

УДК 58:57.082.542

## ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ КОЛЛЕКЦИИ ЦЕННЫХ И РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Ольга Ивановна Молканова, Людмила Николаевна Коновалова,  
Татьяна Сергеевна Стахеева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, г. Москва  
127276, г. Москва, Ботаническая ул., д. 4  
molkanova@mail.ru

Наряду с традиционными способами сохранения растений *ex situ* все большее значение приобретает использование для этих целей культуры изолированных тканей и органов. Наиболее эффективные методики клонального микроразмножения были оптимизированы более чем для 150 видов, 1150 культиваров и отборных форм, относящихся к 59 семействам. Разработка эффективных методов воспроизводства растений является основой работ по сохранению генофонда. Для устойчивого воспроизводства растений определены оптимальные экспланты (апикальная меристема с листовыми примордиями). Разрабатываются научные основы формирования и методологические аспекты сохранения редких и ценных видов растений в генетических банках *in vitro*. Большая часть коллекции покрытосеменных растений хранится в условиях замедленного роста (3-7°C). Установлены важнейшие факторы, влияющие на длительность сохранения в условиях *in vitro*. При создании генетических банков особое внимание уделяется репрезентативности и сохранению генетической стабильности видов растений.

**Ключевые слова:** биологическое разнообразие; устойчивое воспроизводство; меристемный комплекс; органогенез; банк *in vitro*.

### Введение

Сохранение биоразнообразия растений является одной из актуальных задач ботанических садов. В настоящее время использование культуры изолированных клеток и тканей для сохранения генофонда растений приобретает все большее значение [1, 5, 9, 12, 13]. Особую значимость представляет изучение возможностей сохранения в условиях *in vitro* видов растений, естественное возобновление которых в природе ослаблено или затруднено. Для таких видов от устойчивости воспроизводства зависит сохранность их генофонда в целом.

Целью данной работы является формирование, сохранение коллекции *in vitro* и изучение биологических особенностей растений на всех этапах культивирования. Объекты исследований - ценные и редкие виды растений.

### Объекты и методы исследования

В настоящей работе представлена информация о генетическом банке *in vitro* ГБС РАН, в котором сохраняются представители культурных и дикорастущих видов растений. Исходным материалом для включения таксонов в банк *in vitro* являются семена и фрагменты вегетативных органов растений из природных мест обитания и полученные из коллекций ботанических учреждений.

Методы исследования основывались на классических приемах работы с культурами изолированных тканей и органов растений [1]. В процессе исследований измеряли длину побегов, корней и рассчитывали коэффициент размножения, органогенетический индекс и эффективность микроразмножения.

Математическую обработку экспериментальных данных осуществляли стандартными методами [3].

### Результаты и обсуждение

Генетический банк растений *in vitro* ГБС РАН является самым представительным в России и содержит около 1200 наименований: 150 видов, 1150 культиваров и отборных форм из 59 семейств. При этом более 70% в его составе относится к фиторесурсным видам. Наиболее полно представлены семейства: Actinidiaceae, Asteraceae, Caprifoliaceae, Ericaceae, Liliaceae, Oleaceae, Rosaceae (рис. 1).

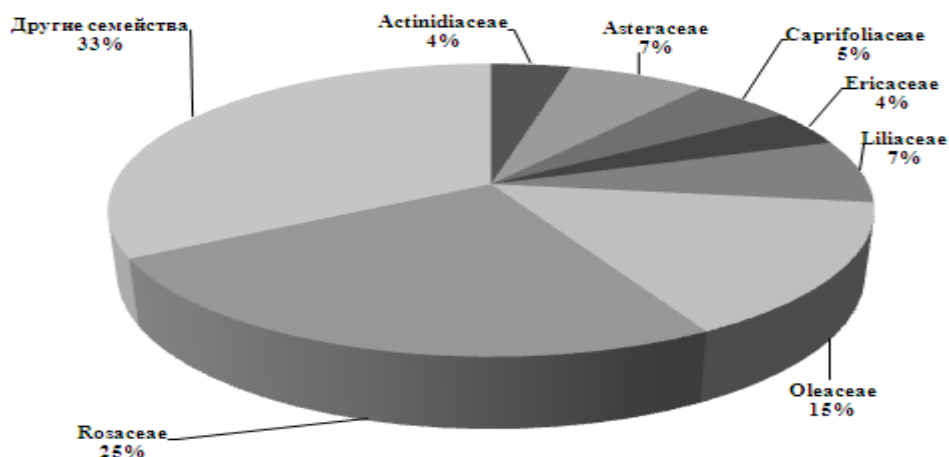


Рис. 1 Количественный состав наиболее представительных семейств в генетическом банке *in vitro* ГБС РАН

В настоящее время проводятся комплексные исследования с лекарственными растениями *Codonopsis lanceolata* Benth., *Chamerion angustifolium* L. Holub., *Potentilla alba* L., *Panax ginseng* C.A. Mey.

С целью выявления наиболее перспективных видов и сортов декоративных, лекарственных, а также редких и исчезающих растений для введения в культуру *in vitro*, проводится массовый скрининг коллекционных фондов ботанических и селекционных учреждений.

При формировании генетических банков видов растений в качестве исходного материала предпочтительно использовать семена. В экспериментальной работе с семенами многих видов возникает такая проблема, как покой семян и его преодоление. Метод культивирования *in vitro* позволяет значительно сократить срок выведения семян из покоя. Необходимо учитывать биологию семян (тип покоя, разнокачественность, жизнеспособность, сезонные колебания в ритмах прорастания и т.д.) и другие характеристики размножаемых видов, такие как жизненная форма, преобладающий способ размножения, устойчивость в культуре и др. [4]. Использование культуры изолированных зародышей позволяет частично или полностью снять необходимость стратификации и соответственно сократить период прорастания семян. Критерием выбора сроков изоляции зародышей является достижение ими стадии относительной автономности. На модельных представителях семейства Iridaceae показано, что оптимальным сроком изоляции зародышей является период 50-60 дней после опыления (стадия дифференциации осевых органов), обеспечивающий максимальный выход регенерантов – 72,5% [8].

При разработке и оптимизации методики клонального микроразмножения для каждого таксона необходимо определить стратегию исследования: выбрать модель размножения и тип экспланта, подобрать условия, способствующие реализации его

морфогенетического потенциала. Правильный выбор модели размножения, состава питательных сред и условий культивирования позволяет свести к минимуму риск появления соматоклональных вариантов.

Выбор оптимальной модели культивирования *in vitro* и особенности клонального микроразмножения растений различных таксономических групп тесно связаны с их биологическими особенностями. Изучение биологических особенностей видов растений в природных условиях и в коллекциях ботанических садов служит основой для разработки биотехнологических приемов их культивирования с целью дальнейшего устойчивого воспроизводства. При изучении представителей семейств Oleaceae, Actinidiaceae, Rosaceae и др. прослеживается корреляция между динамикой роста при интродукции и темпами развития регенерантов в культуре *in vitro* [9].

Растения, относящиеся к разным таксонам, отличаются уровнем тотипотентности клеток и регенерационным потенциалом. Это обуславливает необходимость дифференцированного подхода к разработке методик клонального микроразмножения. Основным методом, используемый нами при размножении *in vitro* (активация развития существующих в растениях пазушных меристем) обеспечивает устойчивое воспроизводство и генетическую идентичность исходным формам.

Морфолого-анатомический анализ эксплантов показал, что образующиеся *in vitro* побеги являются по происхождению аксиллярными, то есть развиваются из уже существующих на момент начала эксперимента пазушных меристем растений. Активизация деятельности клеток пазушных меристем происходит через прямой органогенез, минуя стадию каллусообразования [7]. Для каждой жизненной формы характерна, в частности своя продолжительность деятельности верхушечной меристемы в онтогенезе и сроки перехода растения от вегетативного состояния к репродуктивному [11]. Для успешной регенерации меристем необходимо наличие субапикальной части конуса нарастания с 2-3 листовыми примордиями (минимальное количество сопутствующих органов, которое должно остаться с меристемой). В период активного роста конус нарастания, значительно увеличивается по сравнению с периодом первоначальной фазы роста, форма и размеры его могут служить показателями способности верхушечной меристемы к выполнению органобразовательной функции и критериями для оценки регенерационной способности в культуре *in vitro*.

На основании изучения морфогенетических процессов в эксплантах древесных растений показано, что в культуре *in vitro* происходит реализация органогенного потенциала зачатков пазушных почек. На представителях родов *Syringa* L. и *Rhododendron* L. установлена тесная взаимосвязь между емкостью почек интактных растений и коэффициентом размножения в культуре *in vitro*. Обоснована возможность прогнозирования регенерационного потенциала в условиях *in vitro* на основе морфологического анализа вегетативных почек древесных растений [2] (табл. 1).

Успех применения любого метода определяется изучением условий, необходимых для его реализации. Это тем более важно 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.

Основными факторами, определяющими процесс органогенеза, являются: эпигенетические характеристики клеток экспланта, физиологическое состояние интактных растений, сроки изоляции экспланта, состав питательной среды и условия культивирования [9]. Степень влияния каждого из названных факторов зависит от

генотипа. Генотипом определяются пределы изменчивости регенерационной способности эксплантов и количество формирующихся растений *in vitro*.

Таблица 1

**Коэффициент размножения рододендронов *in vitro* в зависимости от емкости почек**

Вид	Емкость почки	Коэффициент размножения (Кр)	Коэффициент корреляции (Кг)
<i>Rh. brachycarpum</i> D.Don	6,7	1,9	0,81**
<i>Rh. catawbiense</i> Michx.	7,3	4,0	0,90**
<i>Rh. ledebourii</i> Pojark.	10,0	12,0	0,87**
<i>Rh. japonicum</i> (A.Gray) Valck.Sur.	9,0	9,5	0,95**
<i>Rh. roseum</i> (Loisel) Rehd.	9,6	11,8	0,82**

Примечание

Критическое значение Кг при различных уровнях значимости: 0,63 – 95% уровень значимости (\*); 0,77 – 99% уровень значимости (\*\*)

В процессе исследований изучено влияние типа экспланта, сроков его изоляции и физиологического состояния интактных растений на регенерационную способность модельных видов. Для большинства изученных растений оптимальным сроком изоляции эксплантов является фаза начала активного роста (апрель-май). Выход жизнеспособных эксплантов при этом составляет 85% [8].

Одним из важных факторов, который оказывает влияние на процессы морфогенеза органов и тканей растений *in vitro* является состав питательной среды [6, 9, 10]. В наших исследованиях для большинства изученных таксонов положительные результаты получены на питательной среде *Quoirin-Lepoivre* [14]. Питательная среда *Quoirin-Lepoivre* успешно применялась для культивирования большинства плодово-ягодных культур [9].

При культивировании *in vitro* чаще всего в качестве источника углеводного питания используют сахарозу в концентрации 20-40 г/л. В наших исследованиях при культивировании представителей родов *Actinidia*, *Clematis*, *Rosa*, *Rubus* положительный эффект получен при использовании глюкозы. У всех изученных сортов выявлена тенденция увеличения коэффициента размножения и длины микропобегов при культивировании на питательной среде, содержащей глюкозу (рис. 2, 3).

Тканевая принадлежность или эпигенетические характеристики экспланта, использованные при получении культуры тканей различных культур, в значительной степени определяют морфогенетический потенциал формирующихся регенерантов. На модельных представителях семейства Ericaceae показано, что в качестве первичных эксплантов наиболее эффективно использовать верхушки стерильных проростков и терминальные почки побегов текущего года [9].

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 осмотиков и ретардантов значительно увеличивало как период субкультивирования, так и жизнеспособность эксплантов в процессе хранения *in vitro*. Оптимальными условиями сохранения для растений-регенерантов изученных семейств являются ½ MS + 0,3 ВАР, пониженная температура (3-7°C) и слабая освещенность (1200-2500 лк) [4, 7, 8].

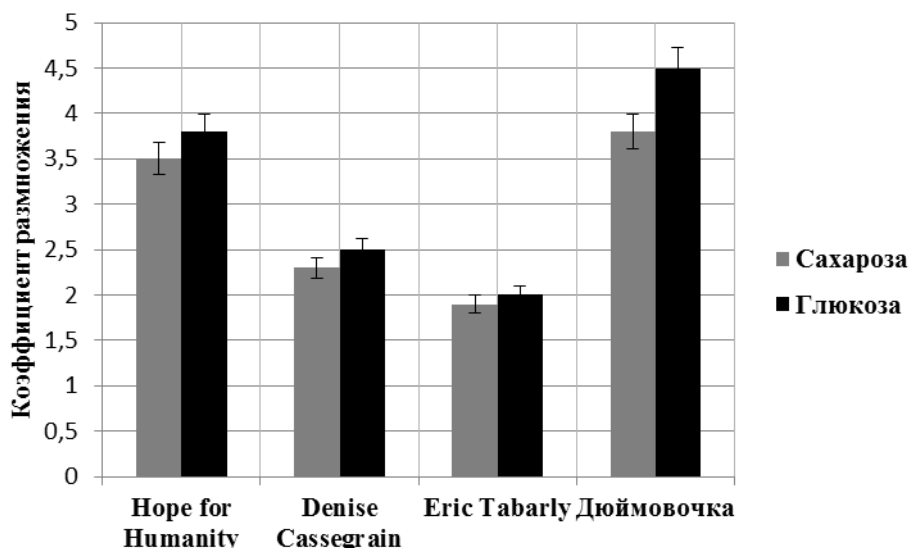


Рис. 2 Влияние типа углевода на коэффициент размножения сортов роз

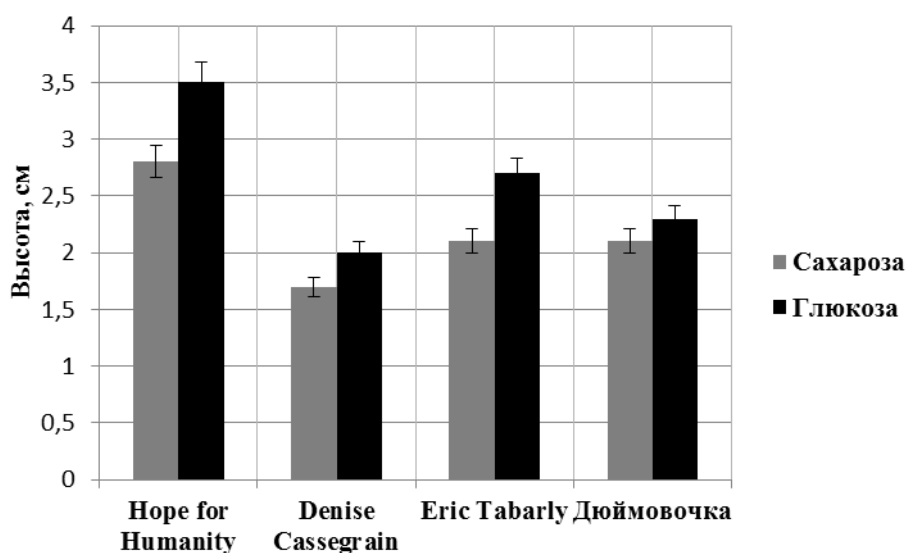


Рис. 3 Влияние типа углевода на высоту микропобегов сортов роз

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*. Для древесных и полудревесных растений – это фрагменты побегов, содержащие один - два метамера, для наземных трав – почки возобновления. Для луковичных растений, представителей семейств Alliaceae, Amarilidaceae, Hyacinthaceae, Liliaceae – микролуковички или их сегменты, для представителей семейства Orchidaceae – протокормы (рис. 4).

На наш взгляд, необходимо рассматривать сохранение коллекций *in vitro* как важнейший дополнительный метод в комплексе мер сохранения растений *ex situ*. Особое внимание должно быть уделено генетической репрезентативности и сохранению генетической чистоты таксонов, сохраняемых *in vitro*.

Предполагается создать ДНК-банк ценных, редких и исчезающих видов растений, подкрепленный гербарными образцами и единую интерактивную базу данных по генетическим коллекциям в различных ботанических садах.

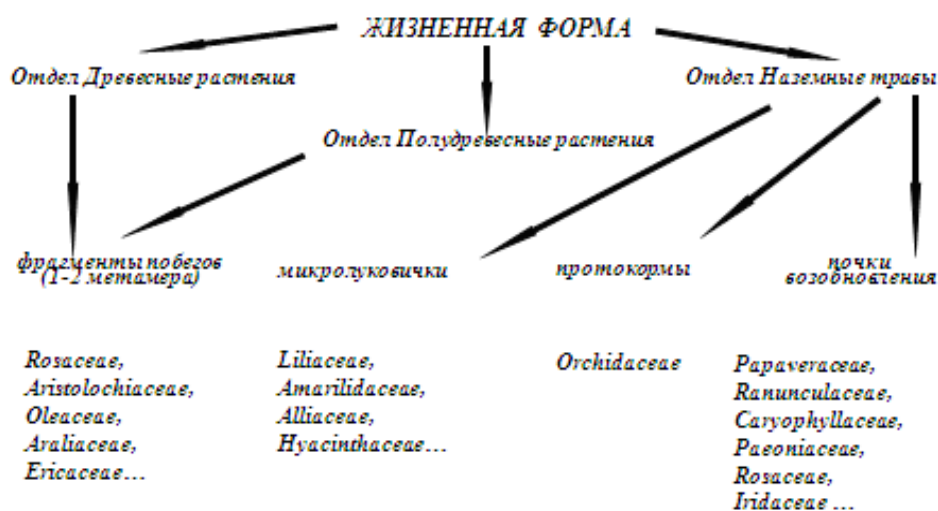


Рис. 4 Схема сохранения растений в условиях *in vitro* (оптимальный тип экспланта для депонирования)

### Выводы

При формировании коллекций *in vitro* используется наиболее важный принцип сохранения биоресурсов *ex situ* – представление вида максимально возможным количеством образцов, происходящих из различных точек ареала.

Для устойчивого воспроизводства растений определены оптимальные экспланты (апикальная меристема с листовыми примордиями). Обоснована возможность прогнозирования регенерационного потенциала в условиях *in vitro* на основе морфологического анализа вегетативных почек древесных растений

При изучении представителей семейств Oleaceae, Actinidiaceae, Rosaceae и др. прослеживается корреляция между динамикой роста при интродукции и темпами развития регенерантов в культуре *in vitro*.

У представителей родов *Actinidia*, *Clematis*, *Rosa*, *Rubus* выявлена тенденция увеличения коэффициента размножения и длины микропобегов при культивировании на питательной среде, содержащей глюкозу.

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*. Для древесных и полудревесных растений – это фрагменты побегов, содержащие один – два метамера, для наземных трав – почки возобновления. Для луковичных растений, представителей семейств Alliaceae, Amaryllidaceae, Hyacinthaceae, Liliaceae – микролуковички или их сегменты, для представителей семейства Orchidaceae – протокормы.

В дальнейшем на национальном и международном уровнях планируется создание новых и укрепление существующих генетических банков растений *in vitro* и расширение на их основе исследований в области оценки, изучения и сохранения растительных ресурсов и созданию общих баз данных по существующим коллекциям *in vitro*.

### Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

2. Васильева О.Г. Биолого-морфологические основы клонального микроразмножения некоторых представителей рода *Rhododendron* L. Автореф. канд. дисс. М., 2009. – 20 с.
3. Доспехов Б.А. Методика опытного дела. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
4. Ишмуратова М.И., Ткаченко К.Г. Семена травянистых растений: особенности латентного периода, использование в интродукции и размножении *in vitro*. – Уфа: Гилем, 2009. – 116 с.
5. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – К.: Аграрна наука, 2011. – 344 с.
6. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Браилко В.А., Лесникова-Седошенко Н.П. Биотехнологические и физиологические особенности культивирования *in vitro* ценных генотипов розы эфиромасличной // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2015, № 2 (13). – С. 38-48.
7. Молканова О.И., Чурикова О.А., Коновалова Л.Н., Окунева И.Б. Клональное микроразмножение интродуцированных сортов *Syringa vulgaris* L. // Вестник МГУ. – 2002. – № 4. – С. 8-14.
8. 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.
9. 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. – 2015. – Вып. 201. – С. 78-82.
10. Муратова С.А. Соловых Н.В., Терехова В.И. Индукция морфогенеза из изолированных соматических тканей растений / С.А. Муратов. – Мичуринск: Изд-во МичГАУ, 2011. – 107 с.
11. Ростовцева З.П. Верхушечная меристема высших растений. Лекция из курса Биология развития растений. – М.: Издательство МГУ, 1963. – 59 с.
12. Cruz-Cruz C.A., Gonzalez-Arno M.T., Engelmann F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity // Resources. – 2013. – N 2. P. 73-95.
13. Fay M.F. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods // *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. – Plant. – 1992. – V. 28, N 1. – P. 1-4.
14. Quoirin M., Lepoivre P. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. // *Acta Hort.* – 1977. – V. 78. – P. 437-442.

Статья поступила в редакцию 30.08.2016 г.

**Molkanova O.I., Konvalova L.N., Stakheyeva T.S. Propagation and conservation characteristics of valuable and rare species collection *in vitro*** // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 17-23.

The application of isolated plant tissue and organs is getting more and more actual along with traditional plant *ex situ* conservation methods. The most efficient technologies of clonal micropropagation were improved for more than 150 plant species and 1150 variety and forms related to 59 families. The development of reproduction plants methods is the basis of gene pool preservation. Optimum explants were determined for sustainable reproduction of plants (apical meristem with leaf primordia). Scientific and methodological bases for creation and conservation of rare and valuable plants in gene pools *in vitro* are in the stage of development. Most of the collection angiosperm genotypes is stored under conditions of reduced growth rate (3-7°C). The most important factors effecting on storage period *in vitro* were revealed as well. Creating gene banks, scientists pay special attention at representativeness and conservation of genetic stability of plant species.

**Key words:** biological diversity; stable reproduction; meristematic complex; organogenesis; bank in vitro.