

Раздел 3  
**БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ**

УДК 631.523:634.1:635.9

doi: 10.31360/2225-3068-2022-83-133-144

**HELLEBORUS CAUCASICUS A. BR.:  
БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ  
И МЕТОДЫ ЕГО СОХРАНЕНИЯ  
(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

**Цатурян Г.А., Маляровская В.И.**

Федеральный исследовательский центр  
«Субтропический научный центр Российской академии наук»,  
г. Сочи, Россия, e-mail: malyarovskay@yandex.ru

В статье на основе современной литературы обоснована актуальность и необходимость сохранения редкого, эндемичного вида природной флоры Северо-Западного Кавказа *Helleborus caucasicus* A. Br. Кратко приведены сведения по систематике и географическому распространению *H. caucasicus*. Дано описание биологических и морфологических особенностей данного вида. Также в связи с тем, что вид имеет категорию и статус 3 УВ «Уязвимые», редкий, «находящийся в состоянии, близком к угрожаемому», и остро стоит проблема его сохранения, проанализированы и приведены сведения по введению в стерильные условия морозника кавказского, а также других видов рода *Helleborus* L., представлены различные приёмы их микроразмножения и сохранения в культуре *in vitro*. Приведено описание эффективного способа стерилизации эксплантов, который позволяет значительно упростить процесс получения стерильной культуры. Показано, что для введения в культуру лучшими эксплантами являются побеги и семена растений. Обзор рассматривает также вопросы оптимизации питательных сред и регуляторов роста для ускоренного процесса микроразмножения *H. caucasicus* и других видов морозника. Приведены оптимальные субстраты на этапе адаптации микро-размноженных растений морозников к нестерильным условиям. Полученные экземпляры используют для пополнения коллекций, которые являются основой для создания генетических банков *in vitro* редких и исчезающих видов растений. Протоколы, описанные в литературе, позволяют нам разработать оптимальные условия для введения в культуру *in vitro*, сохранения и размножения редкого вида природной флоры морозника кавказского.

**Ключевые слова:** *Helleborus caucasicus*, редкий вид, микроклональное размножение, *in vitro*, питательная среда, регуляторы роста, стерилизация, сохранение биоразнообразия.

*Helleborus caucasicus* A. Br. (морозник или зимовник кавказский) многолетнее травянистое вечнозелёное растение, относится к роду *Helleborus* L. и принадлежит к семейству лютиковых Ranunculaceae Juss., к которому относятся еще около 22 видов. Распространён в разных частях Европы, Предкавказья, Кавказа, Северного Ирана и Малой Азии [5]. Название рода произошло от латинизированных заимствований из древнегреческого Helleboros – от *hellein* – убивать и *bora* – кушанье, пища; указывает на его ядовитость [2]. Данный род был описан А. Брауном в 1853 г. В своей работе «Index seminum Hort Berol.» он даёт подробное описание 4 видам морозника: *H. caucasicus*, *H. abhasicus* A.Br., *H. ponticus* A. Br., *H. guttatus* A. Br. et Sauer [6]. Однако это описание среди ботаников вызвало ряд дискуссий в силу несущественности морфологических отличий между видами. Так, по мнению профессора И.М. Крашенинникова (1937), на Кавказе обитает три самостоятельных вида морозников: *H. abchasicus* – эндемик Западного Закавказья, *H. guttatus* – эндемик Восточного Закавказья и *H. caucasicus*. – широко распространён на Кавказе и в Малой Азии [18]. По данным другого автора (А.С. Зернов, 2002) на Кавказе произрастает единственный кавказско-эвксинский вид – *H. caucasicus*. Позже Зернов А.С. (2006) всё-таки указывает на возможность признания видовой самостоятельности *H. caucasicus* [11].

П.В. Кирий отмечает, что морозник кавказский – растение широколиственных и хвойных лесов, произрастает в нижнем поясе гор, на склонах, в ущельях и долинах рек, предпочитая полутеневое местообитание [15]. Вид включён в Красную книгу Краснодарского края, имеет категорию и статус 3 УВ «Уязвимые», как редкий вид, «находящийся в состоянии, близком к угрожаемому» [17]. Является гляциолярным реликтом, остатком мезофильной флоры. Эвксинский вид и третичный реликт, имеющий изолированные участки ареала [12]. По данным Чукуриды (2009) численность морозника кавказского сокращается в результате вырубki широколиственных лесов Черноморского побережья, сбора цветов на букеты, выкопки корневищ в качестве лекарственного средства [32]. Охраняется в Кавказском государственном природном биосферном заповеднике имени Х.Г. Шапошникова, в ФГБУ «Сочинский национальный парк», заказнике «Камышанова поляна». В Краснодарском крае произрастает в Горячключевском районе и на Черноморском побережье. В окрестностях г. Сочи встречается в виде насаждений в селах Красная Воля и Воронцовка Хостинского района [23]. В Республике Адыгея *H. caucasicus* A. Br. встречается в широколиственных лесах во влажных условиях [16]. На территории Республики Абхазии его наибольшее распространение наблюдается в Гагрском,

Гудаутском, Гулрыпшском и Очамчырском районах [15]. В Чеченской республике растения этого вида встречаются в окрестностях с. Ведено, также несколько популяций произрастают в дубово-грабовых лесах около Джалки и Чечен-Аула [24]. Здесь в основном проходит восточная граница ареала *H. caucasicus* на Северном Кавказе. В то же время вид отмечен в Тляратинском р-не Республики Дагестан, на границе с Тушетией (Грузия) [27]. По данным А.С. Зернова (2006) ареал обитания *H. caucasicus* охватывает Кавказ, Северную Турцию и на Западе достигает Греции [11] (рис. 1.).

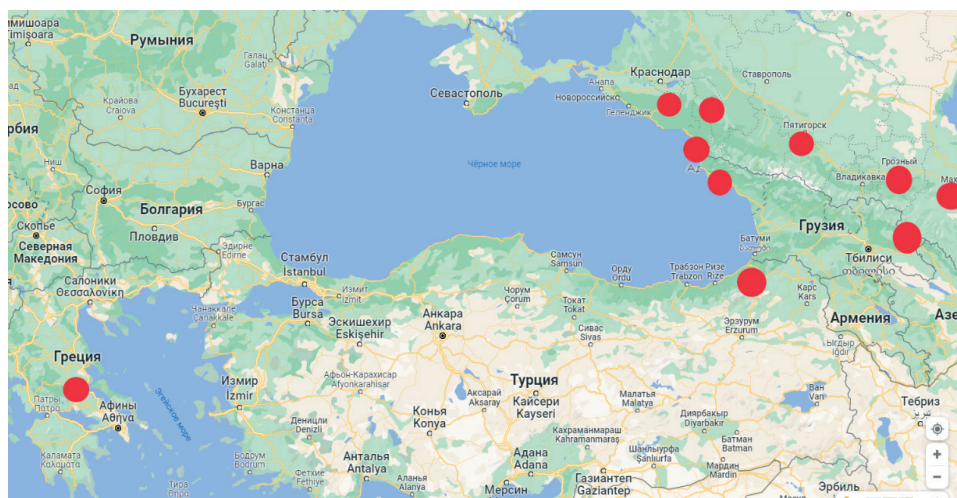


Рис. 1. Распространение вида *Helleborus caucasicus* A.Br.

Морфо-биологические особенности *H. caucasicus* следующие: высота растений достигает 50 см, корневища толстые короткие, которые имеют многочисленные придаточные корни. Надземная часть растения состоит из 2–4 крупных прикорневых пальчато-рассечённых кожистых листьев (28–30 см в диаметре) с пальчато-зубчатым краем и короткой цветочной стрелки, несущей 1–4 цветка. Цветки у морозника кавказского актиноморфные в диаметре до 5 см, с простым околоцветником, разной окраски (от зелёной до розовой). Листочки околоцветника зеленовато-желтоватого цвета и перекрывают друг друга краями. В каждом плодолистике несколько семязачатков, чёрного цвета до 5 мм длиной [14]. Раннецветущее растение, цветёт зимой и ранней весной – с января по апрель, плодоносит в мае-июне [16].

Известно, что использование морозника кавказского для медицинских целей имеет давнюю традицию. Лечебные свойства растений были известны еще в Древней Греции, и также широко использовались

в восточной, тибетской и восточноевропейской медицине [15]. В состав *H. caucasicus* входят алкалоиды, сердечные гликозиды, флавоноиды, сапонины, эфирные масла, кумарины и витамины. По данным В. Петкова (1988), в его корнях и листьях содержатся стероидные сапонины, при гидролизе которых получен смилагенин [26]. В то же время, являясь ядовитым растением, содержит глюкозиды, наибольшее количество которых накапливается в корнях после осыпания плодов [13]. Вместе с тем в традиционной медицине он не получил широкого применения [31].

Благодаря блестящим тёмно-зелёным и жёстким рассечённым листьям, морозник декоративен круглый год, а не только в период цветения, поэтому часто используется в декоративном садоводстве [19].

Сохранение биоразнообразия растений является одной из актуальных задач природоохранной деятельности, которой уделяют большое внимание во всем мире [21]. Поэтому необходимо сохранение лекарственных, эндемичных, редких и исчезающих видов растений природной флоры, которые относятся к категориям «редкие» и «исчезающие» и внесены в Красные книги Краснодарского края и России [17]. Безусловно, что особого внимания в плане размножения и сохранения требует и морозник кавказский. В настоящее время при решении проблемы сохранения и восстановления генофонда редких и исчезающих видов растений успешно используются методы биотехнологии растений, включающие микроклональное размножение [3].

Известно, что микроклональное размножение имеет значительные преимущества перед традиционными методами размножения растений, особенно важно это для размножения растений с проблемным семенным или вегетативным размножением, а также для растений, представленных в единичных экземплярах [22]. Разработка методов микроклонального размножения является основой для создания генетических банков *in vitro* растений природной флоры, а также одним из перспективных направлений сохранения биоразнообразия в целом [9]. Полученные растения можно использовать для пополнения живых коллекций, реинтродукции и усиления ослабленных природных популяций лекарственных, редких и эндемичных видов [20]. При введении в стерильную культуру редких и исчезающих видов растений природной флоры необходимо учитывать многие факторы, среди которых особые потребности в компонентном составе питательных сред, которые часто необходимо модифицировать под определённый вид [41].

В известных нам литературных источниках содержится относительно немного сведений о микроклональном размножении различных видов морозников. Авторами предложены различные биотехнологические

приёмы их размножения в условиях *in vitro*. Так, по мнению некоторых авторов, успех введения в культуру *in vitro* во многом зависит от выбора экспланта, эффективности стерилизации и подбора питательных сред [43]. М. Seyring (2002) отмечает, что при введении в стерильные условия корневищ морозника часто наблюдается высокая контаминация [42]. Растительные ткани объекта могут служить серьёзным источником заражения, так как на их поверхности присутствуют различные бактерии и вирусы. Поэтому поверхностная стерилизация эксплантов растений от наружной инфекции является очень важным этапом при введении их в стерильные условия. Есть мнение, что длина растительных побегов при этом должна составлять не более 2–3 см [8]. Успех введения в культуру *in vitro* во многом определяется концентрацией и составом стерилизующих веществ, а также типом растительного экспланта. Чем нежнее растительные экспланты, тем меньше должна быть концентрация стерилизующего вещества, чтобы сохранить их жизнеспособность. Известно, что эндогенное заражение исходных эксплантов бывает намного сильнее, чем поверхностное [1, 28]. При стерилизации некоторые авторы, предлагают использовать двухступенчатую обработку, при которой экспланты сначала выдерживают в течение 2 секунд в 70%-ном этиловом спирте, а потом в течение 15 мин в 0,1–0,2%-ном растворе сулемы. При таком способе стерилизации были получены хорошо растущие культуры, способные в дальнейшем к образованию почек и развитию меристем [4]. Однако L.K. Caesar (2015) считает, что высокоэффективной стерилизации побегов морозника можно достичь при использовании других стерилизующих веществ, гипохлорита натрия (NaClO), перекиси водорода 3%-ной и 0,5%-ного раствора сулемы [34]. О.А. Чурикова (2015) отмечает успех введения в культуру *in vitro* незревших семян с использованием ещё не вскрывшихся плодов-листочков *H. caucasicus* A. Вг и *H. purpurascens* при предстерилизационной обработке фундазолом, 70%-ным этиловым спиртом 1–2 мин и 3%-ным раствором лизоформина 12–15 мин [33].

Большое значение имеет состав компонентов питательных сред, которые обеспечивают микропобеги необходимыми веществами для нормального роста и развития. Все питательные среды перед введением в культуру предварительно проходят стерилизацию под давлением в автоклаве для предотвращения заражения микроорганизмами [34].

В культуре *in vitro* чаще всего используют питательные среды по прописи Мурасиге и Скуга (МС), Гамборга (В5), Уайта и некоторые другие. Для многих видов растений, в том числе и для видов морозника, оптимальной является среда Мурасиге-Скуга [39]. Эта среда отличается

большим содержанием неорганических веществ, витаминов и их концентраций, которые стимулируют процессы органогенеза и соматического эмбриогенеза [29].

Так, Е. Gabryszewska (2017) предложила на этапе введения и микро-размножения морозника *H. purpurascens* в культуру использовать среду Мурасиге и Скуга с содержанием регуляторов роста 6-бензиламинопурина (БАП) 1,0 мг/л, 2-изопентиладенином (2-іР) 1,0 мг/л, что эффективно стимулировало морфогенные процессы и спонтанную укореняемость при пониженной температуре (+15 °С) [37]. В то же время О.А. Чурикова (2015) для размножения *H. caucasicus* и *H. purpurascens* использовала питательную среду, состоящую из 1/2 МС, витаминов и с добавлением довольно высокой концентрации цитокинина – 5 мг/л 6-бензиламинопурина [33]. Е. Dhooghe (2007), изучая морфогенные процессы при размножении пазушных почек четырёх видов *Helleborus*: *H. argutifolius*, *H. foetidus*, *H. niger* и *H. Orientalis*, применяла питательную среду на основе МС (Murashige and Skoog 1962) с добавлением 2-изопентиладенина (2-іР) и 6-бензиламинопурина, при этом коэффициент размножения в большей степени зависел от генотипа растения и варьировал от 1,3 для *H. foetidus* до 3,8 для *H. niger* [36]. R. Poupet с соавторами (2006), проводили размножение *Helleborus niger* на среде МС с добавлением 8,9 мкМ 6-бензиламинопурина, при этом коэффициент размножения микропобегов варьировал от 2 до 3,4 шт./эксплант в течение 24 месяцев [39].

В тоже время М. Seyring (2002) на этапе введения в условия *in vitro* культивировал верхушечные побеги *H. niger* на U-среде с добавлением 8,9 мкМ/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 2,7 мкМ /л нафталинуксусной кислоты, а эффективное размножение отмечено им на U-среде с добавлением 2,2 мкМ /л БАП и 2,9 мкМ /л гиббереллиновой кислоты [42].

Одним из важных этапов микро-размножения растений, является этап индукции корнеобразования. На этапе ризогенеза используют питательные среды с регуляторами роста ауксиновой природы, повышающие процент укоренения и улучшающие развитие корневой системы. Чаще всего используют природные регуляторы роста и их синтетические аналоги: природный ауксин – индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) и его синтетические аналоги индолил-3-масляную кислоту (ИМК),  $\alpha$ -нафтил-уксусную кислоту ( $\alpha$ -НУК). Они участвуют в регуляции процессов жизнедеятельности, в значительной мере определяя характер и темпы роста и развития эксплантов [25]. Так, М. Seyring (2002) получен высокий процент укоренения (96 %) микропобегов *H. niger* при использовании двух этапов укоренения, вначале в течение 15 дней

культивирование на питательной среде с 1,4 мкМ индолил-3-уксусной кислоты, затем в течение четырёх недель при повышенной концентрации 5,6 мкМ индолил-3-уксусной кислоты [42]. Однако этот же автор приводит другие данные успешности укоренения растений морозника (96,7 %) при добавлении в питательную среду 4,9 мкМ индолил-3-масляной кислоты [42].

Заключительным и наиболее ответственным этапом клонального микроразмножения является адаптация растений к нестерильным условиям. По сведениям E. Dhooghe (2007) адаптацию *H. niger* необходимо проводить одновременно с фазой укоренения. Ею предложено для индукции ризогенеза микропобегов морозника выдерживать их в растворе индолил-3-уксусной кислоты в концентрации 3 мг/л и нафталин-уксусной кислоты 1 мг/л при пониженной температуре (5 °C) [36]. Через неделю всходы готовы для пересадки в торфяно-песчаный субстрат в условия 100%-ной влажности [38]. По данным J.D. Lubell (2005) цветение размноженных через культуру *in vitro* растений морозника *H. niger* можно получить на второй год после посадки их в открытый грунт [38].

Как следует из приведённого нами обзора, накоплена довольно обширная информация по культивированию разных видов *Helleborus* L. в условиях *in vitro*. Однако для *H. caucasicus* сведения по сохранению и микроразмножению в условиях культуры *in vitro* в отечественной и зарубежной литературе немногочисленны и фрагментарны. Исходя из литературных данных, условия введения в стерильную культуру, состав питательных сред, состав регуляторов роста и т. д. у разных видов морозника могут значительно различаться. Поэтому для *Helleborus caucasicus* возникает необходимость подбора оптимальных условий для сохранения и размножения в условиях *in vitro*. Тем не менее, проведённый нами литературный обзор, в ходе которого проанализированы данные по теме, позволяет тестировать уже известные варианты оптимальных условий культивирования и модифицировать их конкретно для *H. caucasicus*.

Публикация подготовлена в рамках реализации  
ГЗ ФИЦ СХЦ РАН № FGWR-2022-0008

#### Список литературы

1. Беседина Е.Н. Усовершенствование метода клонального микроразмножения подвоев яблони *in vitro*. Автореф. канд. дис. Краснодар: КубГАУ, 2015.
2. Блинова К.Ф., Яковлева Г.П. Ботанико-фармакогностический словарь. Москва: Изд-во Высшая школа, 1990, 353 с. ISBN: 5-06-000085-0.
3. Ветчинкина Е.М., Ширнина И.В., Ширнин С.Ю., Молканова О.И. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro*, Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. 2012; 7 : 109-118.

4. Гранда Х.Р.К. Идентификация «В»-вируса хризантем и создание коллекции *in vitro* оздоровленного посадочного материала. Автореф. канд. дис. Москва: МСХА, 2009.
5. Гроссгейм А.А. Флора Кавказа. Москва: Изд-во АН СССР, 1949, 571 с.
6. Гроссгейм А.А. Флора Кавказа. Москва: Изд-во АН СССР, 1950, 424 с.
7. Гулия В.О., Орловская Т.В. Определение лабораторной всхожести семян различных вариаций *Helleborus caucasicus* и *Helleborus abchasicus*, Международный журнал экспериментального образования. 2015; 6 : 66-68.
8. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. М. Издательский центр «Академия», 2003, 208 с. ISBN: 978-6697-4.
9. Жолобова О.О., Коротков О.И., Сафронова Г.Н., Буганова А.В. Сохранение редких и исчезающих видов растений при помощи методов биотехнологии, Современные проблемы науки и образования. 2012; 1 : 195.
10. Зернов А.С. Определитель сосудистых растений севера Российского Причерноморья. Москва: Изд-во КМК. 2002, 283 с. ISBN: 5-87317-105.
11. Зернов А.С. Флора Северо-Западного Кавказа. Москва: Изд-во КМК. 2006, 664 с. ISBN: 5-87317-338-9.
12. Иванов А.Л. Флористические связи Западного Кавказа и Ставропольской возвышенности и их значение в понимании истории флоры Предкавказья: «Биосфера и человек»: сб. трудов межд. науч. конф., Майкоп, Адыг. гос. ун-т, 1999; 370. ISBN: 5-85108-037-X.
13. Исаенко Т.Н. Виды рода *Helleborus* L. в экспозициях Ставропольского ботанического сада, Растениеводство. 2019; 3(35) : 57-60. DOI: 10.31279/2222-9345-2019-8-35-57-60.
14. Ищенко З.В., Елисеева Л.М., Гулия В.О., Денисенко О.Н., Челомбитько В.А. Сравнительное морфолого-анатомическое исследование двух видов морозника (*Helleborus*) семейства лютиковые (Ranunculaceae), Современные проблемы науки и образования. 2012; 6 : 751.
15. Кирий П.В. Эколого-биологические особенности *Helleborus caucasicus* А. Вр. флоры Сочинского Причерноморья. Автореф. канд. дис. Краснодар: КубГУ, 2006.
16. Красная книга Республики Адыгея: Растения и грибы. А.Е. Шадже. Майкоп: РИПО Адыгея, 2000, 420 с.
17. Красная книга Краснодарского края: Растения и грибы. отв. ред. С.А. Литвинская. Краснодар: Дизайн Бюро, 2017, 850 с. ISBN: 978-5-91111-006-2.
18. Крашенинников И.М. Флора СССР. М.: изд-во АН СССР, 1937.
19. Мазнев Н.И. Большая энциклопедия высокоэффективных лекарственных растений. М.: Эксмо, 2009, 608 с.
20. Молканова О.И., Горбунов Ю.Н., Ширнина И.В., Егорова Д.А. Сохранение редких видов растений с применением биотехнологических методов в ГБС РАН, Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. 2020; 19(1) : 250-254. DOI: 10.14258/pbssm.2020049.
21. Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* центрального Сибирского ботанического сада. Вестник ВОГИС. 2008; 1(24) : 564-572.
22. Новикова Т.И. Использование биотехнологических подходов для сохранения биоразнообразия растений, Растительный мир Азиатской России. 2013; 2(12) : 119-128.
23. Олексин Ю.Р., Рыбалко А.Е. Введение в культуру *in vitro* редкого лекарственного растения *Helleborus caucasicus* А. Brown.: Биотехнология: состояние и перспективы развития. сб. трудов межд. науч. конф., 17–20 марта Москва, РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2015; 62-63.
24. Омархаджиева Ф.С. Флора Чеченской Республики и ее анализ. Автореф. канд. дис. Астрахань: АГУ, 2011.



25. Острейко С.А., Дроздовский Э.М. О полифункциональности регуляторов роста и развития растений, Сельскохозяйственная биология. 1981; 16(5) : 702-712.
26. Петкова В. Современная фитотерапия. София: Медицина и физкультура, 1988; 108 с.
27. Раджи А.Д. Редкие и исчезающие виды флоры Дагестанской АССР. 1986; 290-302 с.
28. Самарина Л.С., Маляровская В.И., Рогожина Е.В., Малюкова Л.С. Эндофитные микроорганизмы, как промоутеры роста растений в культуре *in vitro*, Сельскохозяйственная Биология. 2017; 52(5) : 917-927. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.5.917rus.
29. Собралиева Э.А., Палаева Д.О., Батукаев М.С., Батукаев А.А. Состояние изученности микроклонального размножения плодово-ягодных культур и винограда, Инновационная деятельность как фактор развития агропромышленного комплекса в современных условиях. 2020; 100-118. DOI: 10.36684/22-2020-1-100-118.
30. Турова А.Д. Лекарственные растения СССР и их применение. М.: «Медицина», 1974, 420 с.
31. Цветаева В.Е. Морозник знания опыт, практика. Моё лекарство. 2000; 8 : 6-7.
32. Чукуриди С.С., Бакалов А.Н. Состояние естественных популяций и особенности выращивания в культуре морозника кавказского *Helleborus caucasicus* var. *flavoguttatus* BR. и скополии карниольской *Scopolia carniolica* Jacq, Декоративное садоводство России. 2009; 42(1) : 188-192.
33. Чурикова О.А. Разработка основ введения в культуру *in vitro* и микроклонального размножения видов морозника, Вестник современной науки. 2015; 4 : 30-33.
34. Caesar L., Adelberg J. Using a multifactor approach for improving stage ii responses of *Helleborus hybrids* in micropropagation, Propagation of Ornamental Plants. 2015; 15(4) : 125-135.
35. Chang H.C., Agrawal D.C., Kuo C.L., Wen J.-L., Chen C.C., Tsay H.S. *In vitro* culture of *Drynaria fortunei*, a fern species source of Chinese medicine “Gu-SuiBu”, *in vitro* cell. Dev. Biol. Plant. 2007; 43(2) : 133-139. DOI: 10.1007/s11627-007-9037-6.
36. Dhooghe E., Christine M., Labeke V. *In vitro* propagation of *Helleborus* species, Plant Cell Tiss Organ Cult. 2007; 91 : 175-177. DOI: 10.1007/s11240-007-9280.
37. Gabryszewska E. Propagation *in vitro* of *Hellebores* (*Helleborus* L.) review., Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus. 2017; 16(1) : 61-72.
38. Lubell J.D., Thompson D.M., Brand M.H. Foliar sprays of benzyladenine increase bud and propagule production in *Epimedium* × *rubrum* Morren and *Helleborus* × *hybridus* L., Propagation of ornamental plants. 2005; 5(1) : 19-22.
39. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiologia Plantarum, 1962, 15 : 473-497.
40. Poupet R., Cardin L., Henri A., Onesto J.P. Healthy *in vitro* propagation by meristem tip culture of *Helleborus niger* selected clone for cut flower, Acta Hort. 2006; 725 : 301-310. DOI: 10.17660/ActaHortic.2006.725.37.
41. Sarasan V., Cripps R., Ramsay M.M., Atherton C., McMichen M., Prendergast G., Rowntree J.K. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade, *in vitro* cell dev. Biol. Plant. 2006; 42 : 206-214.
42. Seyring M. *In vitro* cloning of *Helleborus niger*, Plant Cell Rep., 2002; 20 : 895-900. DOI: 10.1007/s00299-001-0420-1.
43. Withers L.A. *In vitro* collecting-concept and background, *in vitro* collecting techniques for germplasm conservation. Rome, 2002; 6-2. ISBN: 9290435348.

### References

1. Besedina E.N. Improvement of the method of clonal micropropagation of apple rootstocks *in vitro*. Abstract of the cand. dis. Krasnodar: KubGAU, 2015.
2. Blinova K.F., Yakovleva G.P. Botanical and pharmacognostic dictionary. Moscow: Publishing House of the Higher School, 1990, 353 p. ISBN: 5-06-000085-0.
3. Vetchinkina E.M., Shirnina I.V., Shirnin S.Yu., Molkanova O.I. Preservation of rare plant species in genetic collections *in vitro*, Bulletin of the Baltic Federal University named after I. Kant. 2012; 7 : 109-118.
4. Granda H.R.K. Identification of the "B" chrysanthemum virus and creation of an *in vitro* collection of healthy planting material. Abstract of the cand. dis. Moscow: MSHA, 2009.
5. Grossheim A.A. Flora of the Caucasus. Moscow: Publishing House of the USSR Academy of Sciences, 1949, 571.
6. Grossheim A.A. Flora of the Caucasus. Moscow: Publishing House of the USSR Academy of Sciences, 1950, 424.
7. Guliya V.O., Orlovskaya T.V. Determination of laboratory germination of seeds of various variations of *Helleborus caucasicus* and *Helleborus abchasicus* international journal of experimental education, International Journal of Experimental Education. 2015; 6 : 66-68.
8. Egorova T.A., Klunova S.M., Zhivukhina E. A. Fundamentals of biotechnology. M. Publishing Center "Academy", 2003, 208. ISBN: 978-6697-4.
9. Zholobova O.O., Korotkov O.I., Safronova G.N., Buganova A.V. Conservation of rare and endangered plant species using biotechnology methods, Modern problems of science and education. 2012; 1 : 195.
10. Zernov A.S. Determinant of vascular plants of the north of the Russian Black Sea region. Moscow: Publishing House KMK. 2002, 283 p. ISBN: 5-87317-105.
11. Zernov A.S. Flora of the North-Western Caucasus. Moscow: Publishing House KMK, 2006, 664 p. ISBN: 5-87317-338-9.
12. Ivanov A.L. Floristic connections of the Western Caucasus and the Stavropol Upland and their significance in understanding the history of the flora of the Pre-Caucasus: "Biosphere and man": Proceedings of the International Scientific Conference, Maykop, Adyg. state University, 1999, 370 p. ISBN: 5-85108-037-X.
13. Isaenko T.N. Species of the genus *Helleborus* L. in the expositions of the Stavropol Botanical Garden, Plant growing. 2019; 3(35) : 57-60. DOI: 10.31279/2222-9345-2019-8-35-57-60.
14. Ishchenko Z.V., Eliseeva L.M., Guliya V.O., Denisenko O.N., Chelombitko V.A. Comparative morphological and anatomical study of two species of hellebore (*Helleborus*) of the buttercup family (Ranunculaceae), Modern problems of science and education. 2012; 6 : 751.
15. Kiriy P.V. Ecological and biological features of *Helleborus caucasicus* A. Br. flora of the Sochi Black Sea region. Abstract of the cand. dis. Krasnodar: KubGU, 2006.
16. The Red Book of the Republic of Adygea: Plants and fungi. A.E. Shadzhe. Maykop: RIPO Adygea, 2000; 420 p.
17. The Red Book of the Krasnodar Territory: Plants and fungi. ed. S.A. Litvinskaya. Ed. 2nd. Krasnodar: Design Bureau, 2017; 850 p. ISBN: 978-5-91111-006-2.
18. Krasheninnikov I.M. Flora of the USSR. M.: Publishing house of the USSR Academy of Sciences, 1937.
19. Maznev N.I. Big encyclopedia of highly effective medicinal plants. Moscow: Eksmo, 2009; 608 p.
20. Molkanova O.I., Gorbunov Yu.N., Shirnina I.V., Egorova D.A. Conservation of rare plant species using biotechnological methods in the GBS RAS, Problems of Botany in Southern Siberia and Mongolia, 2020; 19(1) : 250-254. DOI: 10.14258/pbssm.2020049.

21. Novikova T.I., Nabieva A.Yu., Poluboyarova T.V. Preservation of rare and useful plants in the *in vitro* collection of the Central Siberian Botanical Garden. VOGIS Bulletin, 2008; 1(24) : 564-572.
22. Novikova T.I. The use of biotechnological approaches for the conservation of plant biodiversity, the flora of Asian Russia. 2013; 2(12) : 119-128.
23. Oleksin Y.R., Rybalko A.E. Introduction to *in vitro* cultures of the rare medicinal plant *Helleborus caucasicus* A. Brown: Biotechnology: State and prospects of development. Proceedings of the International Scientific Conference, March 17-20, Moscow, D.I. Mendeleev Russian Technical University, 2015; 62-63.
24. Omarkhadzhieva F.S. Flora of the Chechen Republic and its analysis. Abstract of the cand. dis. Astrakhan: ASU, 2011.
25. Ostreiko S.A., Drozdovsky E.M. On the polyfunctionality of plant growth and development regulators, Agricultural Biology. 1981; 16(5) : 702-712.
26. Petkova V. Modern phytotherapy. Sofia: Medicine and Physical Education, 1988; 108 p.
27. Raji A.D. Rare and endangered species of flora of the Dagestan ASSR. 1986; 290-302.
28. Samarina L.S., Malyarovskaya V.I., Rogozhina E.V., Malyukova L.C. Endophytic microorganisms as promoters of plant growth in culture *in vitro*, Agricultural Biology 2017; 52(5) : 917-927. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.5.917rus.
29. Sobralieva E.A., Palaeva D.O., Batukaev M.S., Batukaev A.A. The state of knowledge of microclonal reproduction of fruit and berry crops and grapes, Innovative activity as a factor in the development of the agro-industrial complex in modern conditions. 2020; 100-118. DOI: 10.36684/22-2020-1-100-118.
30. Turova A.D. Medicinal plants of the USSR and their application. M.: "Medicine", 1974; 420.
31. Tsvetaeva V.E. Hellebore knowledge experience, practice. My medicine. 2000; 8 : 6-7.
32. Chukuridi S.S., Bakalov A.N. The state of natural populations and peculiarities of cultivation in the culture of hellebore Caucasian *Helleborus caucasicus* var. *flavo-guttatus* Br. and *scopolia carniolica* *Scopolia carniolica* Jacq, Decorative gardening of Russia. 2009; 42(1) : 188-192.
33. Churikova O.A. Development of the basics of introduction into culture *in vitro* and microclonal reproduction of hellebore species, Bulletin of Modern Science. 2015; 4 : 30-33.
34. Caesar L., Adelberg J. Using a multifactor approach for improving stage ii responses of *Helleborus hybrids* in micropropagation, Propagation of Ornamental Plants. 2015; 15(4) : 125-135.
35. Chang H.C., Agrawal D.C., Kuo C.L., Wen J.-L., Chen C.C., Tsay H.S. *In vitro* culture of *Drynaria fortunei*, a fern species source of Chinese medicine "Gu-SuiBu", *in vitro* cell. Dev. Biol. Plant. 2007; 43(2) : 133-139. DOI: 10.1007/s11627-007-9037-6.
36. Dhooghe E., Christine M., Labeke V. *In vitro* propagation of *Helleborus* species, Plant Cell Tiss Organ Cult. 2007; 91 : 175-177. DOI: 10.1007/s11240-007-9280.
37. Gabryszewska E. Propagation *in vitro* of hellebores (*Helleborus* L.) review. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus, 2017; 16(1) : 61-72.
38. Lubell J.D., Thompson D.M., Brand M.H. Foliar sprays of benzyladenine increase bud and propagule production in *Epimedium* × *rubrum* Morren and *Helleborus* × *hybridus* L., Propagation of ornamental plants. 2005; 5(1) : 19-22.
39. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiologia Plantarum, 1962; 15 : 473-497.
40. Poupet R., Cardin L., Henri A., Onesto J.P. Healthy *in vitro* propagation by meristem tip culture of *Helleborus niger* selected clone for cut flower. Acta Hort. 2006; 725 : 301-310. DOI: 10.17660/ActaHortic.2006.725.37.
41. Sarasan V., Cripps R., Ramsay M.M., Atherton C., McMichen M., Prendergast G., Rowntree J.K. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade, *in vitro* cell dev. Biol. Plant. 2006; 42 : 206-214.

42. Seyring M. *In vitro* cloning of *Helleborus niger*. Plant cell rep. 2002; 20 : 895-900. DOI: 10.1007/s00299-001-0420-1.
43. Withers L.A. *In vitro* collecting-concept and background, *in vitro* collecting techniques for germplasm conservation. Rome, 2002; 6-2. ISBN: 9290435348.

**HELLEBORUS CAUCASICUS A. BR.:  
BIOLOGICAL CHARACTERISTIC  
AND METHODS OF ITS PRESERVATION  
(LITERATURE REVIEW)**

**Tsaturyan G.A., Malyarovskaya V.I.**

*Federal Research Centre  
the Subtropical Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences,  
Sochi, Russia, e-mail: malyarovskay@yandex.ru*

Based on modern literature, this paper substantiates the relevance and necessity of preserving a rare, endemic species *Helleborus caucasicus* A. Br. growing in the natural flora of the Northwestern Caucasus. Information on the taxonomy and geographical distribution of *H. caucasicus* is briefly presented. The description of its biological and morphological features is given. Also, due to the fact that the species has a category and status: 3, "Vulnerable", rare, "in a state close to endangered", and taking into account that the problem of its preservation is acute, the paper has analyzed and provided information on the introduction of Caucasian hellebore into sterile conditions, as well as other species of the genus *Helleborus* L. Techniques of their micropropagation and preservation *in vitro* are presented. An effective method of sterilizing explants is described, which significantly simplifies the process of obtaining a sterile culture. It is shown that shoots and seeds of plants are the best explants for introduction into culture. The review also considers the optimization of nutrient media and growth regulators for accelerating micropropagation of *H. caucasicus* and other hellebore species. Optimal substrates at the stage of adaptation of micro-propagated hellebore plants to non-sterile conditions are given. The resulting specimens are used to replenish collections that are the basis for creating *in vitro* genetic banks of rare and endangered plant species. The protocols described in the literature allow us to develop optimal conditions for *in vitro* introduction, preservation and reproduction of Caucasian hellebore which is a rare species of natural flora.

**Key words:** *Helleborus caucasicus*, rare species, microclonal propagation, *in vitro*, nutrient medium, growth regulators, sterilization, biodiversity conservation.