

УДК 582.675.1:57.085.23

DOI: 10.36305/0513-1634-2020-136-14-23

СОХРАНЕНИЕ РАСТЕНИЙ РЕДКИХ ЭНДЕМИКОВ ФЛОРЫ ГОРНОГО КРЫМА *CREPIS PURPUREA* (WILLD.) M. BIEB.) И *SCROPHULARIA EXILIS* POPL. В УСЛОВИЯХ ГЕНОБАНКА *IN VITRO*

Ирина Вячеславовна Митрофанова, Наталия Николаевна Иванова,
Ольга Владимировна Митрофанова

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН,
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита, ул. Никитский спуск, 52,
E-mail: nnivanova2017@yandex.ru

В статье впервые представлены результаты изучения особенностей сохранения в условиях генобанка *in vitro* в течение 12 месяцев эксплантов 2-х редких эндемичных видов. В исследования были включены микропобеги *Crepis purpurea* (Willd.) M. Bieb. (Asteraceae) и *Scrophularia exilis* Popl. (Scrophulariaceae), культивируемые *in vitro*. В качестве эксплантов для сохранения использовали сегменты микропобегов длиной 0,5-1,0 см. Экспланты помещали на агаризованную питательную среду по прописи ¼ МС, дополненную ингибиторами роста: 0,2 г/л хлорхолинхлорида ССС (BASF, Германия) и 60,0 г/л сахарозы (Panreac, Испания). В качестве контроля использовали среду ¼ МС, дополненную 60,0 г/л сахарозой без ретардантов. Культуральные сосуды помещали в холодильники с интенсивностью освещения 1,25-3,75 мкМ м⁻² с⁻¹ и температурой 4, 6, 8, 10 и 12°C. Растительный материал оценивали через 6 и 12 месяцев культивирования с помощью качественных и количественных характеристик эксплантов. Установлено, что сохранению жизнеспособности и снижению кинетики роста эксплантов *Crepis purpurea* и *Scrophularia exilis* в течение 12 месяцев депонирования в условиях генобанка *in vitro* наряду с низкой интенсивностью освещения и использованием питательной среды с ингибиторами роста способствовало воздействие температуры 4-6°C. У депонируемых эксплантов исследуемых генотипов при переносе в стандартные условия культивирования сохранялся морфогенетический потенциал и способность к регенерации микропобегов и микророзеток.

Ключевые слова: редкие эндемики; эксплант; осмотик; ретардант; депонирование; *in vitro*

Введение

Глобальное изменение климата на планете, активное сокращение ареалов обитания и полное исчезновение многих редких видов растений требует новых подходов к сохранению растительных ресурсов. В связи с этим основной задачей ботанических садов является сохранение биологического разнообразия, в том числе изучение и сохранение генетических ресурсов природной флоры [5, 9, 13]. В последние годы особое внимание уделяется редким эндемичным видам, у которых естественное возобновление в природных условиях затруднено. Одним из наиболее перспективных путей сохранения биоразнообразия растений является создание генобанков *in vitro*. Биотехнологические методы позволяют сохранять ценные редкие виды, а также единичные экземпляры в условиях *in vitro*, что является составной частью концепции сохранения биоразнообразия растительного мира [15, 17, 18]. В России в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений Никитского ботанического сада проводятся многолетние системные исследования особенностей микроразмножения и сохранения в условиях *in vitro* реликтовых эндемиков флоры Горного Крыма [7]. Реликтовые эндемики представляют особый интерес как виды флоры с сокращающейся численностью и довольно низкой степенью возобновления в естественных условиях произрастания. *Crepis purpurea* (Willd.) M. Bieb. (Asteraceae) и *Scrophularia exilis* Popl. (Scrophulariaceae) по своей экологической природе относятся к облигатным петрофитам [8] и занесены в Красные книги РФ (2008) и Республики Крым (2015). Естественные ареалы этих видов располагаются в основном на открытых, хорошо освещенных горных

каменистых склонах, осыпях и в трещинах скал на высоте 400-1400 м над уровнем моря. Популяции облигатного гляреофита *S. exilis* локализованы всего лишь на двух осыпях южного макросклона Главной гряды в верхнем поясе Горного Крыма: Джунын-Кош и Шаган-Кая, а *S. purpurea* из-за своеобразной экологической приуроченности представлен локальными малочисленными популяциями на скалах Внутренней и Внешней гряды в среднем поясе Горного Крыма.

Целью данного исследования было изучение особенностей сохранения при низких положительных температурах в течение 12 месяцев растений *Crepis purpurea* и *Scrophularia exilis* в условиях *in vitro* для дальнейшего создания генобанка ценной генетической плазмы растений при низкой положительной температуре.

Объекты и методы исследования

Исследования выполняли в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений отдела биологии развития растений, биотехнологии и биобезопасности ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН». В работе придерживались как общепринятых, так и разработанных в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений методов [1, 5, 10].

Для депонирования использовали микропобеги *S. exilis* и микророзетки *S. purpurea*, культивируемых *in vitro* в течение 6-10 месяцев. В стерильных условиях вычленили сегменты микропобегов и микророзеток длиной 1,0 см без листьев. Далее экспланты в количестве 3-4 штук помещали в химические стаканы емкостью 100-150 мл на среду ¼ МС [19], дополненную ингибиторами роста: 0,2 г/л хлорхолинхлорида ССС (BASF, Германия) и 60 г/л сахарозы (Panreac, Испания). В состав среды ¼ МС были включены макро- и микроэлементы (Sigma, США), витамины (Sigma, США) и 9,0 г/л агара. Контроль – среда ¼ МС, дополненная 60 г/л сахарозы без ретардантов. Питательные среды автоклавировали при 120°C в течение 5 мин в стерилизаторе LAC 5060S (DAIHAN LABTECH, Южная Корея). Все операции проводили в стерильных условиях бокса биологической безопасности SC2 («ESCO», Сингапур). Культуральные сосуды закрывали фольгой и изолировали парафиновой плёнкой, чтобы не допустить высыхания среды во время депонирования. Сосуды помещали в специальные холодильные камеры марки LIEBHERR FKvsl 4113 (Австрия) с пониженной положительной температурой в интервале 4-12°C, интенсивностью освещения 1,25-3,75 мкМ м⁻² с⁻¹, фотопериодом 16 часов. При закладке эксплантов на депонирование записывали основные показатели: генотип, дата введения на депонирование, размер экспланта (длина), этап развития, температура хранения, питательная среда.

Опыты проводили трижды в десятикратной повторности. Растительный материал оценивали через 6 и 12 месяцев культивирования с помощью качественных и количественных характеристик эксплантов: окраска, состояние листьев и побегов, длина микропобега, количество адвентивных микропобегов, количество листьев на микропобеге, количество корней на микропобег, длина корня и жизнеспособность, изменение окраски питательной среды.

Для тестирования регенерационной способности сохраняемых растительных объектов через 12 месяцев сначала осуществляли предадаптацию растительного материала при 14-18°C путем переноса в климатическую камеру MLR-352-PE (Sanyo, Япония). После предадаптации экспланты культивировали в фитокапсулах.

Статистическая обработка данных проведена согласно общепринятым методам математической статистики при помощи стандартного пакета документов Microsoft Office Excel (2010).

Результаты и обсуждение

Ранее нами было установлено, что реализация морфогенетического потенциала двух видов реликтовых эндемиков в условиях *in vitro* проходила через прямой органогенез и адвентивное побегообразование [7].

Для индукции развития адвентивных почек и микропобегов наиболее эффективным оказалось введение в питательную среду 0,1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК совместно с 0,1 мг/л ГКЗ. После 3-го субкультивирования частота регенерации у всех исследуемых видов достигала 90-100% (рис. 1 А, 2 А). Для дальнейшего размножения использовали микрочеренкование полученных *in vitro* микропобегов и микророзеток на среде МС, дополненной 0,1 мг/л БАП или 0,1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИМК + 0,1 мг/л ГКЗ.

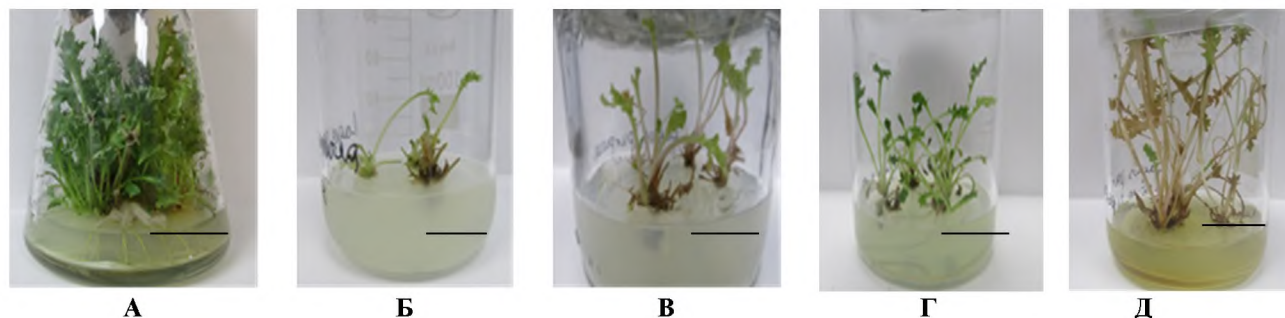


Рис. 1 Розетки *Crepis purpurea* в стандартных условиях культивирования (А), после 6 месяцев депонирования на среде ¼ МС, дополненной 60 г/л сахарозы и 0,2 г/л ССС при различной температуре: 4°C (Б), 6°C (В), 8°C (Г) и 10°C (Д). Масштаб 1 см

При микроразмножении происходило как развития основного побега, так и образование 4-7 адвентивных микропобегов или микророзеток. В процессе культивирования выявлено, что растения вида *Crepis purpurea* отличались повышенным синтезом вторичных метаболитов, что приводило к ингибированию клеточных делений в тканях экспланта, а также снижению жизнеспособности или полной гибели микрорастений. Данный аспект необходимо учитывать при закладке эксплантов на депонирование.

Известно, что длительность хранения образцов в генобанке зависит от вида и сорта растения. Важно определить период, по истечении которого необходимо проводить субкультивирование образцов в каждой конкретной группе растений. Это предотвратит потерю образцов при депонировании в условиях генобанка *in vitro* [10].

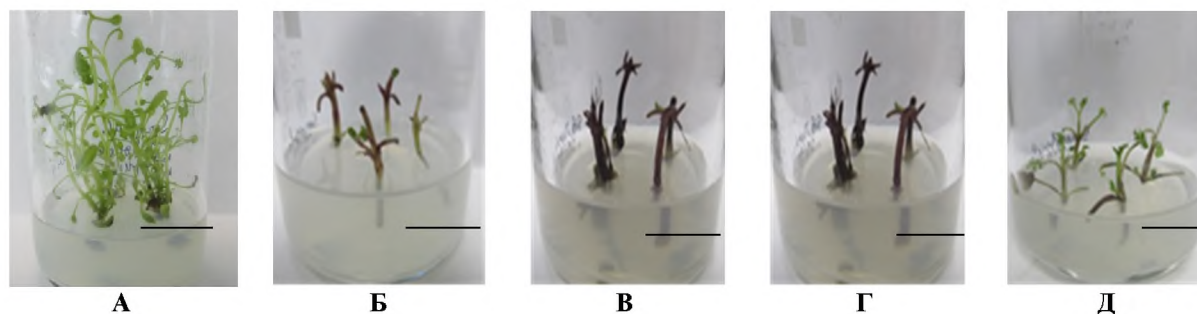


Рис. 2 Экспланты *Scrophularia exilisa* в стандартных условиях культивирования (А) и после 6 месяцев депонирования на среде ¼ МС с 60 г/л сахарозы и 0,2 г/л ССС при различной температуре: 4°C (Б), 6°C (В), 8°C (Г), 10°C (Д). Масштаб 1 см

Так, для долгосрочного сохранения культуры в условиях *in vitro* необходимо поддерживать физиологическую стабильность при изменении кинетики роста в сторону

замедления. Длина микропобега, количество адвентивных микропобегов, количество междоузлий определяют кинетику роста растений. В наших исследованиях было использовано комплексное воздействие на эксплант пониженной температурой, интенсивностью освещения, внесением в питательную среду соединений – ингибиторов роста: осмотиков (сахароза) и ретардантов (ССС). Это было ранее успешно опробовано нами при разработке способов депонирования декоративных и эфиромасличных растений [2, 5, 6].

В процессе исследований при изменении морфометрических параметров эксплантов *Crepis purpurea* после 6 месяцев депонирования установлено, что их жизнеспособность на питательной среде $\frac{1}{4}$ МС, дополненной 0,2 г/л СССР и 60 г/л сахарозы при температуре 4,0°C и 6,0°C достигала 95,0-98,0% (рис. 3). Был отмечен незначительный рост микропобегов, образование 1-4 зеленых листьев на удлинённых черешках, а также дополнительных розеток в количестве 1-3 шт./эксплант (рис. 1 Б, В).

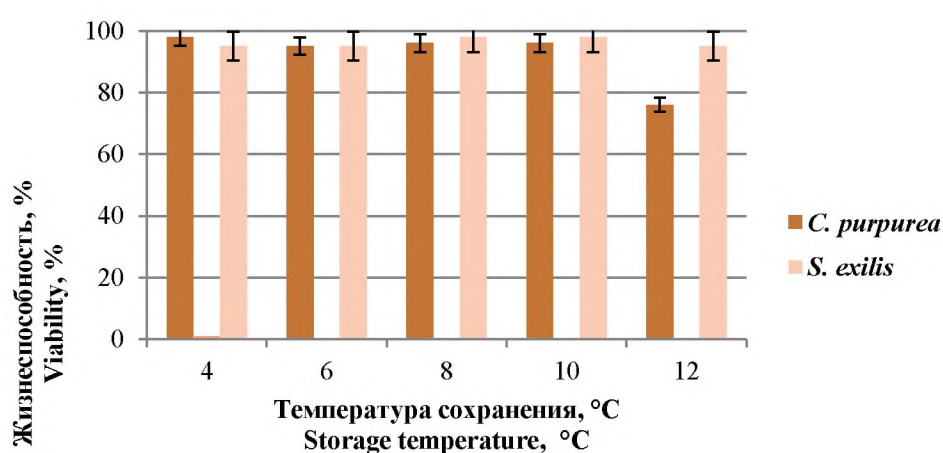


Рис. 3 Влияние температуры на жизнеспособность эксплантов двух видов редких эндемиков после 6 месяцев депонирования в генобанке *in vitro*

В течение 6 месяцев депонирования сохраняемые розетки оставались зелеными, при этом наблюдали единичные коричневые отмершие листья в нижней части розетки, что является характерным для онтогенеза этого растения признаком и отмечено нами при культивировании *C. purpurea* в условиях *in vitro*. Сохранение при 8,0-10,0°C способствовало формированию адвентивных почек и микропобегов в количестве 3-5 шт./эксплант, интенсивному росту листьев на длинных черешках длиной 3,0-5,0 см, образованию 1-2 корней длиной 4,0-5,0 см (рис. 1 Г, Д). Жизнеспособность эксплантов составила 90,0-94,0%. Одновременно отмечали изменение окраски питательной среды продуктами окисления полифенолов, усиливающееся с повышением температуры до 12,0°C. С увеличением периода сохранения это в дальнейшем снижало физиологическую стабильность эксплантов. Депонирование при температуре 12,0°C способствовало в первые месяцы активному росту листьев, образованию дополнительных розеток и корней, а затем к их массовому подсыханию и гибели. Жизнеспособность сохраняли только корни и единичные адвентивные почки.

При температуре 4,0°C и 6,0°C экспланты *S. exilis* оставались жизнеспособными (95,0%) на протяжении 6 месяцев; наблюдали снижение кинетики роста в 3 раза по сравнению с контролем. Окраска микропобегов варьировала от зеленой до антоциановой (рис. 2 Б, В), удлинение побега составило 0,1-0,2 см. Отсутствовали листья, дополнительные побеги и корни. При температуре 8,0°C констатировали сохранение жизнеспособности (рис. 3): снижение роста в 2 раза по сравнению с

контролем, отсутствие дополнительных побегов, листьев и корней (рис. 2 Г). Образование 3-5 листьев, зеленую окраску побега, отсутствие дополнительных побегов и корней отмечали при сохранении при температуре 10,0°C (рис. 2 Д). Депонирование при температуре 12,0°C способствовало интенсивному росту побегов и образованию листьев, однако наряду с этим появились признаки усыхания верхушек побегов. Корни отсутствовали. Жизнеспособность достигала 95,0%.

Таким образом, сохранение физиологической жизнеспособности и заметное снижения кинетики роста эксплантов *S. exilis* в течение 6 месяцев происходило при температуре 4,0-10,0°C.

Проведенный скрининг депонируемых видов в течение 12 месяцев показал, что при низких положительных температурах жизнеспособность эксплантов оставалась высокой и составляла 85,0-95,0% (рис. 4). Наряду с этим наблюдали изменения морфометрических параметров эксплантов по истечении следующих 6 месяцев сохранения.

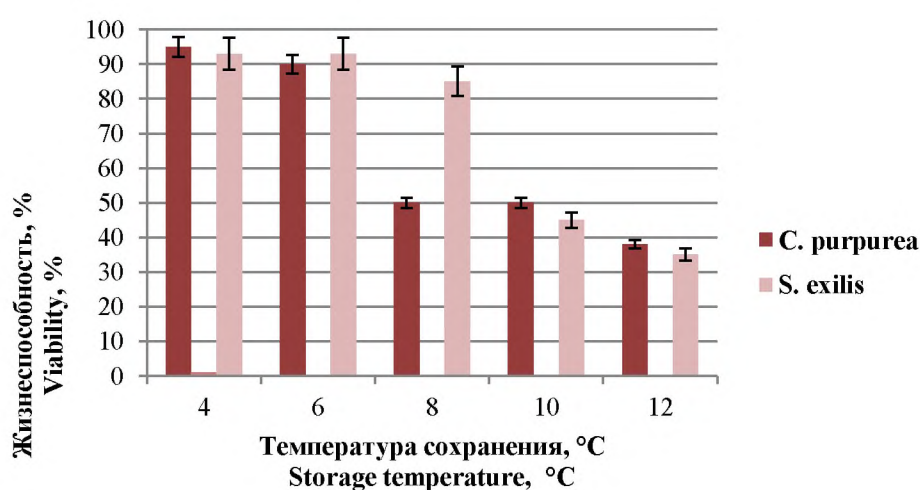


Рис. 4 Влияние температуры на жизнеспособность эксплантов 2-х редких эндемиков после 12 месяцев депонирования в генобанке *in vitro*

После 12 месяцев сохранения в генобанке *in vitro* растений *C. purpurea* при 4 и 6°C наблюдали незначительный рост побега (рис. 5 А, Б, табл. 1), наличие зеленых, гофрированных листьев в количестве 3,2-6,6 шт./побег (табл. 1). Отмечали образование 1-4,5 корней длиной 1,6-4,1 см. Питательная среда на протяжении 12 месяцев депонирования оставалась прозрачной при температуре 4,0°C и слегка окрашивалась при 6,0°C.

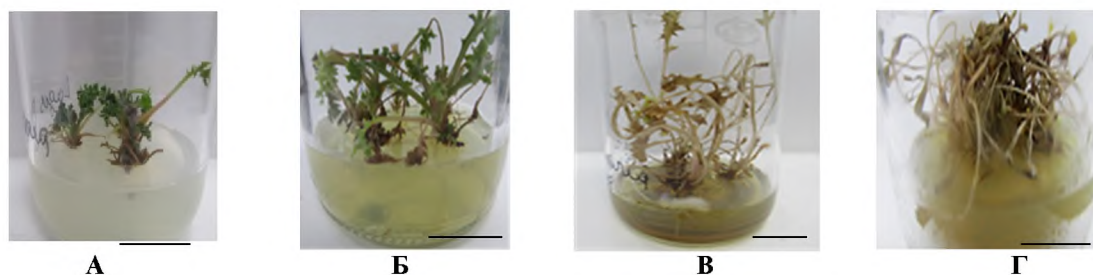


Рис. 5 Розетки листьев *C. purpurea* после 12 месяцев депонирования на среде ¼ МС с 60 г/л сахарозы и 0,2 г/л ССС при различной температуре: 4,0°C (А), 6,0°C (Б), 8,0°C (В) и 10,0°C (Г). Масштаб 1,0 см

С ростом температуры сохранения до 8,0, 10,0 и 12,0°C у растений *C. purpurea* наблюдали снижение жизнеспособности до 45-50% (рис. 5 В, Г). Это сопровождалось изменением окраски листьев (7,6-10,4 шт./побег) с зеленой на желтую, а затем их полный некроз. Жизнеспособными оставались корни (4-5 шт.) длиной 5-7 см (рис. 5 В, Г, табл. 1). В основании побегов отмечали наличие 1-3 зеленых адвентивных почек. Наблюдали интенсивное окрашивание среды продуктами окисления фенолов, что также снижало жизнеспособность растений.

Таблица 1

Морфометрические показатели растений *C. purpurea* и *S. exilis* после 12 месяцев депонирования при различной температуре на среде ¼ МС, дополненной 60,0 г/л сахарозы и 0,2 г/л ССС

Температура, °С	Длина побега, см	Кол-во листьев/побег, шт.	Кол-во дополнительных побегов, шт.	Кол-во корней/побег, шт.	Длина корня, см
<i>Crepis purpurea</i>					
4	0,88 ± 0,037	3,2±0,20	0	1,0	1,6 ±0,1
6	0,90 ± 0,024	6,6 ±0,24	1,0±0,0	4,5 ±0,4	4,1 ±0,4
8	1,0 ± 0,036	7,6 ±0,24	1,8±0,2	5,0 ±0,3	8,3 ±0,6
10	1,2 ±0,032	10,4 ±0,4	1,8±0,2	4,5 ±0,3	8,2 ±0,5
12	1,34 ± 0,024	9,8 ±0,7	2,4±0,24	4,5 ±0,5	8,5 ±0,6
<i>Scrophularia exilis</i>					
4	2,42±0,04	4,6±0,24	0	0	0
6	5,32±0,04	9,8±0,37	1,0±0,0	0	0
8	2,76±0,04	6,4±0,4	1,0±0,0	0	0
10	2,32±0,04	3,8±0,2	1,0±0,0	0	0
12	2,34±0,04	3,6±,24	0	0	0

Жизнеспособность эксплантов *S. exilis* была высокой при сохранении образцов в течение 12 месяцев при температуре 4,0 и 6,0°C и составляла 93.0% (рис. 4). При температуре 4,0°C наблюдали снижение кинетики роста в 2 раза по сравнению с контролем, при 6,0°C – в 1,5 раза. Побеги длиной 2,4-5,3 см имели зелено-антоциановую окраску, количество листьев составило 4,8-9,8 шт./побег (рис. 6 А, Б; табл. 1). Образования корней не отмечено. Регенерацию адвентивных микропобегов наблюдали при температуре 6,0°C. Притательная среда на протяжении 12 месяцев оставалась прозрачной.

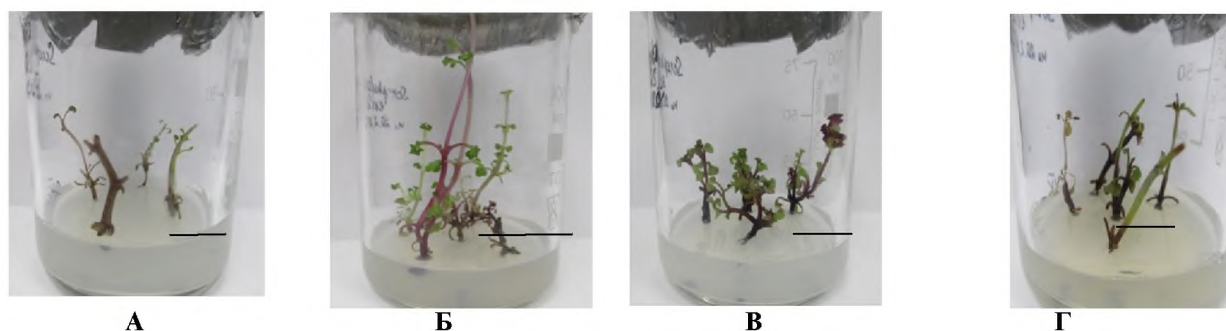


Рис. 6 Экспланты *S. exilis* после 12 месяцев депонирования на среде $\frac{1}{4}$ МС с 60,0 г/л сахарозы и 0,2 г/л CCC при различной температуре: 4,0°C (А), 6,0°C (Б), 8,0°C (В), 10,0°C (Г). Масштаб 1,0 см

При температуре 8,0°C происходило снижение жизнеспособности *S. exilis* после 12 месяцев депонирования до 85,0% (рис. 4). В этих условиях побеги имели антоциановую окраску, листья – зеленую окраску. Вместе с тем отмечали появление единичных дополнительных побегов и отсутствие корней (рис. 6 В). Сохранение эксплантов при 10°C и 12°C резко снижало жизнеспособность эксплантов (45,0%), что проявлялось в отмирании верхушек, а затем и всего побега (рис. 6 Г). Ризогенез не наблюдали. Исследования позволили выявить, что 50,0% эксплантов после 12 месяцев депонирования при температуре 10°C и 12°C были нежизнеспособными.

Представленные результаты согласуются с данными, полученными ранее для декоративных и плодовых культур. Так, в течение 12 месяцев депонирования растения розы эфиромасличной, хризантемы садовой и клематиса сохраняли высокую жизнеспособность, при этом отмечали снижение кинетики роста в 2-3 раза по сравнению с контролем на среде $\frac{1}{4}$ МС, дополненной 0,2 г/л CCC и 60,0 г/л сахарозы при температуре 4,0 и 6,0°C [2, 5, 11, 16]. Повышение температуры способствовало интенсивному росту побегов и снижению жизнеспособности, что выражалось в отмирании верхушек побегов и листьев. При сохранении субтропических плодовых культур для эксплантов инжира и хурмы восточной оптимальная температура была на уровне 8-10°C [7, 11]. Увеличение температуры сохранения до 12,0-14,0°C вызывало интенсивное выделение фенолов с питательную среду, приводило к резкому снижению жизнеспособности и гибели эксплантов.

Для ретестирования регенерационной способности растений по окончании 12 месяцев депонирования сначала осуществляли преадаптацию растительного материала путем переноса растительного материала в климатическую камеру с температурой 14,0-18,0°C. После преадаптации экспланты культивировали в стандартных условиях на специализированных питательных средах. Отмечали регенерацию микропобегов и микророзеток. Полученные растения визуально не имели морфологических отклонений. При этом морфометрические характеристики регенерантов в культуре *in vitro* после депонирования были выше, чем при постоянном культивировании в стандартных условиях *in vitro*.

Таким образом, проведенные исследования показали, что на процесс сохранения двух видов редких эндемиков *C. purpurea* и *S. exilis* может оказывать влияние комплекс таких абиотических факторов как низкая положительная температура, интенсивность освещения и концентрация ингибиторов роста, учитывая морфометрические характеристики депонируемых эксплантов.

Выводы

Таким образом, показана возможность сохранения растений *C. purpurea* и *S. exilis* в течение 12 месяцев в условиях генобанка *in vitro*. Эксперименты выявили способность растений сохранять морфогенетический потенциал при невысокой интенсивности ростовых процессов в течение года при комплексном использовании воздействия на депонирование эксплантов ряда абиотических факторов: пониженная положительная температура, низкая интенсивность освещения и наличие в питательной среде осмотиков и ретардантов.

Экспланты образовывали листья, корни, адвентивные и пазушные побеги при температуре 4,0 и 6,0°C на питательной среде ¼ МС, дополненной 60,0 г/л сахарозы и 0,2 г/л ССС. При этом наблюдали снижение кинетики роста в 1,5-2 раза по сравнению с контролем. При переносе в стандартные условия культивирования отмечали регенерацию микропобегов и микророзеток, что подтверждает сохранение морфогенетического потенциала.

Повышение температуры сохранения до 8-12°C оказывало негативное влияние на жизнеспособность изучаемых видов растений. В течение первых 6 месяцев отмечен интенсивный рост побегов и листьев. Однако затем наблюдали резкое снижение жизнеспособности при температуре 12°C до 38% у *C. purpurea* и 35% - у *S. exilis*, что сопровождалось некротическими процессами у листьев и верхушек микропобегов. Это оказывает негативное воздействие на продолжительность сохранения растительных целевых объектов в условиях генобанка *in vitro*.

Благодарность

Благодарим старшего научного сотрудника ФГБУН «НБС-ННЦ», к.б.н. Никифорова А.Р. за предоставленные семена редких эндемиков.

Работа выполнена в рамках Госзадания № 0829-2019-0038 ФГБУН «НБС-ННЦ» на уникальной научной установке «ФИТОБИОГЕН».

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособ. – М.: ФГК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Иванова Н.Н., Митрофанова И.В., Жданова И.В. Особенности длительного сохранения *in vitro* розы эфиромасличной в виде медленно растущей коллекции // Актуальные проблемы химии, биотехнологии и сферы услуг.: материалы III Всерос. науч. -практич. конф. с междунар. участием (Иркутск, 24–26 апреля 2019 г.). – Иркутск: Изд-во ИРНИТУ, 2019. – С. 62-66.
3. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / Министерство природных ресурсов и экологии РФ; Федеральная служба по надзору в сфере природопользования; РАН; Российское ботаническое общество; МГУ им. М.В. Ломоносова; Гл. редколл.: Ю.П. Трутнев и др.; Сост. Р.В. Камелин и др. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 885 с.
4. Красная книга Республики Крым. Растения, водоросли и грибы / Отв. ред. А.В. Ена и А.В. Фатерыга. – Симферополь: ООО «ИТ «АРИАЛ», 2015. – 480 с.
5. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – К: Аграрна наука, 2011. – 344 с.
6. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Иванова Н.Н., Браилко В.А., Лесникова-Седошенко Н.П. Моделирование контролируемых условий, необходимых для адаптации и длительного хранения растительного материала декоративных, ароматических и плодовых

культур в генобанке *in vitro*: методические рекомендации / Под общей редакцией И.В. Митрофановой. – Симферополь: ИТ "АРИАЛ", 2018. – 72 с.

7. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Иванова Н.Н., Жданова И.В., Челомбит С.В., Кузьмина Т.Н., Никифоров А.Р., Руденко М.В. Биотехнологические приемы размножения некоторых представителей редких и эндемичных видов флоры Крыма: Методические рекомендации / Под общей редакцией И.В. Митрофановой. – Симферополь: ИТ "АРИАЛ", 2019а. – 49 с.

8. Никифоров А.Р. Биологические и морфологические особенности некоторых облигатных гляреофитов Горного Крыма // Ботан. Журн. – 2018. – Т. 103. – № 8. – С. 968-980.

9. Никифоров А.Р., Никифорова А.А. Ритмологические различия в развитии растений *Lagoseris callicephala* и *Lagoseris purpurea* (Asteraceae) // Бюлл. ГНБС. – 2016. – Вып. 118. – С. 58-63.

10. Новикова Т. И. Использование биотехнологических подходов для сохранения биоразнообразия растений // Растительный мир Азиатской России. – 2013. – № 2 (12). – С. 119–128.

11. Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур: Коллективная монография / Под ред. д.б.н. И.В. Митрофановой. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2018. – 260 с.

12. Митрофанова И.В., Иванова Н.Н., Кузьмина Т.Н., Хохлов С.Ю. Клональное микроразмножение и сохранение в условиях *in vitro* двух сортов хурмы восточной (*Diospyros kaki* thunb.) // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2019 б. – Т. 9. – Вып. 4 – С. 712–721. DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-712-721>

13. Митрофанова И.В., Иванова Н.Н., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П. Особенности депонирования хризантемы садовой в условиях *in vitro* // Бюлл. ГНБС. – 2019. – Вып. 131. – С. 110-117. DOI: <https://doi.org/10.25684/NBG.boolt.131.2019.15>

14. Belokurova V.B. Methods of biotechnology in system of efforts aimed at plant biodiversity preservation (Review) // Cytology and Genetics. – 2010. – Vol. 44. – N 3. – P. 174-185. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0095452710030096>

15. Cruz-Cruz C.A., González-Arناo M.T., Engelmann F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity // Resources. – 2013. – Vol. 2. – P. 73–95. DOI: 10.3390/resources2020073

16. Engelmann F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity // Resources. – 2013. – Vol. 2. – P. 73-95. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390/resources2020073>

17. Mitrofanova I.V., Brailko V.A., Ivanova N.N., Mitrofanova O.V. Some special features of the conservation of valuable, essential oil rose cultivars: *in vitro* deposition and cryopreservation // Acta Horticulturae. – 2019. – Vol. 1234. – P 195-201. DOI: 10.17660/ActaHortic. 2019.1234.26

18. Molkanova O., Egorova D., Mitrofanova I. Preservation Characteristics of Valuable Plant Species in *In Vitro* Genebanks at Russian Botanical Gardens // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. – 2018 a. – Vol. 58. – Suppl. 1. – P. 46 DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9929-7>

19. Molkanova O., Shirnina I., Mitrofanova I. Conservation and micropropagation of rare and endemic species in genpool collection of the Russian Federation // *Journal of Biotechnology*. – 2018 б. – Vol. 280S. – P. 83-84 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotech.2018.06.274>

20. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. – 1962. – Vol. 15. – N 3. – P. 473-497. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Статья поступила в редакцию 29.03.2020 г.

Mitrofanova I.V., Ivanova N.N., Mitrofanova O.V. Rare endemic plants of the mountainous Crimea *Crepis purpurea* (Willd.) M. Bieb.) and *Scrophularia exilis* Popl. preservation under *in vitro* genebank conditions // Bull. Of the State Nikita Botan. Gard. – 2020. – № 136. – P. 14-23

The article presents for the first time the results of a study of the preservation features of explants of 2 rare endemic species under the conditions of the *in vitro* genebank for 12 months. Microshoots of *Crepis purpurea* (Willd.) M. Bieb (Asteraceae) and *Scrophularia exilis* Popl. (Scrophulariaceae), cultured *in vitro* were included in the research. Microshoots' segments 0.5-1 cm long were used as explants for preservation. The explants were placed on an agarized culture medium with a recipe of ¼ MS supplemented with growth inhibitors: 0,2 g/l CCC chlorocholinchloride (BASF, Germany) and 60 g / l sucrose (Panreac, Spain). As a control, a medium of ¼ MS was used, supplemented with 60 g / l sucrose without retardants. Culture vessels were placed in refrigerators with a light intensity of 1.25-3.75 mcM m⁻² s⁻¹ and a temperature of 4, 6, 8, 10 and 12,0°C. Plant material was evaluated after 6 and 12 months of cultivation using qualitative and quantitative characteristics of explants. It was found that the preservation of viability and reduction of growth kinetics of *Crepis purpurea* and *Scrophularia exilis* explants during 12 months of deposition in the *in vitro* genebank, along with low illumination intensity and the use of a nutrient medium with growth inhibitors, was facilitated by exposure to a temperature of 4,0-6,0°C. Conserved explants of the studied genotypes after transferring to standard culture conditions the morphogenetic potential and the ability to regenerate microshoots and microrosettes were remained.

Key words: *rare endemics; explant; osmotic; retardant; deposition; in vitro.*