

Сохранение редких видов растений с применением биотехнологических методов в ГБС РАН

Preservation of rare plant species using biotechnological methods in MBG RAS

Молканова О. И., Горбунов Ю. Н., Ширнина И. В., Егорова Д. А.

Molkanova O. I., Gorbunov Yu. N., Shirnina I. V., Egorova D. A.

Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, г. Москва, Россия. E-mail: molkanova@mail.ru

Tsitsin Main Botanical Garden of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

Реферат. Создание коллекций редких видов растений *in vitro* является одной из форм охраны растений природной флоры и эффективным методом сохранения генофонда *ex situ*. Получены результаты по введению в культуру *in vitro* более 80 редких видов растений Красной книги Российской Федерации. Разработаны протоколы клонального микроразмножения, позволяющие получить достаточное количество растений в целях восстановления численности природных популяций и сохранения редких видов растений. Подобраны условия для длительного депонирования. 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 метамера, для травянистых – почки возобновления, для луковичных растений – микролуковички или их сегменты.

Ключевые слова. Генетический банк *in vitro*, клональное микроразмножение, редкие виды растений.

Summary. The creation of rare plant species collections *in vitro* is one form of natural flora protection and effective method of *ex situ* gene pool conservation. The results of introducing *in vitro* more than 80 rare plant species from the Red Book of Russia are summarized. The clonal micropropagation protocols allowing to obtain a sufficient plants number in order to restore natural populations and preserve rare plant species were developed. The conditions for a long deposit have been specified. The optimal explant types for long-term conservation *in vitro* were determined for plants of different life forms: 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.

Key words. Clonal micropropagation, *in vitro* gene pool, rare plant species.

В последние десятилетия методы биотехнологии все шире применяются при охране редких и исчезающих растений (Новикова, 2013; Molkanova et al., 2018б). 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* (Баранова и др., 2010; Ветчинкина и др., 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 возможности образцы должны быть взяты из разных природных популяций в количестве достаточном для дальнейшей разработки протоколов сохранения *in vitro* (Ветчинкина и др., 2012; Трифонова и др., 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.

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.

Введение эксплантов в культуру *in vitro* проводили в стерильных условиях согласно методикам, принятым в лаборатории биотехнологии ГБС РАН.

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

В качестве регуляторов роста в питательную среду добавляли: 0,2–12,0 мг/л 6-бензиламинопурина (BAP), 1,0–5,0 мг/л 2-изопентениладенин (2-ip) и сочетание этих препаратов с 0,05 мг/л 3-индолилуксусной кислотой (IAA), 0,1 мг/л альфа-нафтилуксусной кислотой (NAA) и 0,1–1 мг/л *гиббереллиновой кислоты* (GA).

Депонирование (до 24 месяцев) проводили на питательных средах MS и ½ MS, содержащих BA (0,1–1 мг/л) и сахарозу (20–60 г/л), при температуре 5–7 °С и освещенности 500–1500 лк.

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 более 1300 наименований. Особое внимание уделяется редким и исчезающим видам растений, коллекция составляет 17,3 % от общего числа покрытосеменных растений Красной книги РФ (2008). 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 (Ветчинкина и др., 2012).

В ГБС РАН впервые разработаны методики клонального микроразмножения *Gladiolus palustris* Gaudin., имеющего в Красной книге РФ (2008) статус 0 (вероятно исчезнувшие), а также *Aristolochia manshuriensis* Kom., *Dioscorea caucasica* Lipsky, *Sanguisorba magnifica* I. Schischk. et Kom., *Euonymus nana* Veib., имеющих статус 1 (находящиеся под угрозой исчезновения)

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) (рис.). Большинство видов (90,2 % от общего числа) составляют травянистые растения.

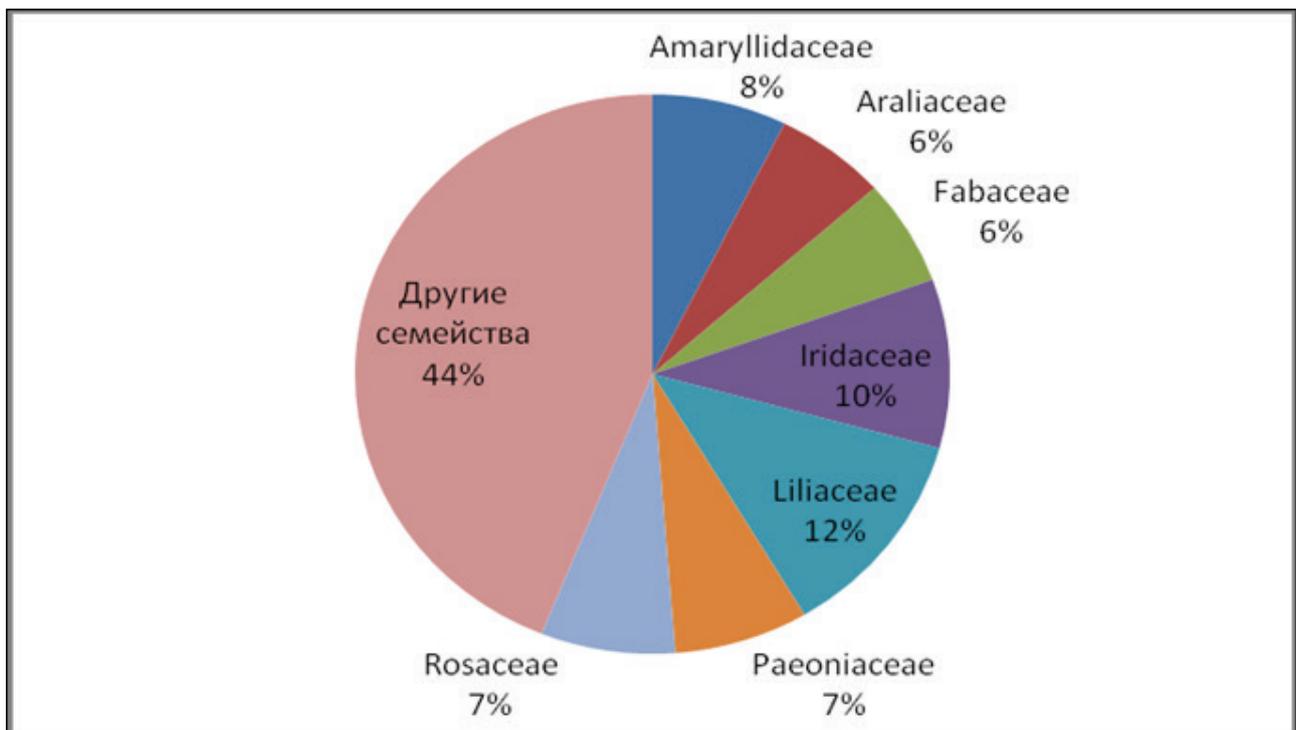


Рис. Таксономический состав коллекции *in vitro* редких и исчезающих видов растений в ГБС РАН.

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 помещали в раствор на 7–20 мин, вегетативные части – на 3–7 мин соответственно. Время экспозиции зависело от физиологической зрелости экспланта.

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 (Тихонова, 1999). Необходимо учитывать биологию семян (тип покоя, гетероспермия, жизнеспособность, сезонные колебания в ритмах прорастания и т. д.) и другие характеристики размножаемых видов (жизненная форма, преобладающий способ размножения, устойчивость в культуре и др.) (табл.).

Таблица

Типы покоя семян у представителей различных родов растений

Тип покоя семян		Представители родов*
Экзогенный	физический	<i>Iris, Medicago</i>
Эндогенный	морфологический	<i>Allium, Crocus</i>
	физиологический неглубокий	<i>Dioscorea, Betula, Globularia, Sanguisorba</i>
	физиологический промежуточный	<i>Atropa</i>
	физиологический глубокий	<i>Staphylea, Acer, Ostrya</i>
	морфофизиологический простой неглубокий	<i>Papaver, Scilla</i>
	морфофизиологический простой глубокий	<i>Bellevallia, Kalopanax</i>
	морфофизиологический глубокий эпикотильный	<i>Paeonia, Cordiocrinum</i>
	морфофизиологический сложный промежуточный	<i>Aralia, Panax, Pulsatilla, Tulipa</i>
	морфофизиологический сложный глубокий	<i>Fritillaria</i>
Комбинированный	различные сочетания экзо- и эндогенного типов покоя	<i>Cotoneaster, Colchicum, Aristolochia</i>

*Примеч.: данные приведены по работе Николаева и др. (1985).

Растения, относящиеся к разным таксонам, различаются уровнем тотипотентности клеток и регенерационным потенциалом. Это обуславливает необходимость дифференцированного подхода к разработке методик клонального микроразмножения 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 микроразмножения, позволяющие исключить соматоклональные вариации (Molkanova et al., 2018б). К числу таких технологий относится, прежде всего, метод активации уже существующих меристем, который считается надежным в плане генетической стабильности полученных регенерантов (Rani, Raina, 2000; Молканова и др., 2016).

Основные факторы, определяющие процесс органогенеза: эпигенетические характеристики клеток экспланта, физиологическое состояние интактных растений, сроки изоляции экспланта, состав питательной среды и условия культивирования (Molkanova et al., 2018а).

Тканевая принадлежность эксплантов, использованных для получения культуры тканей различных видов, в значительной степени определяет 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 *Aris-*

tolochia 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 (Молканова, Егорова, 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.

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 (Молканова и др., 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 ½ MS, дополненная 0,3 мг/л ВАР, пониженная температура (3–7 °С) и слабая освещенность (500 лк) (Ветчинкина и др., 2012; Новикова, 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 метанера, для травянистых – почки возобновления. Для луковичных растений (представители семейств Alliaceae, Amarilidaceae, Nyacinthaceae, Liliaceae) – пазушные луковички или их сегменты.

Заключение. Применение комплексного подхода позволяет существенно повысить надежность сохранности генофонда. В ГБС РАН сформирована и сохраняется коллекция *in vitro* из 82 вида, что составляет 17,3 % от общего числа покрытосеменных растений Красной книги РФ (2008). 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 возможности 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 разработаны индивидуальные технологии клонального микроразмножения.

Биотехнологические методы позволяют с использованием небольшого количества исходного материала в короткие сроки получить большое число выровненного посадочного материала. Получен-

ные растения можно использовать для пополнения живых коллекций, реинтродукции и усиления ослабленных природных популяций редких видов.

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 (№118021490111-5).

ЛИТЕРАТУРА

Баранова О. Г., Дедюхина О. Н., Яговкина О. В. Стратегия создания и сохранения коллекционного фонда редких и исчезающих растений в Ботаническом саду Удмуртского университета // Вестн. Удм. ун-та. Сер. Биология. Науки о Земле, 2010. – № 2. – С. 48–54.

Ветчинкина Е. М., Ширнина И. В., Ширнин С. Ю., Молканова О. И. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro* // Вестн. Балт. гос. ун-та им. И. Канта, 2012. – № 7. – С. 109–118.

Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 855 с.

Молканова О. И., Егорова Д. А. Некоторые аспекты культивирования *in vitro* *Aristolochia manshuriensis* Kom. // Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о Земле, 2017. – Т. 27. – № 2. – С. 151–157.

Молканова О. И., Коновалова Л. Н., Стахеева Т. С. Особенности размножения и сохранения коллекции ценных и редких видов растений в условиях *in vitro* // Бюллетень Никитского ботанического сада, 2016. – № 120. – С. 17–23.

Николаева М. Г., Разумова М. В., Гладкова В. Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Л.: Наука, 1985. – 348 с.

Новикова Т. И. Использование биотехнологических подходов для сохранения биоразнообразия растений // Растительный мир Азиатской России, 2013. – № 2(12) – С. 119–128.

Тихонова В. Л. Сохранение генофонда дикорастущих растений в банках семян // Семя: тез. междунар. науч.-практ. конф. (14–16 дек. М.) – Москва, 1999. – С. 111–113.

Трифонов А. А., Кочиева Е. З., Кудрявцев А. М. Анализ генетического разнообразия редкого и эндемичного вида *Allium regelianum* на основе данных NSB-профлайнинга // Материалы VII Международной научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)». – Ялта, 2014 – 192 с.

Benson E. E., Danaher J. E., Pimbley I. M., Anderson C. T., Wake J. E., Daley S., Adams L. K. *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant // Biodiversity and Conservation, 2000. – № 9. – С. 711–726.

Cruz-Cruz C. A., Gonzalez-Arno M. T., Engelmann F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity // Resources, 2013. – № 2. – 73–95.

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 and Developmental Biology*, 2018a. – № 54. – Pp. 546–547.

Molkanova O. I., Shirnina I. V., Mitrofanova I. V. Conservation and micropropagation of rare and endemic species in genebank collections of the Russian Federation // *Journal of Biotechnology*, 2018b. – Vol. 280. – Pp. 83–84.

Rani V., Raina S. N. Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: A critical reappraisal // *In Vitro. Cellular and Developmental Biology*, 2000. – № 36. – С. 319–330.