

УДК 573.6:58.08

**Е.В. МАЛАЕВА**

(Волгоград)

## **СОХРАНЕНИЕ РЕДКИХ И ЦЕННЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ МЕТОДАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ**

*В результате исследований оптимизированы условия культивирования редких и ценных культур на разных этапах клонального микроразмножения. Подобраны оптимальные условия культивирования (тип и концентрация гормонального состава питательной среды) на этапе микроразмножения и укоренения. Создана коллекция *in vitro* редких и ценных видов растений (около 200 наименований).*

**Ключевые слова:** *in vitro*, клональное микроразмножение, питательные среды, пролиферация, укоренение *in vitro*, адаптация, редкие виды, биоразнообразие.

---

**ELENA MALAEVA**

(Volgograd)

## **CONSERVATION OF RARE AND VALUABLE PLANT SPECIES BY BIOTECHNOLOGY METHODS**

*As a result of the researches, there are optimized the conditions of the cultivation of rare and valuable cultures at the different stages of clonal micropropagation. The optimum storage conditions (types and concentration of hormone in nutrient medium) in the shoot micropropagation and rhizogenesis have been found. The collection *in vitro* samples of rare and valuable species (about 200 items) was created.*

**Key words:** *in vitro*, clonal micropropagation, feed medium, proliferation, rootage *in vitro*, adaptation, rare species, biodiversity.

Методы биотехнологии становятся все более актуальными и востребованными во всем мире для сохранения генофонда редких и ценных видов растений. Создание коллекций стерильных культур *in vitro* является одним из перспективных направлений сохранения биоразнообразия растений. Данные коллекции служат не только источником сохранения биоразнообразия, но и активно используются для обмена между ботаническими садами разных стран. Кроме того, их можно рассматривать как одну из форм охраны растений и как эффективный метод сохранения биоразнообразия *ex situ* – составной части общей национальной стратегии охраны растений, направленной на сохранение видов в природе [2, 5, 7].

Сегодня возникает потребность в выращивании культур, которые содержат в большом количестве витамины и биологически активные вещества.

К ним по праву можно отнести жимолость (*Lonicera L.*, *honeysuckle*), актинидию (*Actinidia Lindl.*) и малину (*Rubus L.*).

В настоящее время активно ведутся работы по разработке технологий культивирования *in vitro* редких и ценных видов растений, занесенных в Красную книгу РФ и региональные Красные книги в ботанических учреждениях нашей страны.

Следует отметить, что работы в области культуры ткани для решения проблем сохранения генофонда растений имеют свою методологию и особенности. Выбор модели размножения *in vitro* растений различных таксономических групп зависит от их биологических особенностей. Именно изучение биологии видов в природе или в условиях ботанического сада, служит базой для разработки и усовершенствования биотехнологических методов и приемов культивирования *in vitro*.

В работе придерживались как общепринятых в биотехнологии методов [1], так и методов по стерилизации эксплантов, разработанных на базе лаборатории биотехнологии Волгоградского ре-

гионального ботанического сада [3]. Условия стерилизации исходного растительного материала определяли экспериментально для каждой исследуемой культуры. Отрабатывали тип стерилизующего агента, его концентрацию и время экспозиции. Наиболее эффективным препаратом для освобождения от эндогенной и экзогенной микрофлоры является раствор «Лизоформин 3000» и 96%-й этиловый спирт (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH). Экспланты культивировали на модифицированной питательной среде с минеральной основой по прописи Мурасиге и Скуга [9]. В качестве регуляторов роста на этапе микроразмножения использовали цитокинины и ауксины в различных концентрациях, что представлено в обсуждениях результатов исследования. В процессе исследования измеряли коэффициент размножения (количество побегов/на эксплант, шт), количество и длину корней.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Office Excel. Результаты исследования достоверны при  $p < 0,05$ .

При работе с редкими и ценными видами растений *in vitro*, в том числе занесенных в Красную книгу Российской Федерации и региональные Красные книги руководствовались следующими принципами:

1. введение в культуру *in vitro* видов с высокой категорией статуса редкости 1 и 2; на этапе отработки технологии размножения *in vitro* использовали виды с категорией 2 и 3.
2. Практическая значимость видов (пряно-ароматические, лекарственные, декоративные и др.
3. Виды, для которых технологии размножения *in vitro* не разработаны или требуется ее усовершенствование.

При выборе экспланта необходимо также учитывать возраст, его строение и происхождение. Чем сложнее устроено растение, например, травянистые многолетники (*Artemisia hololeuca*, *Helianthemum nummularium*, *Hypericum xylosteifolium*), тем больше эксплантов возможно изъять для введения в культуру *in vitro*, и шире диапазон их морфогенетических реакций в культуре *in vitro*.

В настоящее время разработано достаточно много схем и протоколов по стерилизации растительных клеток и тканей, которые определяются спецификой культуры и типом экспланта. Для получения стерильной культуры таких культур, как актинидия, малина, жимолость использовали следующую схему стерилизации: «Лизоформин 3000» в концентрации 3 и 5%, время экспозиции варьировала от 1 до 7 минут (табл. 1).

Таблица 1

#### Выход жизнеспособных эксплантов ягодных культур в зависимости от режима стерилизации

| Режим стерилизации           | Выход стерильных эксплантов, % |                 |              |
|------------------------------|--------------------------------|-----------------|--------------|
|                              | <i>Actinidia</i>               | <i>Lonicera</i> | <i>Rubus</i> |
| «Лизоформин 3000» 3%, 5 мин. | 40                             | 30              | 50           |
| «Лизоформин 3000» 3%, 7 мин. | 60                             | 60              | 50           |
| «Лизоформин 3000» 5%, 1 мин. | 60                             | 60              | 50           |
| «Лизоформин 3000» 5%, 3 мин. | 90                             | 80              | 80           |
| «Лизоформин 3000» 5%, 5 мин. | 70                             | 50              | 70           |

В результате исследований подобран оптимальный режим стерилизации: «Лизоформин 3000» в концентрации 5%, время экспозиции 3 минуты. Данная схема стерилизации позволила получить максимальный выход жизнеспособных эксплантов для малины и жимолости до 80%, до 90% для актинидии [4].

В настоящей работе использовали цитокинины 6-БАП (6-бензиламинопурин), К (кинетин), Z (зеатин), 2iP (2-изопентиниламинопурин) в различных концентрациях от 0,5 до 3,0 мг/л и в сочетании с ауксинами β-индолилуксусная кислота (ИУК) и β-индолилмасляная кислота (ИМК). Продолжительность каждого субкультивирования составляла 20–30 дней

На этапе микроразмножения из всех исследуемых цитокининов наибольший коэффициент размножения, наблюдали при использовании 6-БАП в концентрации 0,5–1 мг/л. Дальнейшее использование для редких видов концентрации 6-БАП в концентрации выше 1,0 мг/л является не целесообразным, так появлялось большое количество аномалий побегов, т. е. витрификация.

На этапе укоренения использовали следующие ауксины:  $\beta$ -индолилуксусная кислота (ИУК),  $\beta$ -индолилмасляная кислота (ИМК) и  $\gamma$ -гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК). Побегии разных культур специфично реагируют на тип ауксина и его концентрацию. Чаще всего оптимальная концентрация ауксинов в пределах 0,5–5,0 мг/л [4].

Побеги изученных культур специфично реагировали на тип ауксина и его концентрацию. Наиболее оптимальным ауксином является ИУК, по сравнению с ИМК и ГАМК в концентрации от 0,3 до 3,0 мг/л.

Для редких видов растений, каких как Клоповник Мейера (*Lepidium meyeri*), копеечник крупноцветковый, меловой и Разумовского (*Hedysarum grandiflorum*, *H. cretaceum* и *H. razoumovianum*) наблюдали положительный эффект в виде увеличения коэффициента размножения при использовании 6-БАП в сочетании с ИУК. Так, максимальный коэффициент размножения на средах с 6-БАП в концентрации 1 мг/л варьировал от  $18 \pm 0,7$  до  $23 \pm 0,9$ . При использовании 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л в сочетании с ИУК в концентрации 0,1 мг/л коэффициент размножения для этих видов достигал  $32 \pm 0,4$ .

Важным показателем при размножении *in vitro* редких и ценных видов является количество пассажей. Следует отметить, что темпы развития эксплантов при культивировании разных видов существенно отличаются. Так, для представителей семейства *Asteraceae* максимальный коэффициент размножения наблюдали на 2–3 пассаже, он составил –  $11 \pm 0,7$  для представителей семейства *Fabaceae*, максимальный коэффициент размножения наблюдали на 7–8 пассаже, он составил  $6,0 \pm 0,3$ .

Для редких видов растений наблюдали значительную разницу по проценту укоренения, которая зависела не только от концентрации и типа ауксина, так и от видовой принадлежности. Причем, чем более эволюционно высокое положение занимает семейство и соответственно вид, тем ниже коэффициент размножения и процент укоренения и наоборот: чем ниже в эволюционной иерархии семейство, тем выше коэффициенты размножения.

Наш опыт по укоренению редких видов растений показал, что при использовании полной минеральной основы MS требуются более высокие концентрации ауксинов – от 1,0 мг/л. Использование обедненных питательных сред – Уайта,  $\frac{1}{2}$  MS позволяют снизить концентрацию ауксинов – от 0,1 до 0,5 мг/л [3].

Кроме того, в процессе культивирования на стадии пролиферации у побегов разных видов актинидии также наблюдали спонтанное укоренение. При этом частота укоренения зависела, в частности, от вида растения. В среднем процент спонтанного образования корней у разных видов актинидии достигал 60%. Таким образом, в технологии клонального микроразмножения актинидии можно миновать этап укоренения *in vitro*, перейти к этапу адаптации, что экономически весьма выгодно и оправдано.

Спонтанное образование корней на стадии укоренения *in vitro* наблюдали для ряда однодольных растений семейств *Iridaceae* и *Liliaceae*, которое достигало 90%.

Технология клонального микроразмножения складывается из этапа, который проходит в стерильных условиях (*in vitro*) и не стерильных условиях (*ex vitro*). В основе этих этапов лежит морфогенетический потенциал культуры тканей и структурно-физиологические механизмы адаптации регенерантов.

При разработке технологии клонального микроразмножения перевод растений из *in vitro* в условия *ex vitro* является наиболее трудоемким.

На этапе адаптации нами разработана следующая схема:

1) 1–2 неделя поддержание относительной влажности 75–80%; для этого использовали пищевую пленку или нетканый материал лутрасил и ежедневное проветривание в течении 20–30 минут и освещенность не менее 5000 Лк.

2) 3–4 неделя пищевая пленка перфорируется, механически для адаптации устьичного аппарата растений-регенерантов; на 5-й неделе пленка убирается;

3) через 2–3 месяца адаптации растения готовы к пересадке в открытый грунт или доращивание в контейнерной культуре.

Через 2–3 месяца адаптации в условиях оранжереи, растения можно переносить в открытый грунт. Основным субстратом для своих исследований используем торф, песок и почву в соотношении 1:1:2. Выращивание регенерантов на данном субстрате, позволяет получить выход адаптированных растений в среднем 70–95%.

На наш взгляд, комплексное сохранение растений невозможно рассматривать без сохранения в коллекциях *in vitro*.

### Литература

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999.
2. Конвенция о биологическом разнообразии: Текст и прил. NEP/CBD/COP/8/12, 2006.
3. Малаева Е.В. Сохранение редких видов растений в коллекции *in vitro* Волгоградского регионального ботанического сада // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. 2019. № 18. С. 606–610.
4. Малаева Е.В., Коновалова Л.Н., Молканова О.И. Использование биотехнологических методов для ускоренного размножения ягодных культур // Плодоводство и ягодоводство России. 2016. Т. 45. С. 103–108.
5. Малаева Е.В., Супрун Н.А., Коротков О.И. [и др.] Генетический банк редких и ценных видов растений Волгоградского регионального ботанического сада // Вестник Волгоград. гос. ун-та. Сер. 3. Экономика. Экология. 2008. № 2(13). С. 253–257.
6. Молканова О.И. Использование биотехнологических методов для размножения и сохранения редких видов растений // Бюллетень Главного ботанического сада. 2017. № 1(203). С. 42–48.
7. Стратегия ботанических садов России по сохранению биологического разнообразия растений. М.: Красная Звезда, 2003.
8. Mitrofanova I.V., Molkanova O.I. Biotechnology strategy of plant biodiversity conservation in botanical gardens of Russia // Acta Horticulturae. 2020. Т. 1298. С. 231–238.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Phsiol. plant. 1962. Vol. 15. № 3. P. 473–497.