

УДК575.17:57.085

О.И. Молканова, О.Г. Васильева, Л.Н. Коновалова**НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ СОХРАНЕНИЯ И УСТОЙЧИВОГО ВОСПРОИЗВОДСТВА ГЕНОФОНДА РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

Наряду с традиционными способами сохранения растений *ex situ* все большее значение приобретает использование для этих целей культуры изолированных тканей и органов. Наиболее эффективные методики клонально-го микроразмножения были оптимизированы более чем для 145 видов, 1057 культиваров и отборных форм, относящихся к 57 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, включающая в себя более 1200 генотипов покрытосеменных растений, хранится в условиях замедленного роста (3-7 °С). Установлены важнейшие факторы, влияющие на длительность сохранения в условиях *in vitro*. Особую роль в сохранении растений *in vitro* принадлежит осмотикам, ретардантам и физическим факторам культивирования – температуре и освещенности. При создании генетических банков особое внимание уделяется репрезентативности и сохранению генетической стабильности видов растений. На модельных объектах для оценки стабильности образцов, хранящихся в банке *in vitro*, проведен RAPD-анализ.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, устойчивое воспроизводство, меристемный комплекс, органогенез, депонирование *in vitro*.

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. 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 и сохранение коллекции *in vitro* ценных видов растений и изучение их биологических особенностей на всех этапах культивирования. Объектами исследований для включения растений в цикл культивирования *in vitro* явились ценные и редкие виды растений.

Материал и методы исследований

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, собранные в природных местах 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.

В качестве материала для выделения тотальной ДНК использовали апикальные части побегов в фазе активного роста. Выделение ДНК осуществляли по стандартной методике [2]. Математическую обработку экспериментальных данных осуществляли стандартными методами [3].

Результаты и их обсуждение

Генетический банк растений *in vitro* ГБС РАН является самым представительным в России и содержит около 1200 наименований: 145 вида, 1057 культиваров и отборных форм из 57 семейств. При этом более 65 % в его составе относится к фиторесурсным видам. Наиболее полно представлены семейства Actinidiaceae, Asteraceae, Caprifoliaceae, Ericaceae, Liliaceae, Oleaceae, Rosaceae (рис. 1).

Особое внимание уделяется редким и исчезающим видам, коллекция которых в условиях *in vitro* насчитывает 64 вида из 17 семейств.

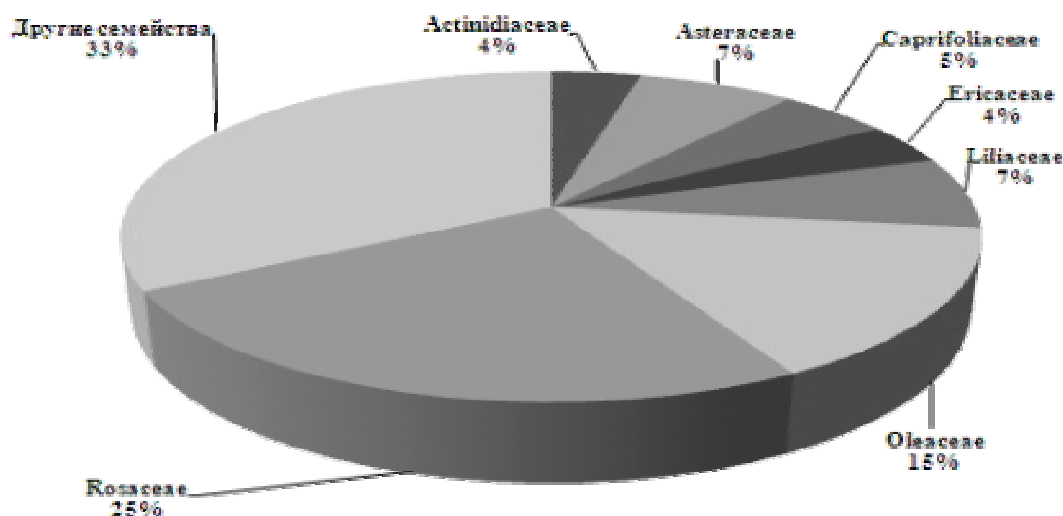


Рис. 1. Количественный состав наиболее представительных семейств в генетическом банке *in vitro* ГБС РАН

При создании генетического банка растений нами были поставлены следующие задачи: 1) сбор, идентификация, описание и номенклатура образцов; 2) комплексное изучение материала с использованием анатомо-морфологических, биотехнологических, биохимических и молекулярно-генетических методов; 3) оптимизация условий длительного сохранения образцов в банках меристем *in vitro* с целью дальнейшего устойчивого воспроизводства; 4) создание базы данных, включающей информацию по каждому конкретному образцу, с возможностью удаленного доступа посредством сети Internet [4].

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 ценных, редких и исчезающих 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. [5]. В зависимости от типа покоя и его сложности использование культуры изолированных зародышей позволяет частично или полностью снять необходимость холодной стратификации и соответственно сократить период прорастания семян. Критерием выбора сроков изоляции зародышей является достижение ими стадии относительной автономности [6]. 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 %.

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 различных таксономических групп растений 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*. Так, на примере рода *Actinidia*

Lindley установлено, что экспланты *Actinidiaarguta* (Ziebold ex Zucc.) Planch. Ex Miq и *Actinidia polygama* (Ziebold et Zucc.) Maxim. развиваются более активно на всех стадиях клонального микроразмножения по сравнению с *Actinidia kolomikta* (Rupr. et Maxim.) Maxim., и это коррелирует с энергией роста вышеназванных видов в природных условиях [7] (табл. 1).

Таблица 1

Морфометрические показатели микропобегов актинидии на стадии микроразмножения (среда MS с добавлением 0,5 мг/л 6-BAР)

Название вида	Число побегов, шт.	Длина побегов, см	Коэффициент размножения
<i>Actinidia kolomikta</i>	1,8 ± 0,9	3,1 ± 1,3	3,1 ± 0,7
<i>Actinidia arguta</i>	2,4 ± 1,1	4,2 ± 1,1	4,6 ± 0,3
<i>Actinidia polygama</i>	3,2 ± 1,3	5,1 ± 1,4	5,7 ± 0,4

Растения, относящиеся к разным таксонам, отличаются уровнем тотипотентности клеток и регенерационным потенциалом. Это обуславливает необходимость дифференцированного подхода к разработке методик клонального микроразмножения. Основной метод, используемый нами при размножении *in vitro* (активация развития существующих в растениях пазушных меристем), который обеспечивает их генетическую идентичность исходным формам [8].

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. Для каждой жизненной формы характерны, в частности, своя продолжительность деятельности верхушечной меристемы в онтогенезе и сроки перехода растения от вегетативного состояния к репродуктивному [9]. 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 органообразовательной 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 [8].

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 [10] (табл. 2).

Таблица 2

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

Названия видов	Емкость почки	Коэффициент размножения (Kp)	Коэффициент корреляции (Kг)
<i>Rhododendron brachycarpum</i>	6,7	1,9	0,81**
<i>Rhododendron catawbiense</i>	7,3	4,0	0,90**
<i>Rhododendron ledebourii</i>	10,0	12,0	0,87**
<i>Rhododendron japonicum</i>	9,0	9,5	0,95**
<i>Rhododendron roseum</i>	9,6	11,8	0,82**

Примечание. Критическое значение Kг при различных уровнях значимости: 0,63 – 95 %-ный уровень значимости (*); 0,77 – 99 %-ный уровень значимости (**)

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 [2]. Степень влияния каждого из названных факторов зависит от генотипа. Генотипом определяются пределы изменчивости регенерационной способности эксплантов и количество формирующихся растений *in vitro*.

В особенностях реализации морфогенетического потенциала, при дедифференцировке клеток и их дальнейшей пролиферации, у многих видов растений основным является взаимодействие «генотип–среда». Это взаимодействие основано на том, что компоненты питательной среды, прежде всего фитогормоны, а также другие условия культивирования изолированных тканей влияют на экспрессию генов, определяющих морфогенез. Различия в реализации морфогенетического потенциала обусловлены прежде всего генотипическими особенностями растений (видом, сортом, линией, формой и т. д.). Для каждого генотипа существует предел нормы реакции, который изменяется под воздействием экзогенных факторов. На этапе размножения у изученных таксонов отчетливо проявляются видовые и сортовые особенности, что выражается в различном количестве дополнительно заложенных почек и развивающихся из них впоследствии побегов. В некоторой степени это обусловлено генетически детерминированным содержанием эндогенных гормонов [6].

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 % [6].

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 [10].

У исследуемых таксонов наблюдали снижение органогенного потенциала по мере увеличения возраста исходного растения. Установлено, что наибольшим морфогенетическим потенциалом характеризуются экспланты, изолированные с растений, находящихся в имматурном-виргинильном состоянии по сравнению с эксплантами, взятыми с растений в генеративной фазе развития. С увеличением возраста интактных растений сирени органогенный потенциал меристемных комплексов *in vitro* резко падает (о чем свидетельствуют данные по общему числу метамеров формируемых регенерантов, рис. 2).

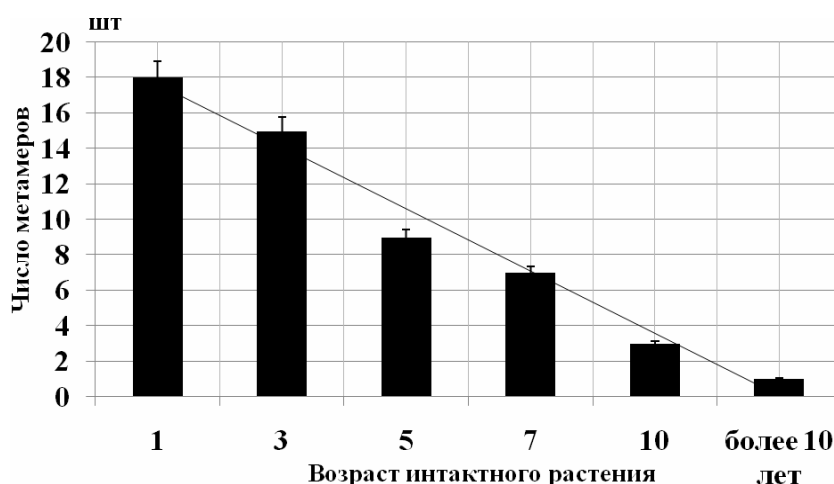


Рис. 2. Влияние возраста интактных растений сирени на число метамеров формируемых регенерантов

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. Основная цель при создании медленно растущих коллекций – сохранение жизнеспособности и аутентичности. В процессе ис-

следований 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 пониженная температура (3–7 °С), слабая освещенность (1200-2500 лк) и ½ MS [4; 6; 7].

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. 3).

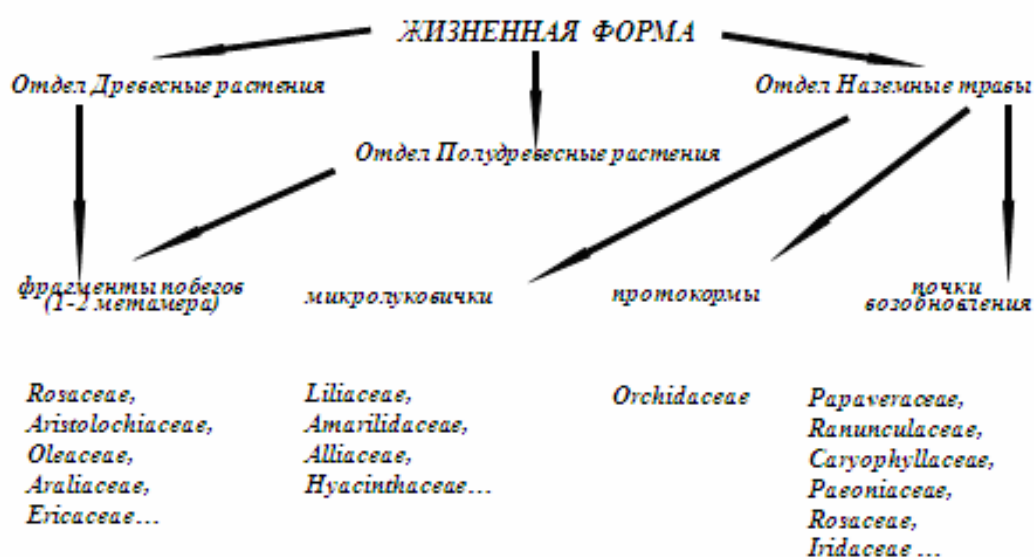


Рис. 3. Схема сохранения растений в условиях *in vitro* (оптимальный тип экспланта для депонирования)

Немаловажным условием поддержания коллекции *in vitro* является сохранение стабильности генотипа полученных микропобегов. В проведенных исследованиях показана возможность использования молекулярно-генетических методов для идентификации и паспортизации коллекционных образцов и изучения аутентичности при хранении *in vitro* [6; 7].

Заключение

Коллекционные образцы *in vitro* – базовая основа для широкого спектра научных исследований и обмена коллекционным материалом с отечественными и зарубежными научными и учебными учреждениями.

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*.

При формировании коллекций *in vitro* используется наиболее важный принцип сохранения биоресурсов *ex situ* – представление вида максимально возможным количеством образцов, происходящих из различных точек ареала. Отбор образцов следует проводить на основе современных методов анализа генетического разнообразия. 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. Гармонизация и разработка правил депонирования при пониженных температурах и культивирования *in vitro* редких видов растений будут проводиться в соответствии с международными соглашениями и стандартами.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
2. Edwards S.K., Johnstone C., Thompson C. Simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // *Nucleic Acids Res.* 1991. Vol. 19, N 6. P. 1349.
3. Доспехов Б.А. Методика опытного дела. М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
4. Молканова О.И., Коротков О.И., Ветчинкина Е.М., Мамаева Н.А., Васильева О.Г. Генетические банки растений: проблемы формирования, сохранения и использования // *Вестн. Удм. ун-та.* 2010. Вып. 3. С. 33-39.
5. Ишмуратова М.И., Ткаченко К.Г. Семена травянистых растений: особенности латентного периода, использование в интродукции и размножении *in vitro*. Уфа: Гилем, 2009. 116 с.
6. 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.
7. Малаева Е.В., Коновалова Л.Н., Молканова О.И. Использование биотехнологических и молекулярных методов для комплексного изучения рода *Actinidia* Lindl. // *Бюлл. Гл. бот. сада.* 2008. Вып. 195. С. 177-187.
8. Молканова О.И., Чурикова О.А., Коновалова Л.Н., Окунева И.Б. Клональное микроразмножение интродуцированных сортов *Syringa vulgaris* L. // *Вестн. МГУ.* 2002. № 4. С. 8-14.
9. Ростовцева З.П. Некоторые признаки дифференциации клеток верхушечной меристемы // *Морфогенез растений.* 1961. № 11. С. 126-131.
10. Васильева О. Г. Биолого-морфологические основы клонального микроразмножения некоторых представителей рода *Rhododendron* L.: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2009. 20 с.

Поступила в редакцию 28.04.15

O.I. Molkanova, O.G. Vasilyeva, L.N. Konovalova

THE SCIENTIFIC BASIS FOR CONSERVATION AND SUSTAINABLE REPRODUCTION OF PLANT GENOFOND IN CULTURE *IN VITRO*

The application of isolated plant tissue and organ culture becomes more and more actual along with traditional plant *ex situ* conservation methods. The highly efficient clonal micropropagation technologies have been improved for more than 145 plant species and 1057 varieties related to 57 families. The development of plant reproduction methods constitutes the basis for the work on preserving the plant gene bank. Optimum explants for sustainable reproduction of plants (apical meristem with leaf primordia) were developed. Scientific and methodological basis for creation and conservation of rare and valuable plants in gene banks *in vitro* are developed. Most of the collection including more than 1200 angiosperm genotypes is stored under conditions providing minimum growth processes (3–7⁰ C). The major factors influencing the duration of explants of plants in laboratory conditions have been established. A special role in conservation of *in vitro* plants is played by retardants, osmotic and physical factors of cultivation: temperature and light intensity. During the creation of gene banks, plant species representativeness and genetic stability preservation is given a high priority. For model species RAPD-analysis has been carried out to control the genetic stability of the items kept in bank *in vitro*.

Keywords: genetic diversity, sustainable reproduction, meristematic complex, organogenesis, conservation in vitro.

Молканова Ольга Ивановна,
кандидат сельскохозяйственных наук,
заведующая лабораторией биотехнологии растений
E-mail: molkanova@mail.ru

Васильева Ольга Григорьевна, кандидат биологических наук,
младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии
растений
E-mail: olgozerova@yandex.ru

Коновалова Людмила Николаевна,
младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии
растений
E-mail: konovalova-lu@yandex.ru

ФГБУН «Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН»
127276, Россия, г. Москва, ул. Ботаническая, 4

Molkanova O.I.,
Candidate of Agriculture, Head of Laboratory
of plant biotechnology laboratory
E-mail: molkanova@mail.ru

Vasilyeva O.G.,
Candidate of Biology, Senior Researcher
E-mail: olgozerova@yandex.ru

Konovalova L.N., Junior Researcher
E-mail: konovalova-lu@yandex.ru

Main Botanical Garden RAS
Botanicheskaya st., 4, Moscow, Russia, 127276