

Олег Игоревич Коротков

Детский ботанический сад «Сириус», руководитель, Сочи, Краснодарский край, Россия, korotkov.oi@talantiuspeh.ru

Инна Валерьевна Князева

Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ, старший научный сотрудник лаборатории исследований технологических свойств сельскохозяйственных материалов, кандидат биологических наук, Москва, Россия, knyazewa.inna@yandex.ru

ЗАКЛАДКА ОСНОВ ГЕНЕТИЧЕСКОГО БАНКА *IN VITRO* РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО ЦЕНТРА «СИРИУС»

Для сохранения редких и исчезающих видов растений наряду с классическими методами сохранения ex situ необходимо создание генетических банков in vitro. При формировании коллекции in vitro растений одним из важных этапов клонального микроразмножения является получение стерильных эксплантов на этапе введения. В качестве эксплантов редких и исчезающих видов растений использовали семена. Растительный материал для формирования коллекции in vitro был получен из семенного банка Детского ботанического сада «Сириус». Цель исследований – создание генетического банка in vitro редких и исчезающих видов растений на базе Образовательного центра «Сириус». При использовании данного протокола стерилизации был получен максимальный выход стерильных эксплантов для разных видов растений, а также для некоторых видов отмечалась всхожесть семян в ранние сроки. Для прорастания семян выбрали безгормональную среду по прописи Мурасиге и Скуга (МС). В результате анализа полученных данных нами определен эффективный протокол стерилизации семян in vitro для 14 редких и исчезающих видов растений. На ранних этапах роста и развития эксплантов наблюдалось прорастание семян у шести видов (майкараган волжский, смолевка меловая, смолевка Гельмана, левкой душистый, диоскорея ниппонская и желтушник меловой) растений с общей долей 20–100 %, на основе чего возможна разработка приемов клонального микроразмножения и сохранение изученных видов растений.

Ключевые слова: редкие и исчезающие виды растений, стерилизация, введение, прорастание, банк in vitro.

Oleg I. Korotkov

Children's Botanical Garden "Sirius", Head, Sochi, Krasnodar Region, Russia, korotkov.oi@talantiuspeh.ru

Inna V. Knyazeva

Federal Scientific Agroengineering Center VIM, Senior Researcher, Laboratory for Research of Technological Properties of Agricultural Materials, Candidate of Biological Sciences, Moscow, Russia, knyazewa.inna@yandex.ru

LAYING THE FOUNDATIONS OF RARE AND ENDANGERED PLANT SPECIES IN VITRO GENETIC BANK OF THE «SIRIUS» EDUCATIONAL CENTER

To conserve rare and endangered plant species, along with the classical methods of ex situ conservation, it is necessary to create in vitro genetic banks. When forming a collection of in vitro plants, one of the important stages of clonal micropropagation is obtaining sterile explants at the injection stage. Seeds were used as explants for rare and endangered plant species. The plant material for the in vitro collection was obtained from the seed bank of the Sirius Children's Botanical Garden. The purpose of research is to create an in vitro

genetic bank of rare and endangered plant species on the basis of the Sirius Educational Center. When using this sterilization protocol, the maximum yield of sterile explants was obtained for different plant species, and for some species, seed germination was noted at an early date. For seed germination, a hormone-free medium was chosen according to the prescription of Murashige and Skoog (MS). As a result of the analysis of the obtained data, we have determined an effective protocol for sterilization of seeds *in vitro* for 14 rare and endangered plant species. At the early stages of the growth and development of explants, seed germination was observed in six species (Maikaragan Volga, Cretaceous resin, Gelman's resin, Fragrant Levkoy, *Dioscorea Nippon* and Chalk jaundice) plants with a total share of 20–100 %, on the basis of which it is possible to develop methods of clonal micropropagation and preservation of the studied plant species.

Keywords: rare and endangered plant species, sterilization, introduction, germination, *in vitro* bank.

Введение. Разработка методов клонального микроразмножения является основой для создания генетических банков *in vitro* редких и исчезающих видов растений, а также одним из перспективных направлений сохранения биоразнообразия в целом [1–3].

При создании генетических банков особое внимание уделяется репрезентативности и сохранению генетической устойчивости видов растений. Одним из наиболее привлекательных преимуществ сохранения *in vitro* является возможность получения стерильных культур видов (редких, эндемичных) без удаления их из естественной среды обитания, что способствует предотвращению уничтожения фитоценозов [4, 5].

Методы биотехнологии позволяют из незначительного количества исходного материала в кратчайшие сроки получить большое число выровненного посадочного материала. Адаптированные растения можно использовать для пополнения коллекционных фондов, изучения биохимического состава, проведения генетического мониторинга, а также для реинтродукции и усиления ослабленных природных популяций редких видов [6].

Наиболее представительными в России по разнообразию генетического банка *in vitro* редких и исчезающих видов растений в последние годы считаются ГБС РАН (г. Москва) и ГБУ ВО «ВРБС» (г. Волгоград) [7, 8].

При формировании коллекции *in vitro* растений одним из важных этапов клонального микроразмножения является получение стерильных эксплантов на этапе введения. При стерилизации семян и вегетативных частей редких и исчезающих видов растений часто используют в качестве основного стерилизатора 7%-й раствор гипохлорита кальция или натрия с экспозицией 1–25 мин. В качестве детергента применяют

TWEEN-20 [9]. В ходе экспериментальных исследований установлено, что оптимальным режимом стерилизации семян редких видов может выступать 5%-й лизоформин с экспозицией 7 минут [10].

Цель исследования. Создание генетического банка *in vitro* редких и исчезающих видов растений на базе Образовательного центра «Сириус».

Объекты и методы исследования. Растительный материал для формирования коллекции *in vitro* был получен из семенного банка Детского ботанического сада «Сириус». Исследование по введению семенного материала редких и исчезающих видов растений в культуре *in vitro* проводили в лаборатории клеточной биологии на базе Образовательного центра «Сириус» в 2021 г. в соответствии с методическими рекомендациями [11, 12]. Объектами исследований являлись 13 редких и исчезающих видов растений, занесенных в Красную книгу Российской Федерации: *Calophaca wolgarica* (L. fil.) Fisch. ex DC. (майкараган волжский), *Hedysarum grandiflorum* Pall. (копеечник крупноцветковый), *Zingiber Biebersteiniana* (Claus) P.A. Smirn. (цингерия Биберштейна), *Artemisia salsoloides* Willd. (полынь солянковидная), *Silene Hellmanii* Claus (смолевка Гельмана), *Silene cretacea* Fisch ex Spreng (смолевка меловая), *Dioscorea nipponica* Makino (диоскорея ниппонская), *Erysimum cretaceum* (Rupr) schmalh (желтушник меловой), *Matthiola fragrans* (Fisch) Bunge (левкой душистый), *Panax ginseng* C.A. Mey. (женьшень обыкновенный), *Crambe steveniana* Rupr. (катран Стевена), *Jurinea cretacea* Bunge (наголоватка меловая), *Bellevia speciosa* Woronow ex Gross (бельвалия сарматская), *Asphodeline taurica* (Pall. ex Bieb.) Kunth (асфоделина крымская), 2 вида занесены в региональные Красные книги – *Erysimum creta-*

ceum (Rupr) *schmalh* (желтушник меловой), *Sedum subulatum* (C.A. Mey.) Boiss. (очиток шиловидный).

В качестве эксплантов редких и исчезающих видов растений использовали семена. Стерилизацию растительного материала проводили в несколько этапов. Для первичной поверхностной стерилизации семена замачивали в мыльном растворе на 15 минут. Затем растительный материал тщательно промывали проточной водой в течение 60 минут. 20%-й раствор средства «Доместос» с активным веществом в его составе гипохлорита натрия NaOCl и 70% C₂H₅OH использовали для дальнейшей очистки эксплантов от инфекции. Перед введением в культуру *in vitro* семена промывали дистиллированной водой. Для прорастания семена высаживали на безгормональную агаризованную питательную среду Мурасиге-Скуга (МС). В качестве минеральной основы питания использовали готовые компоненты «Биолот» среды МС. Уровень pH

питательной среды нормализовали с помощью 1 М NaOH раствора до уровня 5,7 перед автоклавированием. Автоклавирование проводили в течение 20 минут при 120 °С и 2,0 атмосфер в стерилизаторе Tuttnauer-2340 (Израиль). Работы по изолированию эксплантов осуществляли в асептических условиях – ламинарных боксах Neoteric (Россия).

Результаты исследования и их обсуждение. На этапе введения семенного материала редких и исчезающих видов растений в культуру *in vitro* важной особенностью является получение стерильной культуры с целью последующей разработки технологии клонального микроразмножения и создания генетического банка *in vitro*.

При использовании данного протокола стерилизации был получен максимальный выход стерильных эксплантов для разных видов растений, а также для некоторых видов отмечалась всхожесть семян в ранние сроки (рис. 1).

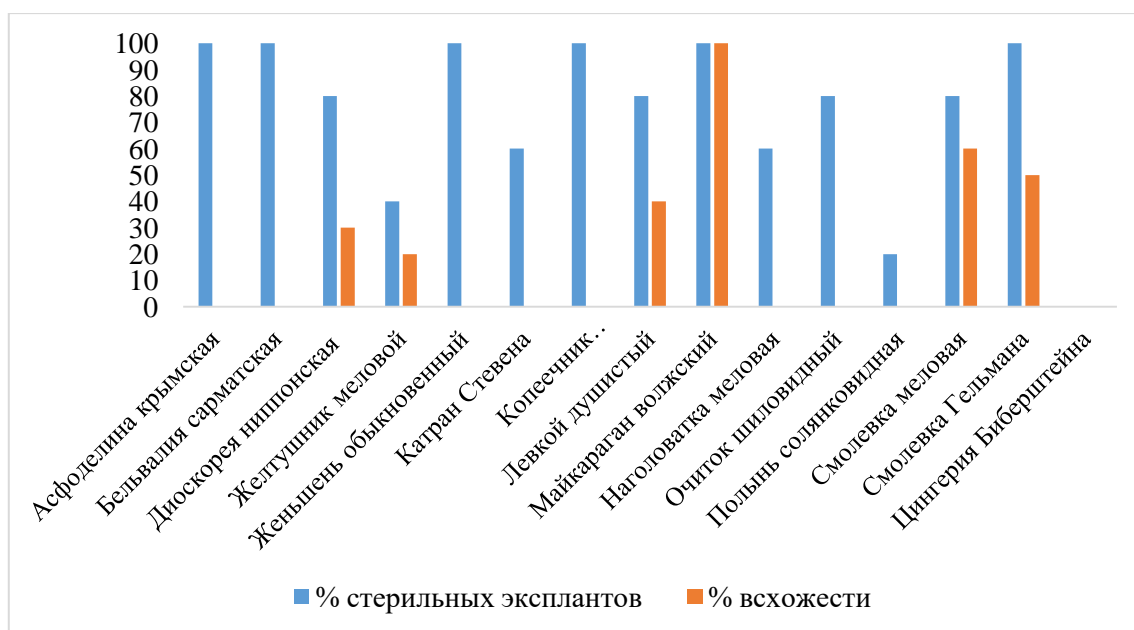


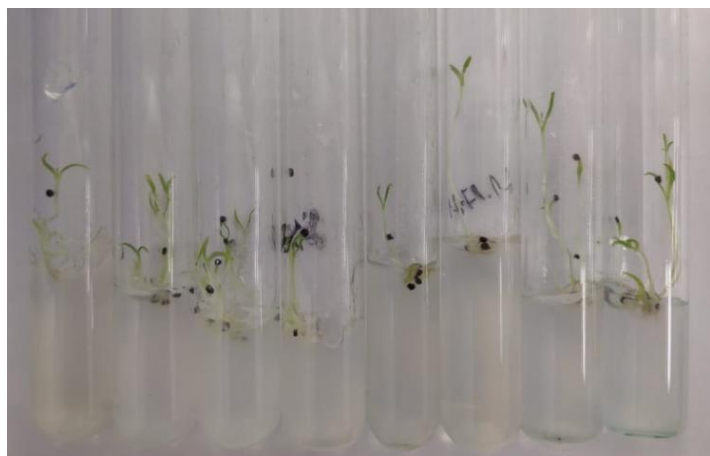
Рис. 1. Эффективность стерилизации первичных эксплантов и всхожесть редких и исчезающих видов растений

Анализируя полученные данные, выявлено, что через 5–7 дней после помещения семян на питательную среду отмечали всхожесть у шести видов растений: майкараган волжский, смолевка меловая, смолевка Гельмана, левкой душистый, диоскорея ниппонская и желтушник меловой. Всхожесть семян изученных генотипов варьиро-

вала в пределах 20–60 %. Максимальный процент прорастания семян наблюдался у смолевки меловой и майкарагана волжского – 60–100 % соответственно, прорастание первых семян майкарагана зафиксировано уже на второй день после введения в культуру (рис. 2).



Майкараган волжский



Смолевка меловая

Рис. 2. Начальный этап роста и развития растений из семенного материала на этапе введения в культуру *in vitro*

Успешное применение высокоэффективного протокола стерилизации семян в настоящем исследовании предлагает важнейшую стратегию для дальнейшего размножения и сохранения редких и исчезающих видов растений, а также создания генетического банка *in vitro*.

Выводы. Для сохранения редких и исчезающих видов растений наряду с классическими методами сохранения *ex situ* необходимо создание генетических банков *in vitro*.

В результате проведенного эксперимента был подобран оптимальный режим стерилизации, при котором большинство видов растений оказались стерильными, за исключением цингерии Биберштейна. На ранних этапах роста и развития эксплантов наблюдалось прорастание семян у шести видов растений с общей долей – 20–100 %.

Список источников

1. Жолобова О.О., Коротков О.И., Сафронова Г.Н. и др. Сохранение редких и исчезающих видов растений при помощи методов биотехнологии // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 1. С. 19.
2. Новикова Т.И. Использование биотехнологических подходов для сохранения биоразнообразия растений // Растительный мир Азиатской России. 2013. 2 (12). С. 119–128.
3. Князева И.В., Сорокопудов В.Н., Сорокопудова О.А. Комплексная оценка влияния питательной среды и температуры на сохранение земляники садовой *in vitro* // Вестник КрасГАУ. 2020. № 7. С. 47–55.
4. Leung D.W.M. Plant biotechnology helps quest for sustainability: With an emphasis on climate change and endangered plants. In Climate Change and Sustainable Development; Reck R., Ed.; Linton Atlantic Books: Louisville, KY, USA, 2010. pp. 247–250.
5. Chokheli V.A., Dmitriev P.A., Rajput V.D., Bakulin S.D., Azarov A.S., Varduni T.V., Stepanenko V.V., Tarigholizadeh S., Rupesh K.S., Krishan K.V., Minkina T.M. Recent Development in Micropropagation Techniques for Rare Plant Species // Plants 2020. 9. 1733; DOI: 10.3390/plants9121733
6. 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 Cell. // Dev. Biol. 2018. 54. pp. 546–547 DOI: 10.1007/s11627-018-9929-7.
7. Малаева Е.В. Сохранение редких видов растений в генетическом банке Волгоградского регионального ботанического сада // Субтропическое и декоративное садоводство. 2020. № 73. С. 61–68. DOI: 10.31360/2225-3068-2020-73-61-68.
8. Молканова О.И., Горбунов Ю.Н., Ширнина И.В. и др. Применение биотехнологических методов для сохранения генофонда редких видов растений // Ботанический журнал. 2020, Т. 105. № 6. С. 610–619.
9. Молканова О.И., Коновалова Л.И., Стахеева Т.С. Особенности размножения и сохранения коллекции ценных и редких видов растений в условиях *in vitro* // Бюллетень государственного Никитского ботанического сада. 2016. № 120. С. 17–23.

10. Малаева Е.В., Жолобова О.О., Коротков О.И. Формирование и изучение коллекции редких видов *in vitro* в Волгоградском региональном ботаническом саду // Ведение региональных красных книг: достижения, проблемы и перспективы. Волгоград, 2015. С. 290–294.
11. Малаева Е.В., Коротков О.И., Сафронова Г.Н. и др. Клональное микроразмножение редких и ценных видов растений: метод. рекомендации. Волгоград, 2013. 44 с.
12. Методология биотехнологических исследований цветочно-декоративных культур / под общ. ред. И.В. Митрофанова. Волгоград, 2018. 268 с.
- Stepanenko V.V., Tarigholizadeh S., Rupesh K.S., Krishan K.V., Minkina T.M. Recent Development in Micropropagation Techniques for Rare Plant Species // Plants 2020. 9. 1733; DOI: 10.3390/plants9121733
6. 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 Cell. // Dev. Biol. 2018. 54. pp. 546–547 DOI: 10.1007/s11627-018-9929-7.
7. Malaeva E.V. Sohranenie redkih vidov rastenij v geneticheskom banke Volgogradskogo regional'nogo botanicheskogo sada // Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo. 2020. № 73. S. 61–68. DOI: 10.31360/2225-3068-2020-73-61-68.
8. Molkanova O.I., Gorbunov Yu.N., Shirmina I.V. i dr. Primenenie biotehnologicheskikh metodov dlya sohraneniya genofonda redkih vidov rastenij // Botanicheskij zhurnal. 2020, T. 105. № 6. S. 610–619.
9. Molkanova O.I., Konovalova L.I., Staheeva T.S. Osobennosti razmnozheniya i sohraneniya kollekcii cennyh i redkih vidov rastenij v usloviyah *in vitro* // Byulleten' gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada. 2016. № 120. S. 17–23.
10. Malaeva E.V., Zholobova O.O., Korotkov O.I. Formirovanie i izuchenie kollekcii redkih vidov *in vitro* v Volgogradskom regional'nom botanicheskom sadu // Vedenie regional'nyh krasnyh knig: dostizheniya, problemy i perspektivy. Volgograd, 2015. S. 290–294.
11. Malaeva E.V., Korotkov O.I., Safronova G.N. i dr. Klonal'noe mикrorazmnozhenie redkih i cennyh vidov rastenij: metod. rekomendacii. Volgograd, 2013. 44 s.
12. Metodologiya biotehnologicheskikh issledovanij cvetochno-dekorativnyh kul'tur / pod obsch. red. I.V. Mitrofanova. Volgograd, 2018. 268 s.

Spisok istochnikov

1. Zholobova O.O., Korotkov O.I., Safronova G.N. i dr. Sohranenie redkih i ischezayuschih vidov rastenij pri pomoschi metodov biotehnologii // Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2012. № 1. S. 19.
2. Novikova T.I. Ispol'zovanie biotehnologicheskikh podhodov dlya sohraneniya bioraznoobraziya rastenij // Rastitel'nyj mir Aziatskoj Rossii. 2013. 2 (12). S. 119–128.
3. Knyazeva I.V., Sorokopudov V.N., Sorokopudova O.A. Kompleksnaya ocenka vliyaniya pitatel'noj sredy i temperatury na sohranenie zemlyaniki sadovoj *in vitro* // Vestnik KrasGAU. 2020. № 7. S. 47–55.
4. Leung D.W.M. Plant biotechnology helps quest for sustainability: With an emphasis on climate change and endangered plants. In Climate Change and Sustainable Development; Reck R., Ed.; Linton Atlantic Books: Louisville, KY, USA, 2010. pp. 247–250.
5. Chokheli V.A., Dmitriev P.A., Rajput V.D., Bakulin S.D., Azarov A.S., Varduni T.V.,

Благодарность: авторы выражают искреннюю благодарность всем участникам проекта «Редкие и исчезающие виды растений» в рамках Всероссийского конкурса научно-технических проектов «Большие вызовы 2021» за проведенные исследования и написание настоящей статьи: К.К. Збинякову, Д.В. Михалеву, В.Т. Назаренко, В.Б. Резниченко и Е.А. Филатьеву. Особая благодарность за налаженное взаимодействие с авторами на всех этапах работы – от подготовки теоретической части до подачи рукописи.