

УДК 573.6:58.08.523

doi: 10.31360/2225-3068-2020-73-61-68

**СОХРАНЕНИЕ РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ  
В ГЕНЕТИЧЕСКОМ БАНКЕ ВОЛГОГРАДСКОГО  
РЕГИОНАЛЬНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА**

**Малаева Е. В.** <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Государственное бюджетное учреждение Волгоградской области  
«Волгоградский региональный ботанический сад»

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Волгоградский государственный социально-педагогический университет»

г. Волгоград, Россия, e-mail: e.malaeva@mail.ru

Наряду с традиционными методами сохранения растений *ex situ* применение культуры изолированных тканей и органов становится все более и более актуальным. Работа по созданию коллекции *in vitro* Волгоградским региональным ботаническим садом ведётся с 2005 г. На данный момент коллекция редких растений *in vitro* содержит 50 видов, относящихся к 19 семействам. В коллекции *in vitro* Волгоградского регионального ботанического сада наиболее представлены редкие виды растений следующих семейств: *Fabaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Asteraceae*, *Iridaceae*. Хранение *in vitro* ценных

форм растений является высокоэффективным и актуальным способом для содержания коллекций растений и сохранения биологического разнообразия.

**Ключевые слова:** биологическое разнообразие, Волгоградский региональный ботанический сад (ВРБС), генетические банки, редкие растения, *in vitro*.

Интерес к использованию методов культуры изолированных тканей для сохранения генофонда редких и ценных видов растений возрастает во всем мире. В настоящее время создание банков стерильных культур является одним из перспективных направлений сохранения биоразнообразия растений. Они служат источником сохранения природного и культурного наследия и могут быть использованы для обмена между ботаническими учреждениями разных стран.

Банки *in vitro* редких и ценных видов растений созданы во многих научных и образовательных учреждениях: Главный ботанический сад им Н. В. Цицина РАН, Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Волгоградский региональный ботанический сад, Ботанический сад-институт Уфимского научного центра РАН, Ботанический сад имени проф. А. Г. Генкеля Пермского государственного университета, Удмуртский государственный университет и др. [6, 7].

Работа по созданию коллекции *in vitro* в ГБУ ВО «Волгоградский региональный ботанический сад» (ГБУ ВО «ВРБС») ведётся с 2005 г.

В 2010 г. на территории Волгоградской области был создан региональный генетический банк редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений, занесённых в Красную книгу Волгоградской области. Согласно Положению, утверждённому приказом Комитета природных ресурсов и охраны окружающей среды Администрации Волгоградской области № 723/01 от 9 ноября 2010 г., региональный генетический банк является местом сохранения вне природной среды видов и популяций растений, занесённых в Красную книгу Волгоградской области, а также включённых в перечень видов, являющихся объектами мониторинга на территории Волгоградской области.

Основной целью регионального генетического банка является сохранение видового и генетического разнообразия растений Волгоградской области, путём создания резерва генетического материала природных популяций редких видов.

**Объекты и методы.** В качестве первичных эксплантов для введения в культуру *in vitro* редких видов растений, мы использовали семена, собранные из природных мест произрастания редких видов растений (виды семейства *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Caryophyllaceae* и *Asteraceae*; части почек возобновления с кусочком донца из луковицы (*Bellevalia*

*speciosa* Woronow ex Grossh. (*B. sarmatica* (Georgi) Woronow), сегменты листьев, частей околоцветника (*Iris pumila* L., *Iris scariosa* Willd. ex Link.) на разных стадиях развития (в фазе бутонизации или цветения). Для ряда видов (*Aristolochia manshuriensis* Kom., *Artemisia salsoloides* Willd., *Parthenocissus tricuspidata* (Siebold. et Zucc.) Planch.) в качестве первичных эксплантов брали апикальные и латеральные меристемы растений с интродукционного участка ГБУ ВО «ВРБС».

Методика исследований базировалась на общепринятых классических приёмах с культурами изолированных тканей и органов растений [1]. Экспланты предварительно обрабатывали 95%-ным этиловым спиртом в течение 50–60 секунд. В качестве стерилизатора использовали различные концентрации Хлорамина (действующее вещество – натриевая соль хлорамида бензосульфокислоты) и «Лизоформина 3000» (действующее вещество – глутаровый альдегид, глиоксаль и дидецилдиметиламмоний хлорид) с различной временной экспозицией. Методика по применению стерилизующего вещества – «Лизоформин 3000» устанавливалась опытным путём сотрудниками лаборатории биотехнологии ГБУ ВО «ВРБС».

На этапе микроразмножения для редких видов растений использовали следующие минеральные основы питательных сред: Уайта (White, 1943), Гамборга и Эвелега (Gamborg, Eveleigh, 1968), Мурасига Скуга (Murashige, Skoog, 1962), Рандольфа и Кокса (Randolph, Cox, 1943), Кнутсона (Knudson, 1925), Нича (Nitsch, 1974), Хеллера (Heller, 1953), Андерсона (Anderson, 1980) [4].

После многократного промывания в стерильной дистиллированной воде экспланты высаживали на безгормональную питательную среду с минеральной основой по прописи Мурасиге-Скуга [9]. При оценке оптимального режима стерилизации учитывали количество заросших и количество проросших семян. В условиях *in vitro* растения культивировали в чашках Петри и биологических пробирках при освещении с интенсивностью 3–5 клк, при 16-часовом фотопериоде, температуре 24 °С и относительной влажности воздуха 70 %. Все опыты проводили трижды, повторность в каждом варианте 10-кратная.

Обработку данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Office Excel. Полученные данные достоверны при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** В настоящее время коллекция редких растений *in vitro* содержит 50 видов, относящихся к 19 семействам. Максимально в коллекции *in vitro* представлены следующие семейства: *Fabaceae* – 18 % (включает 9 видов данного семейства), *Iridaceae* – 14 % (7 видов), *Asteraceae* – 10 % (5 видов), *Brassicaceae* – 8 % (4 вида), *Caryophyllaceae* – 8 % (4 вида). Семейства *Dioscoreaceae* R. Br., *Paeoniaceae* L., *Papaveraceae* Juss. – по 2 вида. Остальные семейства представлены в коллекции менее чем 2 % и насчитывают по одному виду.

Для работы с редкими видами растений использовали различные типы эксплантов (табл. 1). Однако, наиболее доступным и хорошо воспроизводимым материалом, на наш взгляд, являются семена, собранные из природных мест обитания.

Таблица 1

**Объекты исследования  
и типы культивируемых эксплантов редких видов растений**

Объекты исследования	Типы эксплантов
<i>Lepidium meyeri</i> Claus, <i>Matthiola fragrans</i> Bunge, <i>Silene cretacea</i> Fisch. ex Spreng., <i>Silene hellmanii</i> Claus, <i>Anthemis trotzkiana</i> Claus, <i>Crambe tataria</i> Sebeok, <i>Hedysarum alpinum</i> L., <i>Calophaca wolgarica</i> (L. fil.) DC.	семена
<i>Hedysarum cretaceum</i> Fisch., <i>Genista tanaitica</i> P. Smirn., <i>Hedysarum grandiflorum</i> Pall., <i>Hedysarum razoumovianum</i> Fisch. et Helm ex DC., <i>Astragalus dasyanthus</i> Pall.	апикальные меристемы апикальные меристемы, семена
<i>Bulbocodium versicolor</i> (Ker-Gawl.) Spreng., <i>Bellevalia speciosa</i> , <i>Tulipa gesneriana</i> L., <i>Allium regelianum</i> A. Beck.	семена, сегменты луковиц
<i>Artemisia salsoloides</i> , <i>Artemisia hololeuca</i> Bieb. ex Bess., <i>Parthenocissus tricuspidata</i>	апикальные и латеральные меристемы, пазушные почки
<i>Iris tenuifolia</i> Pall., <i>Iris scariosa</i> , <i>Iris pumila</i> , <i>Gladiolus tenuis</i> Bieb.	семена, изолированные зародыши

Примечание: КК ВО – Красная книга Волгоградской области – перечень по состоянию на 2017 г. [5].

При организации исследований также следует учитывать эколого-биологические особенности редких видов, особенности жизненной формы, что подтверждается другими исследователями [2, 3, 6, 8].

Все эти факторы оказывали существенное влияние на интенсивность пролиферации изученных видов. По результатам наших исследований они условно были разделены на три группы:

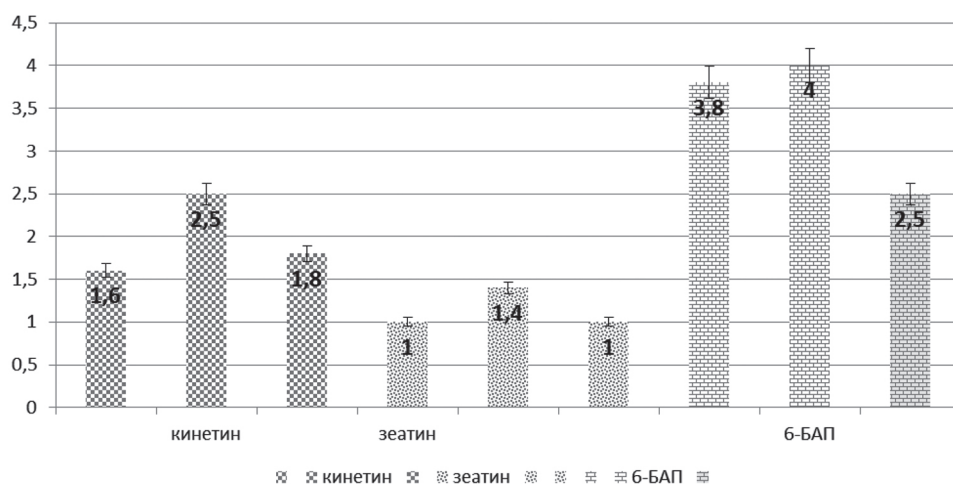
– первая группа включает представителей семейства *Caryophyllaceae* (*Silene cretacea*, *Silene helmanii*) и семейства *Brassicaceae* (*Lepidium meyeri*, *Matthiola fragrans*),  $K_p \geq 7$ ;

– вторая группа включает виды семейства *Asteraceae* (*Artemisia salsoloides*, *Artemisia hololeuca*, *Anthemis trotzkiana*) –  $K_p \leq 7 < 4$ ;

– к третьей группе виды семейства *Fabaceae* (*Calophaca wolgarica*, *Hedysarum grandiflorum*, *Hedysarum cretaceum*, *Crambe tataria*, *Hedysarum alpinum*, *Calophaca wolgarica*, *Astragalus dasyanthus*)  $K_p \leq 4$ .

В результате проведённых исследований установлено, что на этапе введения в культуру *in vitro* для всех изученных видов оптимальной является минеральная основа питательной среды Мурасиге-Скуга (МС), не содержащая гормонов. Для растений класса Однодольные оптимальной является питательная среда Кнудсона (Кн), дополненная цитокининами и ауксинами в различных концентрациях (0,1–0,5 мг/л) и их сочетание.

Из всех исследуемых цитокининов наибольший коэффициент размножения для *Calophaca wolgarica* – 4, наблюдали при использовании 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л (рис. 1). При этом отмечали изменения в морфологии побегов: междоузлия побегов сокращались, уменьшались размеры листьев, изменилась их форма. Кроме того, у половины побегов при концентрации 1,0 мг/л 6-БАП наблюдалась витрификация побегов.



**Рис. 1.** Влияние различных цитокининов на коэффициент размножения *Calophaca wolgarica*  
Условные обозначения:

1 – кинетин 0,3 мг/л; 2 – кинетин 0,5 мг/л; 3 – кинетин 1,0 мг/л;  
4 – зеатин 0,3 мг/л; 5 – зеатин 0,5 мг/л; 6 – зеатин 1,0 мг/л; 7 – 6-БАП 0,1 мг/л;  
8 – 6-БАП 0,5 мг/л; 9 – 6-БАП 1,0 мг/л.

Установлено, что длительное культивирование растений на средах, содержащих цитокинины, приводило к появлению большого количества различных аномалий развития и, как следствие, остановке роста растений. В некоторых случаях отмечено появление морфогенного каллуса, образование которого ингибировало нормальное развитие растений, что согласуется с данными других исследователей [2].

Наш опыт культивирования редких видов растений показал наличие положительного эффекта при совместном использовании 6-БАП и

ИУК. Максимальный коэффициент размножения на средах, содержащих только 6-БАП, составил 25 (концентрация 6-БАП – 2,5 мг/л), при совместном использовании 6-БАП и ИУК максимальный коэффициент размножения составил 34 (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние концентрации  
6-БАП и ИУК на коэффициент размножения *Artemisia hololeuca***

6-БАП, мг/л	Концентрация ИУК, мг/л					
	0	0,01	0,03	0,05	0,07	0,1
0	1,0 ±0,1	1,0 ±0,1	1,0 ±0,1	1,0 ±0,1	1,0 ±0,1	1,0 ±0,1
0,1	5,0 ±0,3	9,0 ±0,3	6,0 ±0,3	7,0 ±0,5	5,0 ±0,3	3,0 ±0,3
0,3	8,0 ±0,6	10,0 ±0,3	6,0 ±0,7	13,0 ±1,9	12,0 ±0,5	5,0 ±0,4
0,5	15,0 ±0,9	12,0 ±0,6	19,0 ±0,8	19,0 ±0,8	19,0 ±1,1	4,0 ±0,3
0,7	17,0 ±1,0	14,0 ±0,8	17,0 ±0,2	30,0 ±0,9	16,0 ±0,5	11,0 ±1,2
1,0	18,0 ±0,5	<b>34,8 ±1,3</b>	–	22,0 ±1,0	–	–

Таким образом, использование более высоких концентраций цитокининов (6-БАП  $\geq 1,0$  мг/л) способствовало значительному увеличению коэффициента размножения у большинства изученных видов редких растений. Однако появлялись обводнённые (витрифицированные) побеги аномальной морфологии. Таким образом, в результате проведённых исследований, было подобрано оптимальное соотношение ауксинов и цитокининов (6-БАП 0,1 мг/л и ИУК 0,01 мг/л). При этом формировались побеги нормальной морфологии, а коэффициент размножения для *Artemisia hololeuca* при этом составил  $9,0 \pm 0,3$ .

Сравнительный анализ влияния видовых особенностей на коэффициент размножения редких и исчезающих видов растений показал различия как между близкородственными видами (представители рода *Hedysarum*), так и между видами, относящихся к разным семействам. При этом значения коэффициента размножения между близкородственными видами, в пределах одного семейства, отличались незначительно. Анализ полученных данных по интенсивности пролиферации между редкими видами различных семейств показал значительные отличия (коэффициент размножения между семействами *Caryophyllaceae* и *Fabaceae* отличался более чем в 6 раз – от 2 до 13,5).

Важным показателем при культивировании редких видов является количество субкультивирований. При этом отмечали, что темпы развития эксплантов при культивировании разных видов существенно отличаются. Так если для *Genista tanaitica* наиболее высокий коэффициент размножения наблюдался на этапе введения в культуру и при первых субкультивированиях, то для *Hedysarum grandiflorum* и *Hedysarum cretaceum* максимальный коэффициент размножения приходился на 4–6 пассаж.

Результаты экспериментов по подбору сред на этапе укоренения показывают значительные отличия процента укоренения в зависимости, как от видовых особенностей редких и исчезающих видов, так и от концентрации ауксинов, применяемых для индукции ризогенеза.

Модельными объектами для проведения экспериментов по укоренению были выбраны представители семейства *Brassicaceae*. В ходе работы изучали влияние ИУК и ИМК на процесс ризогенеза. Укореняемые побеги *Lepidium meyeri* высаживали на питательные среды, минеральную основу которых составляла полная и разбавленная вдвое модифицированная среда МС с добавлением 20 г/л сахарозы, 6,5 г/л агара и набора витаминов как в основной среде.

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 обеднённых питательных сред – Уайта, ½ МС позволяют снизить концентрацию ауксинов – от 0,3 до 0,5 мг/л.

Выход адаптированных растений-регенерантов редких видов составил от 30 до 50 %.

**Выводы.** В результате исследований модифицированы и адаптированы методики клонального микроразмножения некоторых редких и исчезающих видов растений. Установлено, что реализация морфогенетического потенциала у редких и исчезающих видов растений определяется видовыми особенностями исходных растений, типом экспланта, его физиологическим состоянием, составом питательных сред и условиями культивирования.

Создание коллекций *in vitro* можно рассматривать как одну из форм охраны растений природной флоры и как эффективный метод сохранения их биоразнообразия *ex situ*, что составляет часть общей стратегии охраны растений, направленной на сохранение видов в природе.

#### Библиографический список

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



2. Жолобова О.О. Сохранение редких и исчезающих видов растений в культуре *in vitro* и оценка уровня их внутривидового полиморфизма: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Белгород, 2012. – 23 с.
3. Ишмуратова М.М., Рахимова А.Ф. Использование культуры *in vitro* для размножения гибридов *Iris L.* // Раст. Ресурсы, 1999. – Т. 35. – Вып. 4. – С. 74-78.
4. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 488 с.
5. Красная книга Волгоградской области. Т.2. Растения и другие организмы / под ред. д.б.н., проф. О.Г. Барановой, д.б.н., проф. В.А. Сагалаева. – Воронеж: ООО «Издатель-Принт», 2017. – 268 с.
6. Малаева Е.В., Супрун Н.А., Коротков О.И., Короткова О.О. Генетический банк редких и ценных видов растений Волгоградского регионального ботанического сада // Вестник ВолГУ. – 2008. – № 1(13). – С. 242-246. – ISSN 1998-992X.
7. Молканова О.И. Использование биотехнологических методов для размножения и сохранения редких видов растений // Бюл. ГБС. – 2017. – №1(203). – С. 42-48. – ISSN 0366-502X.
8. Молканова О.И., Коротков О.И., Ветчинкина Е.М. и др. Генетические банки растений: проблемы формирования, сохранения и использования // Вестн. Удмуртского ун-та. – 2010. – Вып. 3. – С. 33-39. – ISSN 2412-9518.
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.

### CONSERVATION OF RARE PLANT SPECIES IN THE GENE BANK OF VOLGOGRAD REGIONAL BOTANICAL GARDEN

Malayeva E. V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> State Budgetary Institution of Volgograd region  
“Volgograd Regional Botanical Garden”

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education  
“Volgograd State Social & Pedagogical University”

Volgograd, Russia, e-mail: e.malaeva@mail.ru

Equally with traditional methods of plant conservation *ex situ* application of isolated tissue and organ cultures is becoming more and more actual. Volgograd Regional Botanical Garden has been working to create *in vitro* collection since 2005. Currently, *in vitro* collection rare species contains 50 species belonging to 19 families. *Fabaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Liliaceae*, *Iridaceae* families are the most representative in *in vitro* collection of rare plant species of Volgograd Regional Botanical Garden. *In vitro* storage of valuable plant forms is a highly efficient and useful way to maintain plant collections and conserve plant biodiversity.

**Key words:** biological diversity, Volgograd Regional Botanical Garden (VRBG), gene banks, rare plants, *in vitro*.