*, 2000. — Vol. 36. — P. 319-330.
12. **Ишмуратова М. И., Ткаченко К. Г.** Семена травянистых растений: особенности латентного периода, использование в интродукции и размножении *in vitro*. — Уфа: Гилем, 2009. — 116 с.
13. **Молканова О. И., Васильева О. Г., Мамаева Н. А., Ветчинкина Е. М., Коновалова Т. Ю.** Биотехнологические и молекулярно-генетические методы для сохранения и воспроизводства полезных и редких видов растений // *История науки и техники*, 2010. — № 5. — С. 74-79.
14. **Молканова О. И., Егорова Д. А., Мелещук Е. А.** Использование биотехнологических методов в сохранении и ускоренном размножении ягодных культур // *Селекция и сорторазведение садовых культур*, 2018. — Т. 5. — № 1. — С. 73-76.

**O. I. Molkanova, T. Y. Konovalova, I. V. Shirnina, I. L. Krakhmaleva,  
L. R. Akhmetova, O. V. Koroleva, E. N. Raeva-Bogoslovskaya**  
Tsitsin Main Botanical Garden of RAS, Moscow, Russia

## **METODOLOGICAL BASES OF PLANT CONSERVATION IN GENE BANK IN VITRO**