

УДК 573.6:58.08.523

**КОЛЛЕКЦИЯ РЕДКИХ РАСТЕНИЙ *IN VITRO*:
ФОРМИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ****Елена Викторовна Малаева^{1,2}, Анастасия Ивановна Фетисова¹**¹ГБУ ВО «Волгоградский региональный ботанический сад»,
400007, Россия, Волгоград, пос. Metallургов, 68²ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный социально-педагогический
университет»,

400005, Россия, Волгоград, пр-т Ленина, 27

E-mail: e.malaeva@mail.ru, nastyusha.rusina@mail.ru

В статье представлена информация по совершенствованию технологии клонального микроразмножения редких и ценных видов растений. Коллекция редких растений, занесенных в Красную книгу РФ и Красную книгу Волгоградской области – 50 видов, относящихся к 19 семействам и разным эколого-фитоценотическим группам. Подобран оптимальный режим стерилизации для большинства редких видов растений - 5%-й Лизоформин® 3000, с экспозицией 5 и 7 минут. При использовании данного режима процент жизнеспособных семян *Tulipa* L. и *Fritillaria* L. был максимальным и составил 90% и 70% соответственно. На этапе микроразмножения для большинства редких видов растений наиболее эффективной является модифицированная питательная среда Мурасиге-Скуга, содержащая 6-БАП в концентрации 0,1-0,5 мг/л в сочетании с ИУК 0,01-0,1 мг/л. У 90-100% растений отмечено отсутствие морфологических аномалий и образование 4-12 адвентивных микропобегов на эксплант.

Ключевые слова: клональное микроразмножение; коэффициент размножения; пролиферация; регуляторы роста; редкие растения

Введение

Интерес к использованию методов культуры изолированных тканей для сохранения генофонда растений возрастает во всем мире. Следует отметить, что биотехнологические исследования для решения проблем сохранения биоразнообразия имеют свои критерии и принципы отбора объектов, что подчеркивают в своих работах ряд авторов [9, 10, 12].

При подборе объектов исследования для создания коллекции *in vitro* редких видов растений следует руководствоваться следующими критериями:

1. принадлежность видов к одной из категорий редкости (на этапе отработки технологий размножения в качестве растительного материала мы использовали виды со статусом 2 и 3);

2. введение в культуру видов с категорией статуса редкости 1 и 2;

3. практическая ценность видов (декоративные, лекарственные и др.);

4. виды, трудно-размножаемые традиционными способами.

Работа по формированию и изучению коллекции *in vitro* в ГБУ ВО «Волгоградский региональный ботанический сад» (далее ВРБС) ведется с 2005 г. В настоящее время она насчитывает более 380 таксонов, в том числе редких видов, занесенных в Красную книгу РФ и Красную книгу Волгоградской области – 50 видов, относящихся к 19 семействам и разным эколого-фитоценотическим группам. Максимально представлены в коллекции семейства: *Fabaceae* Lindl. – 18%, *Iridaceae* Juss. – 14%, *Asteraceae* Dumort. – 10%, *Brassicaceae* Burnett – 8%, *Caryophyllaceae* Juss. – 8%, *Dioscoreaceae* R.Br. – 4%. Остальные семейства в коллекции составляют менее 2% и насчитывают только по одному представителю из семейства. Данная коллекция в культуре *in vitro* является самой динамичной. Это связано со сложностью введения

редких видов в культуру и с неустойчивостью многих из них, поэтому состав коллекции постоянно меняется.

Цель исследования – оптимизация основных этапов микроразмножения редких видов растений для получения максимального количества клонов.

Объекты и методы исследования

Изучение особенностей культивирования редких видов *in vitro* проводили на базе лаборатории биотехнологии ВРБС в 2021-2023 гг. Методика исследований базировалась на общепринятых биотехнологических методах [1, 4] и приемах, усовершенствованных в условиях лаборатории биотехнологии ВРБС [12].

Все манипуляции с культурами тканей проводили в стерильных условиях горизонтального ламинарного бокса S2010 (Holten LaminAir, Франция).

Материал для введения в культуру, собирали в экспедиционных выездах в местах естественного произрастания видов, а также на интродукционном участке природной флоры ВРБС. В качестве эксплантов использовали семена, изолированные зародыши, апикальные, латеральные меристемы, сегменты стерильных проростков, полученных из семян и сегменты луковиц (табл. 1).

Таблица 1

Типы культивируемых эксплантов редких видов растений

Объекты исследования	Типы эксплантов
<i>Lepidium meyeri</i> Claus, <i>Matthiola fragrans</i> Bunge, <i>Silene cretacea</i> Fisch. ex Spreng., <i>Silene hellmanii</i> Claus, <i>Anthemis trotzkiana</i> Claus, <i>Jurinea cretacea</i> Bunge, <i>Senecio paucifolius</i> S.G. Gmel, <i>Senecio schwetzwii</i> Korsh., <i>Centaurea taliewii</i> Kleop., <i>Centaurea gerberi</i> Stev., <i>Crambe tataria</i> Sebeok, <i>Hedysarum alpinum</i> L., <i>Calophaca wolgarica</i> (L. fil.) DC., <i>Eriosynaphe longifolia</i> (Fisch. ex Spreng.) DC., <i>Saussurea salsa</i> (Pall. ex Bieb.) Spreng., <i>Hyssopus cretaceus</i> Dubjan., <i>Stipa cretacea</i> P. Smirn., <i>Zingiberia biebersteiniana</i> (Claus) P. Smirn., <i>Pulsatilla pratensis</i> (L.) Mill., <i>Pulsatilla patens</i> (L.) Mill	Семена
<i>Hedysarum cretaceum</i> Fisch., <i>Genista tanaitica</i> P. Smirn., <i>Hedysarum grandiflorum</i> Pall., <i>Hedysarum razoumovianum</i> Fisch. et Helm ex DC., <i>Astragalus dasyanthus</i> Pall. <i>Genista sibirica</i> L., <i>Genista tanaitica</i> P. Smirn.	Апикальные меристемы, семена
<i>Bulbocodium versicolor</i> (Ker-Gawl.) Spreng., <i>Bellevalia speciosa</i> Woronow ex Grossh., <i>Tulipa gesneriana</i> L. (<i>T. schrenkii</i> Regel), <i>Allium regelianum</i> A.Beck., <i>Allium gunibicum</i> Misch. ex Grossh., <i>Eremurus spectabilis</i> Bieb., <i>Fritillaria ruthenica</i> Wikstr.	Семена, сегменты луковиц, почки возобновления с кусочком донца луковицы
<i>Artemisia salsoloides</i> , <i>Artemisia hololeuca</i> Bieb. ex Bess., <i>Vincetoxicum intermedium</i> Taliev, <i>Clematis integrifolia</i> L., <i>Clematis orientalis</i> L.	Апикальные и латеральные меристемы, пазушные почки
<i>Iris tenuifolia</i> Pall., <i>Iris scariosa</i> Willd. ex Link, <i>Iris pumila</i> L., <i>Iris aphylla</i> L., <i>Gladiolus tenuis</i> Bieb.	Семена, изолированные зародыши
<i>Sedum subulatum</i> (C. A. Mey.) Boiss., <i>Sempervivum ruthenicum</i> Schnittsp. et C. B. Lehm.	Розетки, сегменты чешуй, листьев, части околоцветника

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

В качестве стерилизующих агентов использовали раствор «Лизоформина® 3000» (Lysoformin® 3000) (5% – 5 мин; 5%-й – 7 мин; 7% – 3 мин; 7% – 5 мин) и

коммерческий гипохлорит натрия «Белизна» (10% – 10 мин; 5% – 20 мин). При анализе эффективности приемов стерилизации учитывали количество стерильных и нежизнеспособных эксплантов.

На этапе микроразмножения использовали модифицированные питательные среды Мурасиге-Скуга (МС) [20], Кнудсона (Кн) [19], Гамборга (В5) [18] с добавлением 6-бензиламинопурина (6-БАП) – 0,1-15 мг/л, кинетина (Кин) – 0,5-5,0 мг/л, зеатина (Зеа) – 0,1-1,0 мг/л, индолилуксусной кислоты (ИУК), индолил-3-масляной кислоты (ИМК) и 1-нафталинуксусной кислоты (НУК) в концентрации от 0,01-7,0 мг/л.

В экспериментах использовали следующие модификации питательных сред:

- 1 - МС 6-БАП 0,5 мг/л;
- 2 - МС 6-БАП 5,0 мг/л;
- 3 - МС 6-БАП 0,1 мг/л + ИУК 0,01 мг/л;
- 4 - МС 6-БАП 0,5 мг/л + ИУК 0,01 мг/л;
- 5 - МС 6-БАП 1,0 мг/л + ИУК 0,1 мг/л;
- 6 - МС 6-БАП 0,1 мг/л + НУК 0,01 мг/л;
- 7 - МС 6-БАП 1,0 мг/л + НУК 0,1 мг/л.

Для культивирования растений класса Однодольные использовали следующие варианты сред:

- 1 - МС без добавления регуляторов роста;
- 2 - В5 без регуляторов роста;
- 3 - Кн без регуляторов роста (агар 10%);
- 4 - МС 6-БАП 0,1 мг/л + 0,1 мг/л ИУК;
- 5 - МС 6-БАП 0,5 мг/л;
- 6 - МС 6-БАП 0,1 мг/л + ИУК 0,01 мг/л;

В процессе исследований измеряли и рассчитывали: коэффициент размножения (Кр); количество отмерших листьев, шт; длину наиболее развитого листа, мм; линейный рост микропобега, см; количество аномальных (витрифицированных) растений, %; длину корней, мм. Период субкультивирования эксплантов в среднем составлял 30 суток, для однодольных растений до 70 дней.

Все опыты проводились в трехкратной повторности по 20 эксплантов в каждом варианте. При оценке оптимального режима стерилизации учитывали количество инфицированных и проросших семян, выраженных в процентах. Результаты экспериментальных данных обрабатывались статистически с помощью пакета прикладных программ Microsoft Office 2007 (Excel) при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В качестве первичных эксплантов для видов семейства *Fabaceae* (*Genista tanaitica* и *Calophaca wolgarica*) использовали сегменты стерильных проростков, выращенные из семян и апикальные меристемы для рода *Hedysarum* L. (*Hedysarum grandiflorum*, *H. cretaceum*, *H. razoumovianum*). *Iris pumila* вводили в культуру *in vitro* методом эмбриокультуры, виды рода *Tulipa* L. и *Fritillaria* L. – преимущественно семенами.

На этапе введения в культуру *in vitro* определяющим фактором является подбор оптимального режима стерилизации [6, 13, 16]. В своих исследованиях мы использовали коммерческий гипохлорит натрия «Белизна» и раствор «Лизоформин® 3000» в различной концентрации и времени экспозиции. Оптимальным режимом для большинства редких видов растения является 5%-й «Лизоформин® 3000» с экспозицией 5 и 7 минут. Для растений класса Однодольные оптимальным стерилизатором является 7%-й «Лизоформин® 3000», с экспозицией 3 минуты. При использовании данного

режима процент жизнеспособных семян *Tulipa L.* и *Fritillaria L.* был максимальным и составил 90% и 70% соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Средние показатели выхода жизнеспособных эксплантов *Tulipa L.* и *Fritillaria L.* в зависимости от режима стерилизации

№ п/п	Вид	Выход жизнеспособных эксплантов (семян), %					
		10 % «Белизна» (10 мин)	5% «Белизна» (20 мин)	5% «Лизоформ ин [®] 3000», (5 мин)	5% «Лизоформ ин [®] 3000» (7 мин)	7% «Лизоформ ин [®] 3000» (3 мин)	7% «Лизоформ ин [®] 3000» (5 мин)
1.	<i>Tulipa gesneriana</i> L. (T. schrenkii Regel.)	35	40	70	60	90	40
2.	<i>Tulipa biebersteini</i> ana Schult. & Schult.	40	60	50	55	80	55
3.	<i>Tulipa suaveolens</i> Roth.	35	35	50	65	75	70
4.	<i>Fritillaria ruthenica</i> Wikstr.	40	40	50	60	70	60
5.	<i>Fritillaria meleagris</i> L.	30	40	50	50	55	70

Размножение редких видов растений *in vitro* с использованием в качестве эксплантов семян, обладающих различными типами покоя, без предварительной их обработки, практически невозможно. Работы ряда авторов посвящены разработке приемов преодоления покоя семян у однодольных растений. Так, О.И. Молканова с соавторами (2020) для преодоления покоя семян видов рода *Fritillaria* использует 2-этапную стратификацию: 5-7 недель при t 20-22⁰С, 2-9-12 недель при t 3-5⁰С при дальнейшем культивировании на без гормональной питательной среде или питательных средах с добавлением 1 мг/л 6-БАП и 1 мг/л ГК [10].

В настоящее время во многих исследованиях используют эмбриокультуру для сокращения сроков стратификации семян и выявления общих закономерностей и специфических особенностей культивирования *in vitro* видов рода *Iris L.*, *Gladiolus L.*, *Paeonia L.*, и *Fritillaria L.* [2, 8, 14, 15, 17]. Следует отметить, что для дальнейшего развития эксплантов достаточно сложно подобрать оптимальную питательную среду, которая обеспечит их динамичный рост.

В своих исследованиях мы использовали различные прописи питательных сред и сочетания регуляторов роста с целью подбора питательных сред для длительного культивирования растений *in vitro* с сохранением нормальных морфофизиологических характеристик. На предварительном этапе при помощи эмбриокультуры были получены проростки *I. pumila*, которые затем пересаживали на экспериментальные среды.

На питательных средах, не содержащих фитогормонов, отмечался равномерный рост растений. На среде МС через месяц культивирования наблюдали большое количество витрифицированных (обводненных) побегов и отмерших листьев (рис. 1).

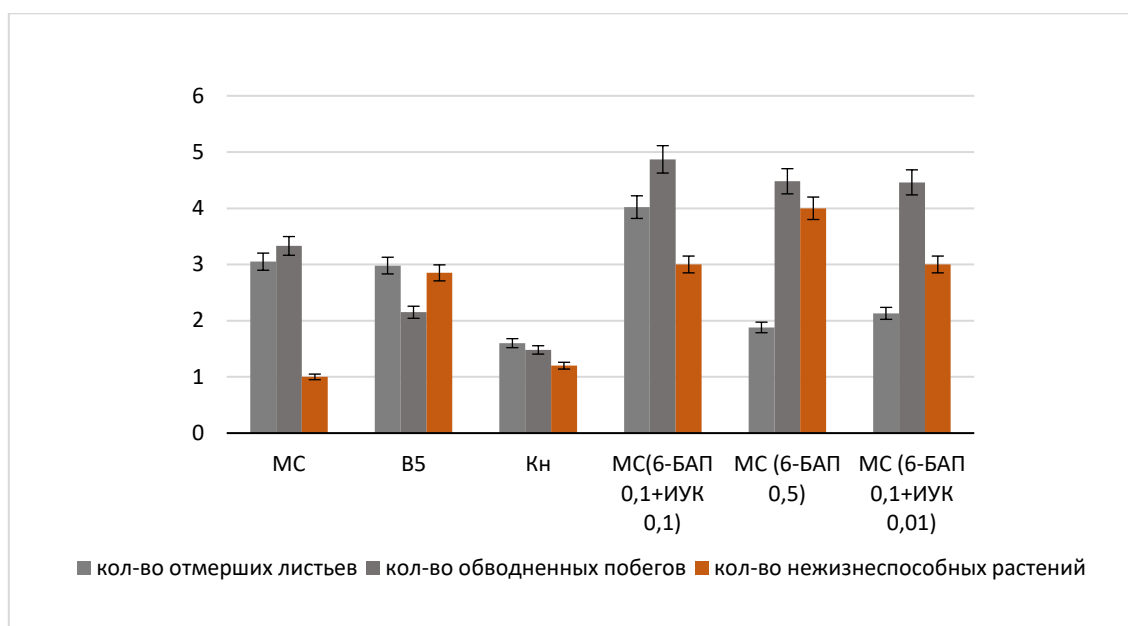


Рис. 1 Нарушение роста и развития у проростков *Iris pumila* L. на экспериментальных питательных средах

На питательной среде Kn наблюдался замедленный, но равномерный рост, при этом через 1 месяц культивирования растения были без морфологических отклонений и с незначительным количеством отмерших листьев (рис. 1).

Таблица 3

Динамика развития растений-регенерантов *Iris pumila* L. на экспериментальных питательных средах

Длительность культивирования (дней)	Питательная среда							
	МС б/г (контроль)		МС 6-БАП 1,5 мг/л		МС 6-БАП 10 мг/л + ИУК 2 мг/л		МС 6-БАП 15 мг/л + ИУК 7,0 мг/л	
	I	II	I	II	I	II	I	II
10	20,5±1,2	27,6±1,0	32,4±0,9	0	25,1±1,1	0	32,2±1,6	12,7±1,1
25	41,2±2,1	28,5±0,7	47,7±0,8	26,3±1,1	39,2±2,1	0	48,4±1,1	14,9±1,7
40	58,3±0,2	53,2±1,0	52,9±1,2	26,8±0,3	56,4±1,4	0	61,1±1,4	16,2±2,2
55	70,4±1,1	62,4±1,6	68,5±0,6	27,2±0,8	64,3±0,7	0	74,3±1,7	17,8±1,0
70	89,5±0,8	68,5±0,5	77,1±1,0	27,2±0,8	75,3±2,4	0	85,5±2,2	19,3±1,3
	Коэффициент размножения (на 70 день культивирования)							
	1,0±0,01		2,5±0,6		6,4±1,3		15,6±1,9	

Примечание: I – длина наиболее развитого листа (мм) II – длина корней (мм)

Таким образом, питательная среда Kn, не содержащая фитогормонов является оптимальной для длительного культивирования *I. pumila in vitro*.

Согласно данным, полученным Л.И. Тихомировой (2009), Е.Н. Ветчинкиной (2010), А.Ю. Набиевой, Т.В. Елисафенко (2012) высокие коэффициенты размножения для видов рода *Iris* L. получены на питательных средах с высоким содержанием цитокининов 6-БАП 1,5-15 мг/л в сочетании с ауксинами ИУК 2,0-7,0 мг/л [2, 11, 15].

С целью изучения особенностей морфогенеза проростков *I. pumila* на питательных средах с высоким содержанием цитокининов и ауксинов изучали их динамику развития с 10 по 70 день культивирования (табл. 3)

Следует отметить, что на экспериментальных питательных средах зафиксирована высокая регенерационная активность в сравнении с контрольной средой, но и процент аномальных побегов был выше 50%. Так, на питательной среде МС, содержащей 6-БАП 15 мг/л и ИУК 7,0 мг/л и МС 6-БАП 10 мг/л и ИУК 2,0 мг/л коэффициент размножения на 70 день культивирования составил $15,6 \pm 1,9$ и $6,4 \pm 1,3$ соответственно (табл. 3). На контрольной питательной среде МС без гормонов все растения-регенеранты *I. pumila* формировали только один побег.

Согласно полученным данным, максимальная длина наиболее развитого листа *I. pumila* отмечена на контрольной питательной среде МС без регуляторов роста - $89,5 \pm 0,8$ мм. На экспериментальных средах данный показатель достигал значения $85,5 \pm 2,2$. Максимальная длина корней через 70 дней культивирования на питательной среде МС 6-БАП 1,5 мг/л составила $27,2 \pm 0,8$ мм, что в 2,5 раза меньше показателей полученных на контрольной безгормональной питательной среде - $68,5 \pm 0,5$ мм.

Невысокие показатели длины корней на экспериментальных питательных средах сочетались с хорошим развитием корневой системы. Растения-регенеранты *I. pumila* формировали корни II и III порядка, что не зафиксировано на контрольной питательной среде.

Таким образом, высокие содержания цитокининов обеспечивают высокую регенерационную активность, но в тоже время значительно стимулируют образование аномальных побегов, что является негативным фактором в работе с редкими видами растений. Многие авторы в своих исследованиях отмечают, что одним из основным показателем эффективности размножения редких видов *in vitro* является поддержание генетической стабильности размножаемых образцов [7, 9, 10, 12].

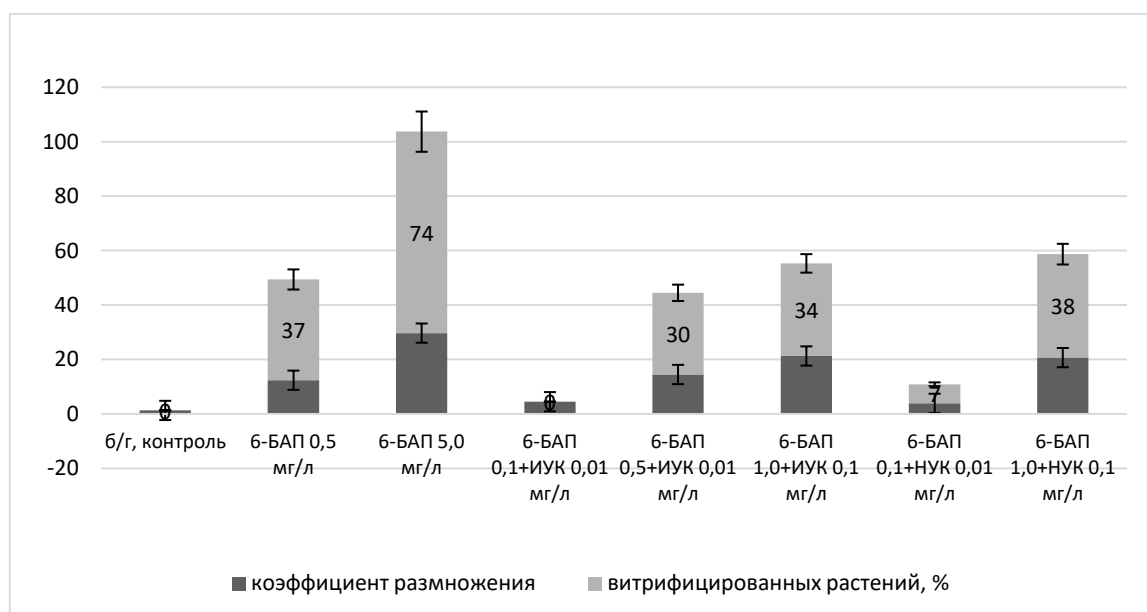


Рис. 2 Соотношение коэффициента размножения и витрифицированных растений *Tulipa gesneriana* L. на экспериментальных питательных средах

С целью оптимизации гормонального состава питательных сред на этапе микроразмножения, мы провели анализ их эффективности по сочетанию коэффициента размножения и витрифицированных растений для *Tulipa gesneriana* и *Fritillaria ruthenica* (рис. 2, 3).

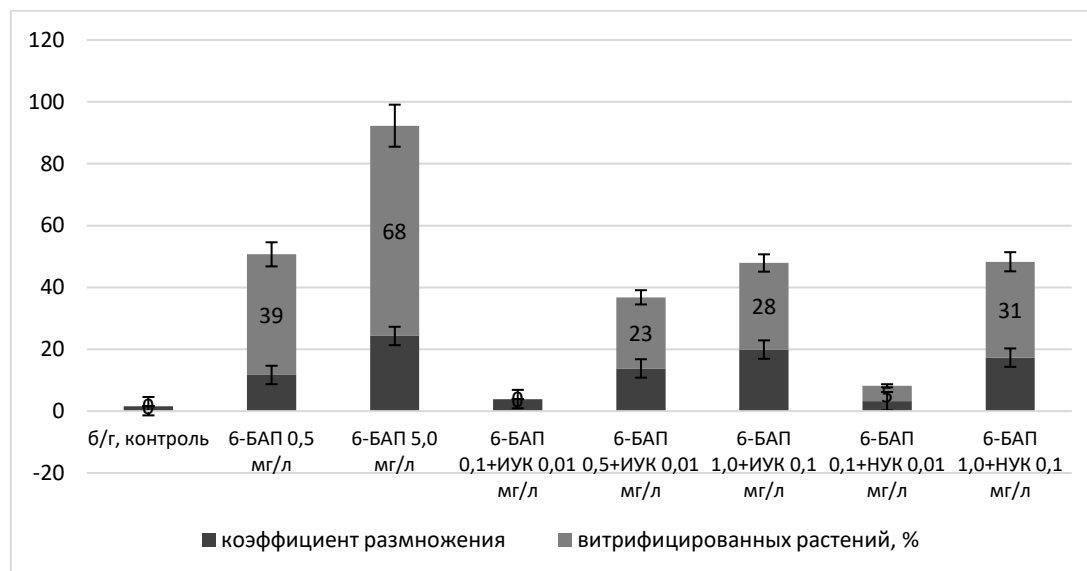


Рис. 3 Соотношение коэффициента размножения и витрифицированных растений *Fritillaria ruthenica* Wikstr. на экспериментальных питательных средах

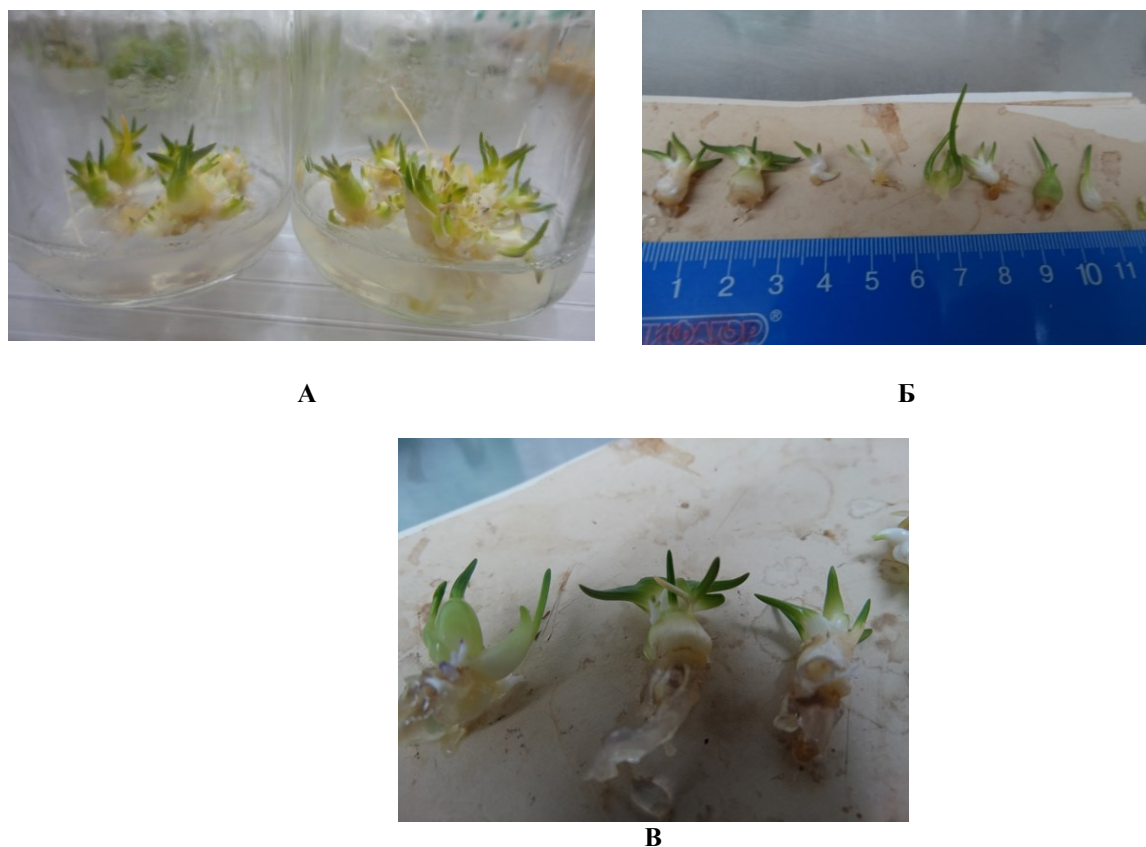
Максимальные показатели коэффициента размножения для *T. gesneriana* и *F. ruthenica* отмечены на питательной среде МС, содержащей 6-БАП в концентрации 5,0 мг/л – $29,7 \pm 0,7$ и $24,3 \pm 0,9$ и 6-БАП 1,0 мг/л и ИУК 0,1 мг/л – $21,3 \pm 1,1$ и $19,9 \pm 0,7$, которые сочетались высоким показателем витрифицированных растений – 74% и 68% и 34% и 28% соответственно. Оптимальным содержанием фитогормонов на этапе микроразмножения для *T. gesneriana* и *F. ruthenica* является 6-БАП 0,1 мг/л и ИУК 0,01 мг/л. Коэффициент размножения для *T. gesneriana* на данной питательной среде составил $4,5 \pm 0,5$, а *F. ruthenica* – $3,9 \pm 1,1$ в сочетании с нулевым показателем витрифицированных растений (рис. 4).

Подбор оптимальной концентрации и типа цитокинина на этапе микроразмножения для *C. wolgarica* и *G. tanaitica* выявил эффективность всех изученных цитокининов. Максимальные показатели коэффициента размножения $7,5 \pm 1,1$ и $5,3 \pm 0,5$ для *C. wolgarica* и *G. tanaitica* зафиксированы на питательной среде, содержащей 6-БАП в концентрации 5,0 мг/л. При этом при данной концентрации отмечено максимальное количество аномальных побегов – более 60% (табл. 4).

Следует отметить, что использование цитокининов в концентрации выше 1,0 мг/л приводило к образованию аномальных растений. Так, при использовании 6-БАП в концентрации 1,0 мг/л процент витрифицированных растений для *C. wolgarica* составил 41%, 2,0 мг/л – 62% и 5,0 мг/л достигал 65%. Для *G. tanaitica* получены сходные результаты и процент витрифицированных растений при тех же концентрациях составил: 38, 56 и 70% соответственно.

На питательной среде, содержащей Кин в концентрации 1,0 мг/л, наблюдали лучшие показатели линейного роста в сравнении с другими цитокининами. Так, для *G. tanaitica* и *C. wolgarica* показатели линейного роста на данной среде составили $5,9 \pm 0,7$

см и $3,9 \pm 1,2$ см, тогда как на питательной среде, содержащей 6-БАП данный показатель достигал $3,8 \pm 0,6$ и $3,1 \pm 0,3$ см.



А

Б

В

Рис. 4 Образование дочерних микролуковиц *Fritillaria ruthenica* Wikstr. на питательной среде МС с добавлением 6-БАП 0,1 мг/л и ИУК 0,01 мг/л на 40 день культивирования (А – образование микролуковиц, Б, В – деление микролуковиц)

Таблица 4

Влияние различных цитокининов на коэффициент размножения *Calophaca wolgarica* (L. fil.) и *Genista tanaïtica* P. Smirn.

Цитокинин	Концентрация, мг/л	Линейный рост, см		Коэффициент размножения		Витрифицированные побеги, %	
		<i>Genista tanaïtica</i> P. Smirn.	<i>Calophaca wolgarica</i> (L. fil.)	<i>Genista tanaïtica</i> P. Smirn.	<i>Calophaca wolgarica</i> (L. fil.)	<i>Genista tanaïtica</i> P. Smirn.	<i>Calophaca wolgarica</i> (L. fil.)
МС без гормонов, контроль		$1,8 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,1$	0	0
Кин	0,5	$2,8 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$	10	5
	1,0	$5,9 \pm 0,7$	$3,9 \pm 1,2$	$2,4 \pm 0,8$	$2,6 \pm 0,2$	15	10
	5,0	$5,2 \pm 1,1$	$3,2 \pm 1,6$	$2,6 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,3$	46	42
Зеа	0,1	$0,2 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,2$	0	0
	0,5	$0,5 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,2$	10	12
	1,0	$0,5 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,01$	$1,0 \pm 0,01$	20	24
6-БАП	0,1	$3,8 \pm 0,6$	$2,8 \pm 0,8$	$4,3 \pm 0,7$	$3,8 \pm 0,5$	0	0
	0,5	$3,7 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,3$	$5,4 \pm 1,0$	$3 \pm 0,9$	20	18
	1,0	$2,9 \pm 0,8$	$2,1 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,9$	$2,4 \pm 0,5$	38	41
	2,0	$2,3 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,4$	$6,4 \pm 0,7$	$4,5 \pm 1,0$	56	62
	5,0	$2,4 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,7$	$7,5 \pm 1,1$	$5,3 \pm 0,5$	70	65

Важным показателем при культивировании редких видов растений является сохранение высоких показателей коэффициента размножения в зависимости от количества субкультивирований. На примере редких видов семейства *Fabaceae* установлена зависимость коэффициента размножения от количества субкультивирований. Так, для *G. tanaitica* и *C. wolgarica* наиболее высокий коэффициент размножения наблюдался на этапе введения в культуру и на первых этапах субкультивирования (3-4 пассаж) – $8,2 \pm 1,9$ и $6,5 \pm 1,7$, а для *H. grandiflorum*, *H. cretaceum*, *H. razoumovianum* максимальный коэффициент размножения приходился на 5-6 пассаж – $5,9 \pm 1,2$, $4,6 \pm 0,9$ и $6,1 \pm 1,4$ соответственно (рис. 5).

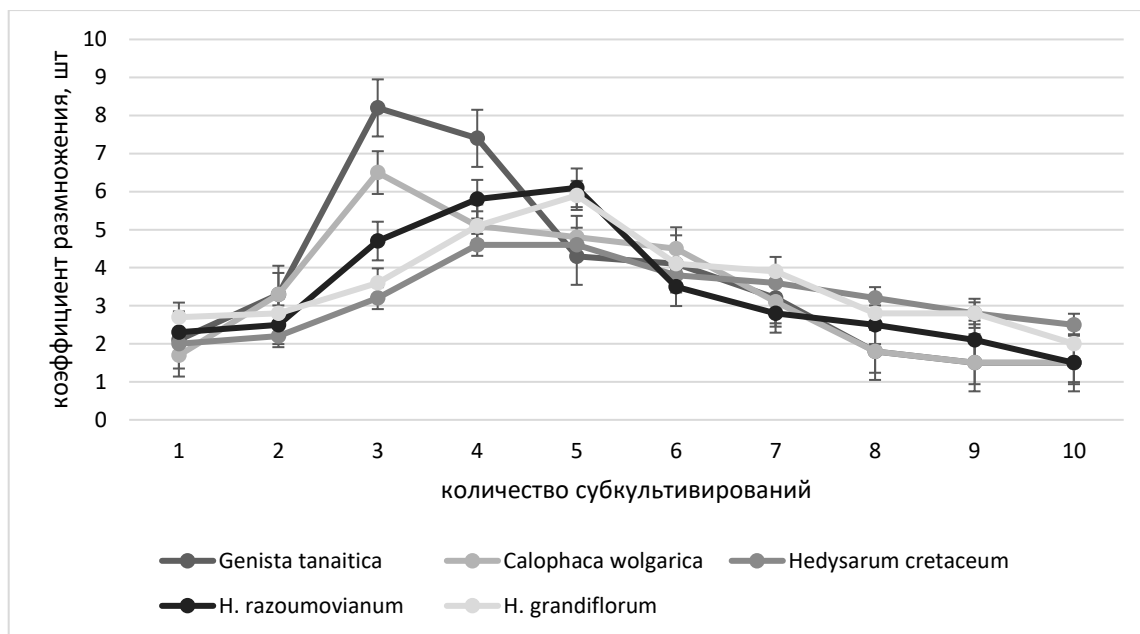


Рис. 5 Коэффициент размножения видов семейства *Fabaceae* в зависимости от количества субкультивирований (питательная среда 6-БАП 0,1 мг/л и ИУК 0,01 мг/л, 35 день культивирования)

Анализ полученных данных по влиянию различных концентраций цитокининов на этапе микроразмножения позволил выделить 3 группы питательных сред:

I группа сред – концентрация 6-БАП – 0,1-0,5 мг/л; коэффициент размножения от 4 до 20 и количество витрифицированных побегов не более 20%.

II группа – концентрация 6-БАП в этих вариантах составляла 0,5-1,0 мг/л; коэффициент размножения от 20 до 30 и количество витрифицированных побегов не более 40%.

III группа – отнесены среды с концентрацией 6-БАП от 2,0 до 15 мг/л независимо от соотношения с ауксином; коэффициент размножения от 2,8 до 35 и количество витрифицированных побегов более 50%.

Выводы

Оптимальной питательной средой на этапе микроразмножения по соотношению коэффициента размножения и витрифицированных растений для *T. gesneriana* и *F. ruthenica* является МС, дополненная 6-БАП 0,1 мг/л и ИУК 0,01 мг/л. Коэффициент размножения для *T. gesneriana* на данной питательной среде составил $4,5 \pm 0,5$, а *F. ruthenica* – $3,9 \pm 1,1$ в сочетании с нулевым показателем витрифицированных растений;

для *G. tanaitica* и *C. wolgarica* – МС, дополненная 6-БАП 0,1 мг/л, коэффициент размножения составил $4,3 \pm 0,7$ и $3,8 \pm 0,5$ соответственно. На питательной среде, содержащей Кин в концентрации 1,0 мг/л, зафиксированы максимальные показатели линейного роста для *G. tanaitica* и *C. wolgarica* – $5,9 \pm 0,7$ см и $3,9 \pm 1,2$ см.

Оптимальными, для большинства редких видов растений, являются питательные среды, содержащие 6-БАП в концентрации 0,1–0,5 мг/л в сочетании с ИУК в концентрации 0,01–0,1 мг/л; у 90 – 100% растений отмечено отсутствие аномальных побегов и образование 4 – 12 адвентивных побегов на одно растение.

Таким образом, методы биотехнологии и коллекции редких видов *in vitro*, являются дополнительным инструментом в решении проблемы сохранения биологического разнообразия *ex situ*. Они обеспечивают поддержание уникальных генотипов даже в том случае, если они представлены единичными экземплярами.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Ветчинкина Е.М. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2010. – 20 с.
3. Здруйковская-Рихтер А.И. Культура изолированных зародышей и некоторые другие приемы выращивания растений *in vitro*. – М.: Колос, 1974. – 60 с.
4. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. Киев: Наукова думка, 1992. – 488 с.
5. Красная книга Волгоградской области Т.2. Растения и другие организмы / под ред. д.б.н., проф. О.Г. Барановой, д.б.н., проф. В.А. Сагалаева. – Воронеж: ООО «Издательство «Принт», 2017. – 268 с.
6. Крахмалева И.Л., Молканова О.И., Малаева Е.В. Использование клонального микроразмножения для разных форм перспективных сортов *Actinidia kolomikta* (Rupr. et Maxim) Maxim // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2019. – Вып. 133. – С. 80–86. DOI: 10.36305/05131634-2019-133-80-86
7. Малаева Е.В. Сохранение редких видов растений в коллекции *in vitro* Волгоградского регионального ботанического сада // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: Материалы XVIII Междунар. науч.-практ. конф. – Барнаул, 2019. – С. 606–610. DOI: 10.14258/pbssm.2019127
8. Малаева Е.В. Особенности культивирования *in vitro* редких видов семейства *Iridaceae* Juss. // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии, 2022. – № 21(2). – С. 120–123. DOI: 10.14258/pbssm.2022066
9. Молканова О.И., Коновалова Л.Н., Стахеева Т.С. Особенности размножения и сохранения коллекции ценных и редких видов растений в условиях *in vitro* // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2016. – Вып. 120. – С. 17–23.
10. Молканова О.И., Горбунов Ю.Н., Ширнина И.В., Егорова Д.А. Применение биотехнологических методов для сохранения генофонда редких видов растений // Ботанический журнал – 2020. – Т. 105. – №6. – С. 610–619. DOI: 10.31857/S0006813620030072
11. Набиева А.Ю., Елисафенко Т.В. Особенности размножения редких сибирских видов рода *Iris* L. – *I. glaucescens* Bunge. и *I. bloudowii* Ledeb. в условиях культуры // Turczaninowia. – 2012. – Вып. 15(1). – С. 80–84.
12. Самарская В.О., Малаева Е.В., Постнова М.В. Аспекты клонального микроразмножения и сохранения растений *in vitro* // Природные системы и ресурсы – 2019. – Т. 9. – № 3. – С.13–22. DOI: 10.15688/nsr.jvolsu.2019.3.2

13. Семенова Д.А., Молканова О.И., Ахметова Л.Р., Митрофанова И.В. Влияние состава питательной среды на регенерацию *in vitro* некоторых сортов *Clematis* L., Вестник КрасГАУ. – 2023. – № 4. – С. 66-73. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-4-66-73
14. Тихомирова Л.И. Особенности индукции морфогенеза из различных фрагментов цветка ириса в культуре *in vitro* // Turczaninowia. – 2010. – № 3 (3). – С. 147-151.
15. Тихомирова Л.И. Особенности морфогенеза *Iris sibirica* L. в культуре *in vitro* // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. Материалы восьмой международной научно-практической конференции – Барнаул, 2009. – С. 364-369.
16. Gamborg, O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – Vol. 46. – № 5. – P. 417-421.
17. Knudson L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds // Amer. Org. Soc. Bul, – 1946. – Vol. 15. – P. 214-217.
18. Malaeva E.V., Molkanova O.I. Regeneration peculiarities of *in vitro* berry cultures // Acta Horticulturae. – 2021. – Vol. 1324. – P. 89-94. DOI: 10.17660/ActaHortic.2021.1324.13
19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Phsiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – №3. – P. 473-497.
20. Tikhomirova L.I., Malaeva E.V. Research and development of process conditions for growing young plants *Iris sibirica* L. Aimed at bio-synthesis of tannins, flavonoids and xanthones // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. – 2020. – Vol. 941. – 012035. DOI:10.1088/1757-899X/941/1/012035

Статья поступила в редакцию 11.04.2025 г.

Malaeva E.V., Fetisova A.I. Collection of rare plants *in vitro*: formation and study // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2025. - № 155 - P.91-101

This article provides information about improving of the clonal micropropagation technology and *in vitro* reproduction peculiarities of rare and valuable plant species. The collection *in vitro* plant, includes 50 rare species listed in the Red Book of the Russian Federation and the Red Book of the Volgograd Region - belonging to 19 families and various ecological and phytocenotic groups. The optimal mode of rare species explants' sterilization has been selected - a 5% solution of Lysoformin® 3000 at an exposure of 7 minutes. When using this regime, the percentage of viable seeds of *Tulipa* L. and *Fritillaria* L. was maximum and amounted to 90% and 70%, respectively. For the majority of rare plant species, nutrientmedia containing 6-BAP at a concentration of 0.1-0.5 mg/l in combination with IAA at a concentration of 0.01-0.1 mg/l are optimal; in 90–100% of plants, the absence of abnormal shoots and the formation of 4–12 axillary ones per plant were noted.

Key words: *clonal micropropagation; multiplication rate; proliferation; plant growth regulators; rare plant*