

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ

Т.И. Новикова

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,  
630090, Новосибирск, Золотодолинская, 101, e-mail: tin27@mail.ru

Сохранение генетических ресурсов в коллекциях *in vitro* становится важнейшим вкладом биотехнологии в стратегии сохранения *ex situ*. В этой области используются различные биотехнологические подходы, включая методы культуры ткани, анализ ДНК-маркеров, протоколы криоконсервации, для сбора материала *in vitro*, микроразмножения и оценки регенерантов, хранения, документирования и обмена гермоплазмой.

**Ключевые слова:** биотехнология, биоразнообразие растений, стратегии сохранения, технологии сохранения *in vitro*.

## USE OF BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES FOR THE CONSERVATION OF PLANT BIODIVERSITY

T.I. Novikova

Central Siberian Botanical Garden, SB RAS,  
630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya str., 101, e-mail: tin27@mail.ru

Conservation of plant genetic resources in *in vitro* collections is becoming an essential contribution of biotechnology in *ex situ* conservation strategies. A wide range of biotechnological approaches are utilized in this field including tissue culture techniques, DNA-markers analysis, cryopreservation protocols for *in vitro* collection of materials, micropropagation and characterization of regenerants, conservation, documentation and exchange of germplasm.

**Key words:** biotechnology, plant biodiversity, conservation strategies, *in vitro* conservation technologies.

### ВВЕДЕНИЕ

В течение последних 20 лет, прошедших с момента вступления в силу Конвенции о биологическом разнообразии (КБР) (UNCED, 1992), мы являемся свидетелями столкновения двух противоположных тенденций. С одной стороны, разработаны стратегии устойчивого эколого-социально-экономического развития, имеются институты и организации, призванные реализовывать множество важнейших программных документов, включая, помимо КБР, Глобальную стратегию сохранения растений на 2011–2020 гг., Международную программу ботанических садов по охране растений (2000) и др. С другой стороны, масштаб и интенсивность вмешательства человечества в экосистемы приводят к существенной деградации и фрагментации природных местообитаний, что, наряду с глобальными изменениями климата, способствует резкой потере биологического разнообразия (Newwood, Iriondo, 2003). Существует мнение, что борьба за сохранение биоразнообразия может быть проиграна, так как факторы, приводящие к его деградации, более мощные, чем усилия, предпринимаемые для его защиты (Wood et al., 2000).

В настоящее время только 5 % видов сосудистых растений протестировано на полезность для челове-

чества (ten Kate, Laird, 1999), многие же виды, возможно, потенциально являющиеся пищевыми, лекарственными или техническими, могут быть потеряны до выявления их полезных свойств. Еще в 1999 г. на XVI Международном ботаническом конгрессе отмечалось, что если не принять в ближайшее время решительных мер по сохранению видового разнообразия растений, то к середине XXI в. могут быть утрачены до 2/3 из 300 тыс. видов растений, произрастающих в настоящее время на Земле (Ревин, 2000).

Проблемы предотвращения разрушения природных местообитаний, восстановления численности видов, организации создания и управления заповедными территориями по-прежнему актуальны, однако решать их необходимо с учетом важности и срочности принимаемых мер, с расстановкой приоритетов и поиском новых подходов и инструментов для сохранения биоразнообразия (Newwood, Iriondo, 2003).

Одним из таких новых подходов является использование биотехнологий. В настоящее время мы располагаем широким набором инструментов, включая различные методы культивирования изолированных органов и тканей растений, методы молекулярной диагностики геномов, иммунологическую диа-

гностику и протоколы сохранения видов, в том числе криоконсервацию. Эти методики позволяют на современном уровне проводить сбор, описание объектов, выявление инфекций, размножение, хранение, документирование и обмен генетическими ресурсами (Benson, 2002).

Важно отметить, что биотехнологические подходы к решению проблемы не ограничиваются только сохранением редких, исчезающих видов и полезных растений. Эффективная интеграция биотехнологии в программы сохранения биоразнообразия требует междисциплинарной кооперации с другими областями. Примером такой интеграции являются разработка целенаправленных, эффективных, экологических и экономически выгодных производств, контроль загрязнения природной среды с помощью биосенсоров, внедрение биотехнологий переработки отходов и их

деградации с помощью бактерий и грибов до относительно безопасных продуктов, способствующих восстановлению нарушенных экосистем (Gavrilescu, 2010).

В настоящее время развивается новая междисциплинарная наука – биотехнология сохранения растений, основной задачей которой является дополнение существующих традиционных методов сохранения биоразнообразия *ex situ* и *in situ* современными биотехнологическими инструментами, обеспечивающими возможность устойчивого управления генетическими ресурсами (Benson, 2002). В предлагаемом обзоре кратко изложены и проанализированы основные технологии *in vitro*, используемые в биотехнологии сохранения растений, и определено их значение в стратегии сохранения биоразнообразия *ex situ*.

### МЕТОДЫ СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ *IN SITU* И *EX SITU*

Существуют две базовые стратегии для сохранения генетического разнообразия: *in situ* и *ex situ*. В статье 2 КБР приведены следующие определения этих подходов: сохранение *ex situ* означает поддержание компонентов биологического разнообразия вне естественных местообитаний, сохранение *in situ* – поддержание и восстановление жизнеспособных популяций и экосистем в естественных местообитаниях (UNCED, 1992). Очевидно фундаментальное различие между этими двумя стратегиями: сохранение *ex situ* включает изъятие интересующего нас таксона из мест обитания, перенос и хранение в коллекциях, в то время как сохранение *in situ* предполагает указание места произрастания и мониторинг растения на месте (Maxted et al., 1997).

Эти базовые стратегии сохранения подразделяются на специфические технологии (рис. 1). Сохранение *ex situ* включает хранение семян, полевой генбанк или “живые” коллекции, банки *in vitro*, хранение ДНК и пыльцы. Стратегия сохранения *in situ* – под-

держание компонентов биологического разнообразия на особо охраняемых природных территориях (ООПТ): заповедниках, заказниках, национальных парках, памятниках природы, и сохранение агробиоразнообразия в условиях фермерских хозяйств (on farm) и на приусадебных участках. Последнее имеет важное значение для создания новых сортов сельскохозяйственных культур (Maxted et al., 2012). Международным институтом генетических ресурсов растений (IPGRI) издано специальное пособие для внедрения программы сохранения генетического разнообразия в условиях хозяйства (on farm) с целью вовлечения фермеров в национальные программы по сохранению биоразнообразия и селекции (Джарвис и др., 2002). Особое внимание уделяется сохранению *in situ* дикорастущих сороричей и родственных видов культивируемых сортов, отличающихся большой вариабельностью и служащих генетическим резервуаром для дальнейшей селекции (Dulloo et al., 2010).

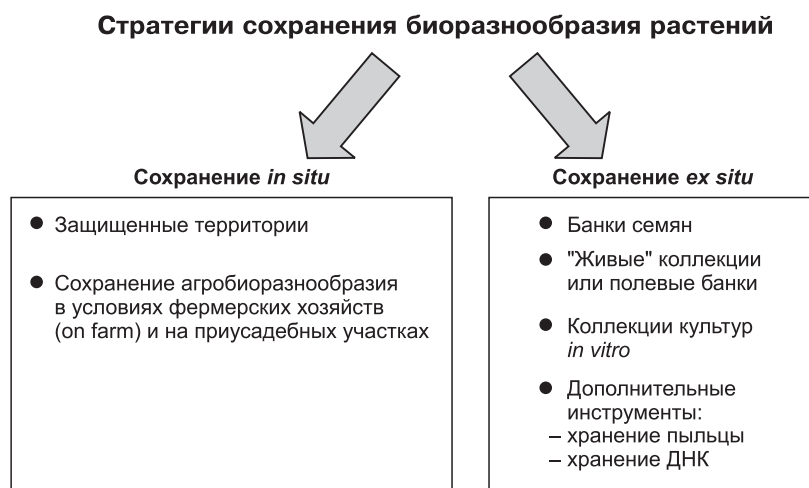


Рис. 1. Стратегии сохранения биоразнообразия растений.

Каждая из стратегий имеет определенные преимущества и недостатки (Engels, Wood, 1999). Преимущества сохранения *ex situ* заключаются в возможности изучения биологии видов, ускоренного их использования в селекции, генетического контроля материала, несложного доступа к коллекции и относительной гарантии ее сохранности. Однако отделение генетического материала от его природного окружения в случае использования технологий *ex situ* останавливает эволюционные процессы, поэтому исследователи отмечают динамичную природу сохранения *in situ* и более статичную – *ex situ* (Engelmann, Engels, 2002).

Стратегии *in situ* позволяют сохранить как генетический материал, так и процессы, дающие начало разнообразию. Однако использование этого подхода является эффективным, если сохраняемые популяции содержат большое число особей. В случае же фрагментации местообитаний, сокращения числа особей в популяции происходит генетическая эрозия (Kramer, Havens, 2009). Исследователи отмечают сложность контроля за гермоплазмой в условиях *in situ*, проблематичность доступа к растениям, влияние природных факторов (наводнений, пожаров, засух), антропогенную нагрузку и др. (Engelmann, Engels, 2002).

В последнее время разрабатываются интегрированные технологии, сочетающие элементы сохранения *in situ* и *ex situ* (Burney D., Burney L., 2007; Volis, Blecher, 2010). Одна из таких технологий – *inter-situ* – предполагает реинтродукцию редких и исчезающих в естественные условия, где они произрастали ранее

согласно палеоэкологическим данным, но были уничтожены в результате антропогенной нагрузки на популяции (Burney D., Burney L., 2007). Однако, несмотря на привлекательность и потенциальную пользу сохранения *inter-situ*, детальная методология подхода отсутствует (Husband, Campbell, 2004), что приводит к разнообразным трактовкам от сохранения “on farm” до реинтродукции и рекреации природных сообществ (Burney D., Burney L., 2007; Cochrane et al., 2007). Новая комплементарная *in situ*–*ex situ* стратегия, предлагаемая С. Волисом и М. Блечером, названа авторами “квази” *in situ* (Volis, Blecher, 2010). По замыслу авторов, предлагаемая стратегия должна служить мостиком, связывающим две базовые стратегии. Ими разработана детальная концептуальная схема, включающая пять важных этапов, от первичного анализа распределения редких видов в природе и репрезентативного взятия образцов до заключительного этапа мониторинга успешности их реинтродукции в подходящие природные условия. Стратегия “квази” *in situ* может быть особенно успешна для уязвимых и редких видов, подвергаемых быстрой деструкции в природных местообитаниях, представленных небольшим числом популяций и произрастающих на территориях вне заповедников, заказников или национальных парков. В отличие от “живых” коллекций, относящихся к технологиям *ex situ*, эта стратегия позволяет сохранять растения на менее ограниченных пространствах, в более подходящих природных условиях, в созданных самоподдерживающихся популяциях. К тому же затраты на поддержание коллекции невелики и касаются начальных этапов (Volis, Blecher, 2010).

### ТЕХНОЛОГИИ *IN VITRO* КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ОПЦИЯ В СТРАТЕГИИ СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ *EX SITU*

Сохранение биоразнообразия растений *ex situ* в настоящее время является самым эффективным и распространенным методом благодаря деятельности ботанических садов (Андреев, Горбунов, 2003). В 148 странах мира на сегодня насчитывается более 1800 ботанических садов и дендрариев, в коллекциях которых представлены более 80 тыс. видов, что составляет почти одну треть от общего количества сосудистых растений. Помимо живых коллекций, около 10 % ботанических садов поддерживают коллекции семян и 2 % – коллекции *in vitro* (Engelmann, Engels, 2002).

Возможности сохранения биоразнообразия в коллекциях *ex situ* связаны с отдельными стадиями жизненного цикла растений (семена, споры, пыльца) и их природной адаптацией длительно поддерживать жизнеспособность (Neuwood, Iriondo, 2003). Создание банков семян является одним из наиболее эффективных и широко распространенных методов хранения гермоплазмы, обусловленным его простотой, сравнительно низкой трудоемкостью и возможностью содержать большое количество образцов. До недавнего

времени значительные усилия по созданию генбанков семян касались, в первую очередь сельскохозяйственных культур, включая злаки, бобовые и др. В итоге глобальных усилий в мировом масштабе было создано свыше 1300 генбанков, поддерживающих примерно 6.1 млн образцов (FAO, 1996). Так как большинство семян пищевых растений относятся к ортодоксальным, т. е. могут быть обезвожены до низкого содержания влаги (от 3 до 7 % в зависимости от вида), они успешно хранятся длительное время при низких температурах (–18 °С) или в условиях криоконсервации (Roberts, 1973; Engelmann, 2011). Однако существуют другие виды растений, в том числе редкие и исчезающие, для которых хранение семян проблематично. Некоторые из них не продуцируют семян или имеют стерильные семена, поэтому размножаются вегетативно. Другие формируют неортодоксальные или рекальцитратные семена, для которых обезвоживание до уровня, необходимого для хранения при низких температурах, невозможно (Roberts, 1973). Их хранят во влажных, теплых условиях ограниченное время. Существует большая группа растений, формирующих

семена “промежуточного” типа (Ellis et al., 1991), традиционным методом сохранения которых является создание полевых коллекций. Поскольку семена дикорастущих видов мало исследованы, их рекомендуют хранить при 4 °С и содержании влаги 7–8 %. Согласно стандартам, разработанным IPGRI, последовательность процедур при создании банка семян следующая: сбор, подготовка семян, сушка, упаковка, хранение, периодические испытания всхожести, регенерация семян, повторное хранение и документация на каждом этапе деятельности (FAO/IPGRI, 1994).

Несмотря на большие преимущества банков семян по сравнению с другими методами сохранения *ex situ*, следует отметить, что их содержание затратно из-за высоких расходов на электроэнергию для холодильных установок и на обслуживание (регулярное тестирование на всхожесть, регенерация семян и др.). К тому же существует риск полной или частичной потери коллекций при воздействии экстремальных факторов среды. Недавний пример: гибель почти половины банка семян в Японии из-за цунами в 2011 г. Как альтернатива в РФ рассматривается создание Федерального криобанка семян культурных, редких и исчезающих видов растений объемом более 100 тыс. сортообразцов, расположенного в толще многолетнемерзлых пород Якутии со стабильными температурами не выше –4 °С. По мнению ученых, затраты на хранение семян в таком криохранилище могут быть существенно снижены за счет оптимизации температурно-влажностных и газовых условий, отсутствия расходов на электроэнергию и др. (Кершенгольц и др., 2008).

Полевые генные банки или “живые” коллекции являются основной стратегией для охраны долгоживущих многолетников, рекальцитратных и вегетативно размножающихся видов, особенно древесных. В некоторых случаях они служат единственным доступным вариантом для сохранения зародышевой плазмы (Ramsay et al., 2000). Поскольку “живые” коллекции создаются и поддерживаются главным образом в ботанических садах, где исследователи стараются сохранять множество декоративных, лекарственных, пищевых видов растений, они характеризуются высоким межвидовым генетическим разнообразием и низким внутривидовым (Engelmann, Engels, 2002). Полевые банки служат основой для проведения морфологических, биохимических, онтогенетических исследований дикорастущих и культурных растений, широко используются в просветительских и образовательных целях. Однако они чрезвычайно уязвимы из-за процессов случайного дрейфа генов, искусственного отбора и накопления мутаций, заражения патогенами и поражения насекомыми (Hamilton, 1994).

Некоторые редкие виды из-за их особых требований к условиям произрастания невозможно вырастить в условиях интродукции (Семенова, 2007). Кро-

ме того, возможности обмена генофондом ограничены из-за риска передачи болезней. Создание и хранение гермоплазмы в полевых генных банках высоко затратны, требуют больших площадей, тщательного и своевременного ухода с использованием ручного труда (Withers, Engels, 1990).

Дополнительные коллекции *ex situ* – банки пыльцы и банки ДНК – вносят определенный вклад в сохранение биоразнообразия растений (см. рис. 1). Сохранение пыльцы может быть полезным для базовых коллекций видов, которые не продуцируют ортодоксальных семян. Сбор и хранение пыльцы чрезвычайно важны в селекционном процессе для проведения скрещиваний в определенное время, а также для контроля опыления. Однако при этом способе хранения могут быть потеряны некоторые цитоплазматические гены. Поскольку информация о параметрах хранения пыльцы дикорастущих видов фрагментарна, этот метод используют главным образом для некоторых дикорастущих сородичей сельскохозяйственных сортов, для лекарственных и древесных видов (Eberhart et al., 1991).

Создание сети банков ДНК (ДНК-банка-Net) в дополнение к другим коллекциям *ex situ* является сравнительно новым способом хранения генетических ресурсов в стабильном состоянии. Сохраняемые образцы ДНК идеальны для использования в двух целях (Frankel et al., 1998). Это прежде всего удобный экспериментальный материал, готовый для проведения исследований, например, в молекулярной филогенетике и систематике таксонов, для оценки биоразнообразия растений и введения новых генов в другие виды растений в селекционных целях и др. (Adams, 1997). В то же время это – своеобразная “капсула времени” для длительного и надежного хранения гермоплазмы, без затрат на регенерацию материала (Frankel et al., 1998). Однако использование дополнительной опции для сохранения редких и исчезающих видов невозможно, так как при хранении ДНК удается восстановить отдельные гены, а не геномы или целые растения, поэтому этот подход не может заменить другие технологии сохранения *ex situ* (банки семян, живые коллекции или коллекции *in vitro*) (Там же).

Возможность создания банка культур *in vitro* для длительного хранения генофонда растений является важнейшим достижением биотехнологии (Новикова и др., 2008; Новикова, Дорогина, 2010; Fay, 1992; Benson et al., 2000; Sarasan et al., 2006). В качестве объектов используются: редкие или исчезающие виды растений; рекальцитратные виды, имеющие проблемы с семенным или вегетативным размножением; элитные генотипы растений или растения, полученные с помощью генетической инженерии (Engelmann, 2011). Технологии *in vitro* позволяют одновременно достичь высокого уровня мультипликации растительного материала и освобождения от вирусных, бактериальных

и грибных заболеваний (Бутенко, 1999). Миниатюризация эксплантов значительно экономит рабочие пространства, затраты на труд для поддержания коллекций. Протоколы микроразмножения, разработанные для нескольких тысяч растений, включая редкие и исчезающие, служат основой для успешного введения в культуру, размножения и сохранения в банке культур *in vitro* новых образцов (Fay, 1992; George et al., 2008). Так, в коллекции Королевского ботанического сада (Кью, Великобритания) в банке *in vitro* поддерживается свыше 3 тыс. таксонов, большинство из которых редкие и исчезающие виды (Sarasan et al., 2006).

Согласно Е.Е. Бенсон, биотехнологические методы сохранения гермоплазмы должны быть интегрированы как дополнительная опция в существующие программы по сохранению биоразнообразия (Benson, 2002). На первом этапе оценивается необходимость сохранения того или иного таксона, срочность принимаемых мер. Далее выбирается подходящая технология для сохранения с учетом стоимости затрат. Например, если уже используется сохранение в банке семян, то замена на технологии сохранения *in vitro* нецелесообразна. Биотехнологические подходы не

должны вытеснять успешно работающие традиционные технологии. Если выбранный таксон относится к объектам биотехнологии (см. выше), то оценивается пригодность того или иного подхода для его сохранения, стоимость затрат, наличие опыта, необходимость долговременного хранения. Разработка эффективных протоколов размножения и сохранения таксонов позволяет включать эти технологии в программы сохранения *ex situ* на регулярной основе. Далее рассматривается возможность расширения сферы применения разработанных методов к другим видам, сортам, гибридам и пр. Регулярно проводится оценка эффективности биотехнологического подхода по сравнению с другими методами сохранения *ex situ* и *in situ* (Benson, 2002).

Хотя главным в понятии сохранения гермоплазмы с помощью методов культуры ткани является "хранение", но это целый процесс, включающий ряд технологий: сбор материала с использованием методов *in vitro*, разработку методов микроразмножения, оценку генетической "чистоты" полученных регенерантов, поддержание клонов в условиях замедленного роста или криоконсервации (Withers, 1995).

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ *IN VITRO* ДЛЯ СБОРА ЗАРОДЫШЕВОЙ ПЛАЗМЫ РЕДКИХ ВИДОВ И ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ

Сбор растительного материала является первым шагом в получении растительной зародышевой плазмы растений (рис. 2). Технологии *in vitro* могут существенно увеличить эффективность сбора за счет специальных приемов инициации культуры ткани в полевых условиях (Pence, 2005). Поскольку в некоторых случаях в природных местообитаниях сохранилось лишь несколько особей редких видов, то сбор матери-

ала *in vitro* может быть менее инвазивным, чем изъятие целых растений из природных местообитаний. Кроме того, этот прием является эффективным для сбора большого количества образцов, когда семена или не созрели на момент экспедиции, или имеют нарушения в развитии (Reed et al., 2011). В теории, благодаря тотипотентности растительных клеток, почти все клетки растений способны дать начало целому ор-



Рис. 2. Включение технологий *in vitro* в сохранение биоразнообразия *ex situ* (по L.A. Withers, 1995, с модификациями).

ганизму под влиянием благоприятных факторов. Поэтому в качестве исходного материала для введения в культуру ткани могут быть использованы зиготические эмбриониды или вегетативные части растений, такие как почки, побеги, луковички, листья и др. (Engelmann, 2011).

Сложности сбора материала *in vitro* связаны с тем, что работы проводятся в полевых условиях и растительные объекты неизбежно подвергаются заражению воздушной инфекцией. Освобождение от бактериальной и грибной инфекций является критическим фактором, влияющим на успешность этой технологии (Pence, Sandoval, 2002). Известно, что бактерии и грибы быстро развиваются как сапрофиты в культуральной среде, и поскольку их пищевые потребности в основном те же, что и у растений, то они конкурируют с растениями за питание, продуцируя фитотоксины, губительно действующие на растительные ткани и их рост. Разные факторы влияют на уровень контаминации – возраст ткани (более зрелые ткани обычно наиболее заражены, чем молодые), локализация тканей (над или под землей) и загрязненность окружающей среды. Поверхностная стерилизация является первым шагом для получения асептических культур, который должен быть сделан на месте сбора или в лаборатории после того, как образец ткани помещен в среду для транспортировки. Для предотвращения бактериального или грибного заражения в среду должны быть введены антибиотики и фунгициды. Список используемых препаратов приведен в обзоре В.С. Пенса и Д.А. Сандовал (Pence, Sandoval, 2002). Однако следует учесть, что более предпочтительны короткие обработки антибиотиками (10 дней), чем длительное их применение при постоянном внесении в среды выращивания (Reed et al., 1995). Загрязнение грибной инфекцией преодолевается с помощью фунгицидов или при использовании сред с высоким осмотическим давлением (Obeidy, Smith, 1990).

## СПЕЦИФИКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИНСТРУМЕНТОВ РАЗМНОЖЕНИЯ

Следующий этап после успешной инициации культур *in vitro* – это индукция побегообразования и собственно размножение. Для некоторых редких видов, особенно это касается древесных, трудно сразу добиться максимального роста и размножения в культуре ткани. Для оптимизации стадии размножения используют различные питательные среды, подбирают концентрации и комбинации регуляторов роста, вводят в состав сред добавки. Культуры могут поддерживаться на агаризованных или в жидких питательных средах, в варьирующих условиях, зависящих от потребностей конкретных генотипов растений (Sarasan et al., 2006).

Поскольку целью использования биотехнологий для редких или элитных генотипов является сохране-

Успех введения в культуру *in vitro* во многом зависит от выбора подходящего экспланта и его размеров, от эффективности стерилизации и последующего удаления стерилизующих веществ, от подбора питательных сред. Не менее важны физические факторы – свет, температура и влажность (Withers, 2002). Для успешного старта необходим поиск в литературе протоколов введения в культуру родственных видов, так как количество исходного материала редких растений, как правило, ограничено. Следует учитывать, что редкие и исчезающие виды могут иметь особые потребности в компонентах сред, поэтому необходима их модификация (Sarasan et al., 2006).

Нередко барьером для успешной инициации культур является побурение тканей первичных эксплантов и сред за счет экссудации фенольных соединений из поверхности срезов. Для решения этой проблемы в состав сред вводят активированный уголь, поливинилпирролидон (ПВП), проводят предобработки эксплантов растворами антиоксидантов (аскорбиновой кислотой, цистеином, нитратом серебра) или увеличивают частоту субкультивирования (Benison et al., 2000; Panaia et al., 2000).

Одним из ключевых моментов является использование растительного материала, идентифицированного специалистами-ботаниками. В паспортные данные необходимо внести информацию о месте сбора, включающую координаты GPS, фотографии зоны распространения и максимальные сведения о естественной среде (Reed et al., 2005). При возможности образцы должны быть взяты из разных природных популяций в количестве, достаточном для дальнейшей разработки протоколов сохранения *in vitro* (Ветчинкина и др., 2012). Паспортные данные образцов необходимы для формирования единого банка данных коллекций культур *in vitro*, что позволит не только использовать полученные клоны для пополнения “живых” коллекций, но и включать их в программы международного обмена (см. рис. 2).

ние гермоплазмы и поддержание ее в стабильном состоянии, то после успешной инициации культур *in vitro* выбираются определенные методы микроразмножения, минимизирующие риск соматональных вариаций (Engelmann, 2011). К числу таких технологий относится прежде всего метод активации уже существующих в растении меристем (апекса стебля, пазушных почек), который в отличие от других типов микроразмножения считается надежным в плане генетической стабильности полученных регенерантов (Rani, Raina, 2000). Однако иногда микроразмножение путем регенерации из апикальных или пазушных меристем, не идентично материнским растениям. Это может быть связано с использованием регуляторов роста, особенно синтетических, других компо-

нентов питательных сред или длительным субкультивированием (Martin et al., 2006). К тому же для многих редких видов используются технологии регенерации через стадию каллусообразования (Sarasan et al., 2006). Морфогистологические исследования позволяют выявить пути морфогенеза в культуре *in vitro* (George et al., 2008). Обязательный этап работ по сохранению видов включает проверку генетической “чистоты” полученных регенерантов с помощью анализа фенотипов, проточной цитометрии, изоферментных систем или молекулярных маркеров (RAPD, ISSR и др.) (Devarumath et al., 2002; Sarasan et al., 2006; Bhatia et al., 2011).

Метод микроразмножения через апикальные меристемы многие годы используется для элиминации вирусов, которые могут присутствовать в тканях без каких-либо симптомов и передаваться при мас-

совом тиражировании (Faccioli, Marani, 1998). Технологии базируются на неравномерном распределении вирусов в молодых тканях апексов побегов, причем их концентрация значительно снижается в апикальной меристеме верхушки стебля, где клетки находятся в состоянии постоянного деления (Wang, Valkonen, 2009). Поскольку, по мнению Б.В.В. Граут (Grout, 1990), только конус нарастания побега и первый листовый примордий обычно свободны от вирусов, размеры изолируемой меристемы имеют решающее значение. Культивирование меристем в комбинации с термотерапией дает положительные результаты, необходимые для массового размножения безвирусного материала, что существенно упрощает международный обмен гермоплазмой редких, исчезающих и ресурсных видов растений (Engelmann, 2011).

### ТЕХНОЛОГИИ ХРАНЕНИЯ КУЛЬТУР *IN VITRO*

Методические приемы, существующие на сегодня, делятся на две группы. Одна из этих групп основывается на хранении культур без нарушения процесса роста, тогда как вторая – на хранении либо при замедлении роста, либо при полной его остановке (криоконсервации) (см. рис. 2). Первый подход является достаточно затратным, так как связан с частым субкультивированием растительного материала.

Хранение в условиях замедленного роста позволяет поддерживать биологический материал от нескольких месяцев до 2–3 лет без субкультивирования в зависимости от используемой технологии и вида растения (Cruz-Cruz et al., 2013). Замедление роста обычно достигается за счет модификации сред или условий культивирования. Модификации сред включают разбавление минеральной основы, снижение содержания сахарозы, изменение концентраций или комбинаций регуляторов роста, добавление осмотически активных веществ (Engelmann, 2011). Из физических факторов культивирования снижают температуру в комбинации с уменьшением интенсивности освещения, а иногда культуры хранят в полной темноте. Температуру при среднесрочном хранении обычно поддерживают от 4 °C до комнатной температуры (Tassy et al., 2006). Однако для тропических видов, чувствительных к низким температурам, используют диапазон от 15 до 20 °C и даже выше, поэтому для их поддержания без частых субкультивирований требуются модификации химического состава сред (Paunescu, 2009). Также на эффективность хранения в условиях замедленного роста влияют тип эксплантов, их физиологическое состояние, объем культуральных сосудов и др. По окончании периода хранения культуры переносят на свежие среды, стимулируют их рост, а затем переводят в условия следующего цикла хранения (Engelmann, 2012).

Технологии хранения культур *in vitro* в условиях замедленного роста рутинно используются во многих лабораториях для увеличения интервалов между субкультивированиями, к тому же метод не требует дополнительного оборудования. Однако этот подход не решает главную проблему – высокую затратность технологий, к тому же возможен риск соматональных вариаций для некоторых видов (Blakesley et al., 1996).

Метод криоконсервации, позволяющий поддерживать живые клетки, ткани, культуры при ультранизких температурах (–196 °C), обеспечивает хранение биологических материалов в течение длительного времени, так как при температуре жидкого азота прекращаются метаболическая активность и деление клеток, поэтому в них не происходит генетических изменений. Кроме того, криоконсервация не требует больших помещений, образцы не подвергаются риску контаминации или ошибок оператора, что возможно при частых манипуляциях с растительным материалом (Engelmann, 2004).

На сегодня криоконсервация считается единственной приемлемой технологией для долговременного, надежного, низко затратного хранения различных категорий растительного материала, включая неортодоксальные семена, зиготические и соматические эмбриониды, суспензионные клетки, каллусы, протопласты, гаметы и меристемы (Engelmann, 2011). Специфика растительных клеток (большие размеры, значительная вакуолизация, высокое содержание воды, пластичность метаболизма), генетическая вариабельность таксонов требуют различных технологических подходов, и протоколы для криоконсервации растительного материала не могут быть универсальными, как в случае животных тканей и клеток.

Во всех процессах криоконсервации удаление воды играет главную роль в предотвращении повреждения материала кристаллами льда и поддержании

жизнеспособности растительного материала при последующем оттаивании. Существуют два подхода к криоконсервации, которые различаются по физическим механизмам: классические процедуры криоконсервации, основанные на вызванном замораживанием обезвоживании, и флэш-замораживание (витрификация), которая включает обезвоживание материала до его охлаждения (Gonzalez-Arno et al., 2008).

Классические подходы включают криоконсервацию с использованием различных криопротекторов в сочетании с предкультивированием на средах, содержащих маннит, сорбит или аминокислоты (пролин, аланин, серин, аспаргин). Метод включает медленное охлаждение (0.5–2.0 °C/мин) до определенной температуры перед заморозкой (обычно около –40 °C) и быстрое погружение образцов в жидкий азот, хранение, быстрое оттаивание и восстановление (Cruz-Cruz et al., 2013). Эти технологии используют для хранения недифференцированных каллусных или суспензионных клеток, апексов холодоустойчивых видов.

Второй подход, основанный на витрификации, включает дегидратацию образцов перед охлаждением путем воздействия высококонцентрированным криопротекторным раствором и/или путем воздушной сушки, что препятствует формированию в дальнейшем внутриклеточного льда. Витрификация – физический процесс, определяемый как переход жидкой фазы в аморфное стеклоподобное состояние (Fahy et al., 1984). При этом подходе процедура дегидратации за счет охлаждения, характерная для классического подхода, исключена, и процесс постепенного понижения температуры заменен на ультрабыстрое охлаждение подготовленных образцов. Протоколы, основанные на витрификации, постоянно улучшаются. Так,

Использование биотехнологических подходов для сохранения биоразнообразия генетических ресурсов растений не только развивается высокими темпами, но и имеет значительный потенциал на будущее. Успешность этих подходов обеспечивается эффективным применением технологий *in vitro* в процессах сбора материала, его освобождения от инфекций, введения в культуру и микроразмножения, проведения оценки генетической чистоты полученных регенерантов с помощью ДНК-маркеров и их хранения. Несомненный прогресс в настоящее время отмечается в области криоконсервации как способе длительного хранения различных типов растительного материала (семян, меристем, эмбриоидов и др.).

В каждом случае при выборе стратегии сохранения *in vitro* конкретного таксона необходимо анали-

разработана технология инкапсуляции–дегидратации для продуцирования искусственных семян: экспланты инкапсулируют в альгинатные шарики, подрастив их в жидкой среде, обогащенной сахарозой в течение 1–7 дней, частично подсушивают в потоке воздуха в ламинаре или с помощью силикагеля и затем быстро погружают в жидкий азот. Этот подход дает стабильный положительный результат для длительного хранения меристем многих видов (Gonzalez-Arno et al., 2008), соматических зародышей хвойных (Engelmann 2011), ряда цитрусовых видов и сортов и др.

Оттаивание витрифицированной зародышевой плазмы после криоконсервации обычно выполняется в два этапа: первый медленный этап, как правило, при комнатной температуре, затем, для избежания появления льда, проводят быстрое согревание материала при температуре 45 °C (Benson et al., 2008). Для восстановления метаболической активности клеток и нормализации их водного баланса удаляют токсичные криопротекторы с помощью специальных растворов (Sakai et al., 1990). Поскольку процессы оттаивания и регидратации могут сопровождаться всплеском активных форм кислорода, вызывающих повреждение белков, липидов и нуклеиновых кислот, то используют специальные обработки катодной водой, растворами аскорбиновой кислоты, токоферола, обладающих высокой антиоксидантной активностью (Kaczmarczyk et al., 2012).

В настоящее время имеется большое количество публикаций в научных журналах, например, в *Cryo-Letters*, по криоконсервации меристематических и эмбриогенных тканей, спящих почек, протопластов и др., доказывающих перспективность подхода для сохранения генофонда многих редких и ресурсных видов растений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование биотехнологических подходов для сохранения биоразнообразия генетических ресурсов растений не только развивается высокими темпами, но и имеет значительный потенциал на будущее. Успешность этих подходов обеспечивается эффективным применением технологий *in vitro* в процессах сбора материала, его освобождения от инфекций, введения в культуру и микроразмножения, проведения оценки генетической чистоты полученных регенерантов с помощью ДНК-маркеров и их хранения. Несомненный прогресс в настоящее время отмечается в области криоконсервации как способе длительного хранения различных типов растительного материала (семян, меристем, эмбриоидов и др.).

Обмен информацией и материалом *in vitro* между биотехнологическими лабораториями ботанических садов и других исследовательских центров является важнейшим этапом успешной реализации программ по сохранению биоразнообразия растений.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Программы Президиума РАН № 30.3 “Сохранение редких и исчезающих видов растений Сибири *ex situ*”.



## ЛИТЕРАТУРА

- Андреев Л.Н., Горбунов Ю.Н.** Роль ботанических садов России в сохранении биологического разнообразия растений // Биологическое разнообразие. Интродукция растений: Материалы 3-й Междунар. науч. конф. СПб., 2003. С. 5–7.
- Бутенко Р.Г.** Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М., 1999. 160 с.
- Ветчинкина Е.М., Ширнина И.В., Ширнин С.Ю., Молканова О.И.** Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro* // Вестн. Балтийского фед. ун-та им. И. Канта. 2012. Вып. 7. С. 109–118.
- Глобальная стратегия сохранения растений на 2011–2020 гг.** URL: [http://www.bgci.org/plants2020\\_ru/gspc-cbd/](http://www.bgci.org/plants2020_ru/gspc-cbd/)
- Джарвис Д.И., Майер Л.Ю., Клемик Х. и др.** Учебное пособие по *in situ* сохранению в условиях хозяйства IPGRI. Рим, 2002. 172 с.
- Кершенгольц Б.М., Иванов Б.И., Десяткин Р.В. и др.** Использование естественного холода многолетнемерзлых пород для длительного хранения генетических ресурсов // Вестн. ВОГиС. 2008. Т. 12, № 4. С. 524–533.
- Международная программа ботанических садов по охране растений.** М., 2000. 57 с.
- Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В.** Сохранение редких и полезных растений в коллекции Центрального сибирского ботанического сада // Вестн. ВОГиС. 2008. Т. 12, № 4. С. 564–572.
- Новикова Т.И., Дорогина О.В.** Сохранение редких и исчезающих видов флоры Сибири методами *ex situ* // Тр. Том. гос. ун-та. Сер. Биол. 2010. Т. 274. С. 276–278.
- Ревин П.** Речь на XVI Международном ботаническом конгрессе // Информ. бюл. Совета ботанических садов России и Отд-ния Междунар. совета по охране растений. 2000. Вып. 11. С. 38–47.
- Семенова Г.П.** Редкие и исчезающие виды флоры Сибири. Новосибирск, 2007. 408 с.
- Adams R.P.** Conservation of DNA: DNA banking // Biotechnol. and Plant Genetic Resources Conservation and Use. Wallingford, 1997. P. 163–174.
- Benson E.E.** Plant Conservation Biotechnology. Taylor and Francis. 2002. 309 p.
- Benson E.E.** Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice // Critical Rev. Plant Sci. 2008. V. 27. P. 141–219.
- Benson E.E., Danaher J.E., Pimbley I.M. et al.** *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant // Biodiversity and Conservation. 2000. V. 9. P. 711–726.
- Bhatia R., Singh K.P., Sharma T.R., Jhang T.** Evaluation of the genetic fidelity of *in vitro*-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers // Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2011. V. 104. P. 131–135.
- Blakesley D., Pask N., Henshaw G.G., Fay M.F.** Biotechnology and the conservation of forest genetic resources: *In vitro* strategies and cryopreservation // Plant Growth Regul. 1996. V. 20. P. 11–16.
- Burney D.A., Burney L.P.** Paleocology and “inter-situ” restoration on Kaua’i, Hawai’i // Front. Ecol. Environ. 2007. V. 5. P. 483–490.
- Cochrane J.A., Crawford A.D., Monks L.T.** The significance of *ex situ* seed conservation to reintroduction of threatened plants // Aust. J. Bot. 2007. V. 55. P. 356–361.
- Convention on Biological Diversity/UNCED.** Geneva, 1992. 34 p.
- Cruz-Cruz C.A., González-Arnao M.T., Engelmann F.** Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity // Resources. 2013. V. 2. P. 73–95.
- Devarumath R., Nandy S., Rani V., Marimuthu S., Muralleedharan N., Raina S.** RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assam-India type) // Plant Cell Rep. 2002. V. 21. P. 166–173.
- Dulloo M.E., Hunter D., Borelli T.** *Ex situ* and *in situ* conservation of agricultural biodiversity: Major advances and research needs // Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. 2010. V. 38. P. 123–135.
- Eberhart S.A., Roos E.E., Towill L.E.** Strategies for long-term management of germplasm collections // Genetics and conservation of rare plants. Oxford, 1991. P. 133–145.
- Ellis R.H., Hong T.D., Roberts E.H.** An intermediate category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee // J. Exp. Bot. 1991. V. 42. P. 653–657.
- Engelmann F.** Plant cryopreservation: Progress and prospects // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2004. V. 40. P. 427–433.
- Engelmann F.** Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2011. V. 47. P. 5–16.
- Engelmann F.** Germplasm Collection, Storage and Conservation // Plant Biotechnol. Agr. Oxford, 2012. P. 255–268.
- Engelmann F., Engels J.M.M.** Technologies and strategies for *ex situ* conservation // Managing Plant Genetic Diversity. Rome, 2002. P. 89–104.
- Engels J.M.M., Wood D.** Conservation of agrobiodiversity // Agrobiodiversity: Characterisation, Utilisation and Management. CAB. 1999. P. 355–386.
- Faccioli V.C., Marani F.** Virus Elimination by Meristem Tip Culture and Tip Micrografting // Plant Virus Disease Control. St. Paul, 1998. P. 346–380.
- Fahy G.M., MacFarlane D.R., Angell C.A., Meryman H.T.** Vitrification as an approach to Cryopreservation // Cryobiology. 1984. V. 21. P. 407–426.
- FAO/IPGRI.** Genebank standards. Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Plant Genetic Resources Institute. Rome, 1994. 43 p.
- FAO.** State of the World’s Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. 1996. 82 p.
- Fay M.F.** Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods // In Vitro Cell Dev. Biol. 1992. V. 28. P. 1–4.

- Frankel O.H., Brown A.H.D., Burdon J.J.** The Conservation of Plant Biodiversity. Cambridge, 1998. 301 p.
- Gavrilescu M.** Environmental biotechnology: achievements, opportunities and challenges // *Dynamic Biochem. Process Biotech. Mol. Biol.* 2010. V. 4. P. 1–36.
- George E.F., Hall M.A., De Klerk G.J.** Plant Propagation by Tissue Culture. Heidelberg, 2008. V. 1. 358 p.
- Gonzalez-Arno M.T., Panta A., Roca W.M., Escobar R.H., Engelmann F.** Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops // *Plant Cell Tissue Organ. Culture.* 2008. V. 92. P. 1–13.
- Grout B.W.W.** Meristem-Tip Culture for Propagation and Virus Elimination // *Plant Cell Culture Protocols.* Totowa, 1990. P. 115–125.
- Hamilton M.B.** *Ex situ* conservation of wild plant species: time to reassess the genetic assumptions and implications of seed banks // *Conserv. Biol.* 1994. V. 8. P. 39–49.
- Heywood V.H., Iriondo J.M.** Plant conservation: old problems, new perspectives // *Biol. Conserv.* 2003. V. 113. P. 321–335.
- Husband B.C., Campbell L.G.** Population responses to novel environments: implications for *ex situ* plant conservation // *Ex situ* plant conservation: supporting species survival in the wild. Washington, 2004. P. 231–266.
- Kaczmarczyk A., Funnekotter B., Menon A., Ye Phang P., Al-Hanbali A., Bunn E., Mancera R.L.** Current Issues in Plant Cryopreservation // *Current Frontiers in Cryobiology.* 2012. P. 417–438.
- Kramer F.T., Havens K.** Plant conservation genetics in changing world // *Trends in Plant Science.* 2009. V. 14. P. 599–607.
- Martin K.P., Pachathundkandi S.K., Zhang C.L., Slater A.** RAPD analysis of a variant of Banana (*Musa* sp.) cv. Grande Naine and its propagation via shoot culture // *In Vitro Cell Dev. Biol.* 2006. V. 42. P. 188–192.
- Maxted N., Ford-Lloyd B.V., Hawkes J.G.** Complementary conservation strategies // *Plant genetic conservation: the in situ* approach. London, 1997. P. 15–41.
- Maxted N., Kell S., Ford-Lloyd B., Dulloo M.E., Toledo A.** Toward the systematic conservation of global crop wild relative diversity // *Crop Science.* 2012. V. 52. P. 774–785.
- Obeidy A.A., Smith M.A.L.** Establishing axenic cultures from mature pecan embryo explants on media with low water availability // *Plant Cell Rep.* 1990. V. 9. P. 463–465.
- Panaia M., Senaratna T., Bunn E., Dixon K.W., Sivasithamparam K.** Micropropagation of the critically endangered Western Australian species, *Symonanthus bancroftii* (F. Muell.) L. Haegi (*Solanaceae*) // *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* 2000. V. 63. P. 23–29.
- Paunescu A.** Biotechnology for endangered plant conservation: A critical overview // *Rom. Biotech. Lett.* 2009. V. 14. P. 4095–4103.
- Pence V.C.** *In vitro* collecting (IVC). I. The effect of collecting method and antimicrobial agents on contamination in temperate and tropical collections // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2005. V. 41. P. 324–332.
- Pence V.C., Sandoval J.A.** Controlling contamination during *in vitro* collecting // *In vitro* collecting techniques for germplasm conservation. Rome, 2002. P. 30–40.
- Ramsay M.M., Jacskon A.D., Porley R.D.** A Pilot Study for *ex situ* Conservation of UK Bryophytes // *Proc. of Euro Gard 2000-II European Botanic Garden Congress.* Richmond, 2000. P. 52–57.
- Rani V., Raina S.N.** Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: A critical reappraisal // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2000. V. 36. P. 319–330.
- Reed B.M., Buckley P.M., DeWilde T.N.** Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 1995. V. 31. P. 53–57.
- Reed B.M., Engelmann F., Dulloo E., Engels J.M.M.** Technical Guidelines for the Management of Field and *In Vitro* Germplasm Collections. Rome, 2005. 95 p.
- Reed B.M., Sarasan V., Kane M., Bunn E., Pence V.C.** Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2011. V. 47. P. 1–4.
- Roberts E.H.** Predicting the storage life of seeds // *Seed Sci. and Technol.* 1973. V. 1. P. 499–514.
- Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I.** Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification // *Plant Cell Rep.* 1990. V. 9. P. 30–33.
- Sahijram L., Rajasekharan P.E.** Tissue Culture Strategies Applicable to *in vitro* Conservation of Tropical Fruit Crops // *Tropical Fruits in Asia: Conservation and Use.* Rome, 1996. P. 113–119.
- 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. V. 42. P. 206–214.
- Tassy C., Feuillet C., Barret P.** A method for the medium-term storage of plant tissue samples at room temperature and successive cycles of DNA extraction // *Plant Mol. Biol. Rep.* 2006. V. 24. P. 247–248.
- ten Kate K., Laird S.A.** The commercial use of biodiversity: Access to Genetic Resources and Benefit-Sharing. London: Earthscan, 1999. 398 p.
- Volis S., Blecher M.** Quasi *in situ*: A bridge between *ex situ* and *in situ* conservation of plants // *Biodiv. Conser.* 2010. V. 19. P. 2441–2454.
- Wang Q.C., Valkonen J.P.T.** Cryotherapy of shoot tips: Novel pathogen eradication method // *Trends Plant Sci.* 2009. V. 14. P. 199–122.
- Withers L.A.** Collecting *in vitro* for Genetic Resources Conservation // *Coll. Plant Gen. Diversity.* Wallingford, 1995. P. 511–515.
- Withers L.A.** *In vitro* Collecting-Concept and Background // *In vitro* Collecting Techniques for Germplasm Conservation. Rome, 2002. P. 16–25.
- Withers L.A., Engels J.M.M.** The test tube genebank – a safe alternative to field conservation // *IBPGR Newsl. For Asia and the Pacific.* 1990. V. 3. P. 1–2.
- Wood A., Stedman-Edwards P., Mang J.** The Root Causes of Biodiversity Loss. London, 2000. 304 p.