

Горбунов Ю.Н., Молканова О.И., Егорова Д.А., Ширнина И.В., Васильева О.Г.
Сохранение видов растений Красной книги России *ex situ* в ботанических садах

.....
**Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»**
=====

УДК 502/504+576.7

**Сохранение видов растений Красной книги России *ex situ* в
ботанических садах**

Горбунов Ю.Н., Молканова О.И., Егорова Д.А., Ширнина И.В., Васильева О.Г.

Главный ботанический сад им. Н.В.Цицина РАН

Аннотация

*Ботанические сады России активно участвуют в сохранении редких и исчезающих растений. Особое внимание уделяется ими видам, включенным в Красную книгу РФ. В настоящее время в живых коллекциях ботанических садов культивируется 377 видов высших растений из 514 представленных в Красной книге России, что составляет 73%. Таким образом, Российской Федерацией практически выполнено требование цели 8 Глобальной стратегии сохранения растений. Подавляющее большинство редких видов растений представлены образцами в коллекциях многих ботанических садов, и надежность их охраны в условиях культуры не вызывает сомнения. В Главном ботаническом саду РАН сохраняется коллекция *in vitro* редких и исчезающих растений, включающая 82 вида, что составляет 17,3% от общего числа покрытосеменных растений, внесенных в Красную книгу РФ. В результате многолетних исследований выявлены особенности культивирования и сохранения *ex situ* растений, относящихся к различным семействам. Отражены основные методологические аспекты на этапах получения стерильной культуры, собственно микроразмножения и длительного депонирования. Оптимизированы составы питательных сред и факторы культивирования для замедленного роста эксплантов исследуемых культур и сохранения их жизнеспособности.*

Ключевые слова: РЕДКИЕ И ИСЧЕЗАЮЩИЕ ВИДЫ РАСТЕНИЙ, КРАСНАЯ КНИГА РФ, СОХРАНЕНИЕ *EX SITU*, ДЛИТЕЛЬНОЕ СОХРАНЕНИЕ *IN VITRO*

Введение

Ботанические сады собирали и хранили обширные живые коллекции растений для самых разных целей на протяжении многих веков. В соответствии с определением, данным П.С. Вайс Джексоном, ботанические сады являются: "...учреждениями,

хранящими документированные коллекции живых растений в целях научных исследований, сохранения, демонстрации и образования" [1]. В последние годы ботанические сады были вовлечены в область сохранения растительного разнообразия, что стало одним из ведущих направлений их деятельности.

Во всем мире многие виды растений находятся под угрозой исчезновения из-за постепенного исчезновения наземных природных экосистем в результате различной деятельности человека. Часто это происходит из-за расчистки местной растительности для ведения сельского хозяйства и связанной с этим эрозии, засоления и вторжения чужеродных видов, но в последнее время новой серьезной угрозой становится изменение климата. В период 2000-2020 гг. Красный список МСОП был пополнен в общей сложности 41635 видами цветковых растений, причем 40% от их общего числа составляют виды, относящиеся к категории находящихся под угрозой исчезновения [2].

Из-за возросшей угрозы утраты биологического разнообразия особое внимание уделяется мерам *in situ* и *ex situ*, направленным на прекращение потерь популяций и таксонов растений. Разработаны национальные и международные стратегии и документы. Конвенция о биологическом разнообразии (КБР) является основой для традиционных и новых обязанностей ботанических садов, при этом задача сохранения видов растений *ex situ* Конвенцией практически полностью была возложена на ботанические сады [3]. Российские ботанические сады поддержали КБР, приняв в 2003 г. «Стратегию ботанических садов России по сохранению биоразнообразия растений» [4].

Для более полной детализации в 2002 г. в состав КБР была включена Глобальная стратегия сохранения растений (ГССР), включавшую 16 ориентированных на результат глобальных целевых показателей на 2010 год. КБР к настоящему времени подписана 189 странами в том числе и Россией, и ГССР имеет для них обязательную силу. Наиболее важные цели этой стратегии связаны с изучением и документированием разнообразия растений, разработкой моделей сохранения растений на основе исследований и практического опыта, а также сохранением разнообразия растений [5]. В 2010 г. цели ГССР были обновлены в рамках КБР с пересмотренными задачами на 2011-2020 гг. Наиболее важной для ботанических садов была целевая задача восемь, сориентированная на достижение к 2020 году «не менее 75 процентов видов растений, находящихся под угрозой исчезновения, в коллекциях *ex situ*, предпочтительно в стране происхождения, и

не менее 20 процентов доступных для программ восстановления и реставрации» [6].

Сохранение *ex situ* преследует ряд целей:

1. Спасение генофонда вида, которому угрожает исчезновение.
2. Производство материала для реинтродукции, усиления и восстановления природных популяций исчезающих видов.
3. Предоставление материала для исследований в области биологии редких видов.
4. Накопление зародышевой плазмы для хранения в живых коллекциях и генетических банках.
5. Введение в культуру для снятия или уменьшения давления на природные популяции.
6. Выращивание видов с рекальцитратными семенами, которые нельзя хранить в семенных хранилищах, в живых коллекциях или *in vitro*.
7. Формирование навыков и знаний для поддержки более широких природоохранных целей, например, для восстановления нарушенных сообществ.
8. Предоставление материалов для экологического образования и создания специальных экспозиций.

В мире существует более 1500 ботанических садов и дендрариев, содержащих в своих коллекциях более 80 000 видов. Некоторые из этих ботанических садов в настоящее время имеют банки семян, лаборатории для культивирования тканей и другие технологии *ex-situ*. [1].

В России в настоящее время насчитывается 110 ботанических садов и дендрариев. Их работа координируется Советом ботанических садов России (СБСР). В 2012 г. СБСР организовал сбор сведений по коллекционным фондам видов растений Красной книги РФ (КК РФ) в ботанических садах и дендрариях. По итогам этого исследования была опубликована монография [7]. С использованием этого материала в качестве основы, нами в дальнейшем проводился мониторинг коллекций живых растений КК РФ посредством анализа ежегодных отчетов ботанических садов, публикуемых в Информационных бюллетенях Совета ботанических садов стран СНГ [8].

В 2020 г. в ботанических садах культивировалось 377 видов высших растений из 514 представленных в КК РФ, что составляет 73%. Таким образом, Российской Федерацией практически выполнено требование цели 8 ГССР. Наблюдается значительный

прогресс по сравнению с 2012 годом, когда этот показатель составлял 64%. [7]. По отдельным систематическим группам наблюдается следующая картина: Покрытосеменные – из 474 сохраняются *ex situ* 343 вида (72%), Голосеменные – из 14 видов – 14 (100%), Папоротникообразные – из 26 видов – 18 (69%).

Подавляющее большинство редких видов растений представлены образцами в коллекциях многих ботанических садов, и надежность их охраны в условиях культуры не вызывает сомнения. Особое внимание требуется к видам, находящимся под угрозой исчезновения, т.е. категории 1 КК РФ. В коллекциях садов содержится 56 видов этой категории (65% от общего числа в КК РФ). Около половины этих видов имеют надежную базу охраны в условиях культуры. Другая же половина вызывает серьезные сомнения в их сохранности. Например, 20 видов категории 1 (брахантемум Баранова, серпуха донская, пижма Акинфиева, одуванчик белоязычковый, кочедыжник японский, горноколосник странный, щитовник китайский, астрагал ольхонский, горошек Цыдена, сверция многолетняя, марсилия щетинистая, эвриала устрашающая, ремнелепестник козий, р. прекрасный, ятрышник прованский, стевениелла сатириовидная, мякяя цельнолистная, лапчатка волжская, вероника нителестная, волчник баксанский) представлены в коллекции только одного ботанического сада. Необходимо принять срочные меры по расширению культурного ареала этих видов.

Возможности ботанических садов по введению в культуру видов КК РФ далеко не исчерпаны. В таблице 1 представлены семейства с наибольшим количеством видов, включенных в Красную книгу. Если семейства *Rosaceae*, *Iridaceae* и *Liliaceae* достаточно полно представлены в культуре, многие виды остальных семейств имеют определенные перспективы для сохранения в условиях *in situ*. Если имеются сложности в выращивании этих видов, может быть, следует попытаться использовать возможности банков семян и меристем.

В последнее время при охране редких видов все шире используются методы биотехнологии [9]. Методы прорастания семян, вегетативного размножения и акклиматизации *in vitro* способствуют получению материала для пополнения живых коллекций, для реинтродукции и усиления природных популяций. Кроме того, методы культивирования *in vitro* используются для изучения морфогенеза растений, а также влияния экологических и морфогенетических факторов на их рост и развитие (например,

типы жизненных форм или географическое происхождение образцов). Несмотря на то, что разработаны стандартные методы размножения *in vitro*, исчезающие виды часто имеют специфические потребности в развитии, и, следовательно, для их успешного культивирования необходимы модифицированные процедуры. Кроме того, ограниченное количество доступного растительного материала редких видов может составить дополнительные проблемы в применении методов *in vitro* к исчезающим видам [10].

Таблица 1. Представленность некоторых семейств покрытосеменных растений в коллекционных фондах ботанических садов России

Семейство	Число видов, включенных в Красную книгу РФ	Число видов в коллекциях ботанических садов
Apiaceae	17	8
Asteraceae	23	16
Brassicaceae	20	9
Fabaceae	57	23
Iridaceae	17	16
Liliaceae	17	16
Orchidaceae	66	36
Poaceae	20	9
Ranunculaceae	16	13

Методы *in vitro* предоставляют особые возможности, которые можно использовать по-разному, в зависимости от биологических особенностей и состояния вида. Сбор посадочного материала, черенков растений и семян, как правило, является наиболее легким методом предоставления материала для сохранения *ex situ*. Однако во многих случаях семена стерильны или они не завязываются, либо в природе осталось так мало растений, что сбор целых растений может отрицательно повлиять на жизнеспособность популяции. Сбор тканей *in vitro* менее вреден, чем удаление целых растений, и позволяет эффективно отбирать образцы с большого количества растений, особенно, когда семена имеются в наличии.

В ряде российских ботанических садов основаны банки меристем. Наиболее крупные коллекции редких растений имеются в Главном ботаническом саду (ГБС РАН),

Волгоградском областном ботаническом саду, Никитском ботаническом саду, Ботаническом саду Белгородского государственного университета и Центрально-Сибирском ботаническом саду СО РАН [11].

В банке меристем ГБС РАН сохраняется 82 вида, включенные в КК РФ. Среди них два вида относятся к категории 0 – вероятно исчезнувшие (*Scilla scilloides* (Lindl.) Druce и *Gladiolus palustris* Gaudin), 11 видов из категории 1 – находящиеся под угрозой исчезновения (*Panax ginseng* C. A. Mey., *Aristolochia manshuriensis* Kom., *Epimedium koreanum* Nakai, *Crambe cordifolia* Stev., *Euonymus nana* Bieb., *Dioscorea caucasica* Lipsky, *Belamcanda chinensis* (L.) DC., *Iris acutiloba* C. A. Mey., *Paeonia wittmanniana* Hartwiss ex Lindl., *Potentilla vulgarica* Juz., *Sanguisorba magnifica* I. Schischk. et Kom.) и 30 видов категории 2 – сокращающиеся в численности. Кроме того, три вида: *Campanula besenjinica* Fomin, *Muscari dolichanthum* Woronow et Tron и *Tulipa lipskyi* Grossh. не встречаются в живых коллекциях ботанических садов. Большинство видов представлено образцами из разных популяций [12].

Основной этап клонального микроразмножения – получение стерильной культуры *in vitro*. В зависимости от возраста и происхождения растительных тканей применяли различные схемы стерилизации. На этапе введения в культуру *in vitro* наиболее оптимальной была последовательная стерилизация «Чистоцветом» (4%), этанолом (70%) в течение 30 сек. и раствором гипохлорита кальция (7%) 5-7 мин. Семена обрабатывали раствором в течение 7-20 мин., фрагменты вегетативных частей растений – 3-7 мин. Увеличение концентрации и экспозиции приводило к уменьшению уровня контаминации, но процент жизнеспособных эксплантов при этом также снижался.

На стадии инициации и во время дальнейшего культивирования *in vitro* некоторых видов редких растений существует проблема снижения морфогенетической активности за счёт фенольной экссудации. Фенольная экссудация варьирует в зависимости от вида, генотипа и физиологического состояния растения, состава питательной среды, условий и длительности культивирования [8]. Уменьшить отрицательное воздействие полифенолов помогают антиоксиданты (лимонная и аскорбиновая кислоты, цистеин и др.), сорбенты (PVP, древесный уголь) и ингибиторы полифенолоксидазы (диоксид серы, хлорид натрия и др.) [9]. Среди изученных растений встречались виды редких растений с повышенным синтезом фенольных соединений в процессе культивирования *in vitro*, например,

Kalopanax septemlobus (Thunb.). Было выявлено, что для снижения фенольной экссудации целесообразно добавлять в питательную среду антиоксиданты в количестве 100,0 мг/л аскорбиновой кислоты или сочетание 50,0 мг/л лимонной и 50,0 аскорбиновой мг/л кислоты, а также ингибиторы полифенолоксидазы – 50,0 мг/л PVP.

Морфогенез и регенерация *in vitro* зависят от комплекса факторов, и не существует универсальных биотехнологических методов для размножения и сохранения конкретного таксона. Для культивирования *in vitro* были выбраны методы размножения, минимизирующие риск появления соматональной изменчивости [10]. Прежде чем система *in vitro* может быть использована для хранения генофонда, должны быть оптимизированы эффективные способы регенерации и клонального микроразмножения.

В ходе исследований для большинства изучаемых видов редких и исчезающих растений в качестве базовой питательной среды для культивирования использовалась среда MS, для представителей семейства Ericaceae – среда Anderson. Для модельных объектов растений разных жизненных форм установлены оптимальные длительность пассажа, тип и концентрация регуляторов роста на этапе собственно микроразмножения (табл. 2).

Таблица 2. Продолжительность периода субкультивирования редких и исчезающих видов растений и состав питательных сред

Объект	Длительность субкультивирования, сут.	Концентрация и тип регулятора роста, мг/л
<i>Aristolochia manshuriensis</i> Kom.	25-30	0,8 BAP; 0,01 IAA
<i>Galanthus angustifolius</i> G. Koss	30-45	10,0 BAP; 0,1 NAA
<i>Kalopanax septemlobus</i> (Thunb.) Koidz.	25-30	1,0 BAP; 0,05 IAA
<i>Gladiolus palustris</i> Gaudin	40-50	10,0 BAP; 0,1 IAA
<i>Rhododendron schlippenbachii</i> Maxim.	45-60	15,0 ip, 5,0 IAA
<i>Paeonia obovata</i> Maxim.	40-60	1,0 BAP
<i>Sanguisorba magnifica</i> I. Schischk. et Kom.	20-35	0,5 BAP; 0,01 IAA

Для устойчивого сохранения культур *in vitro* необходимо поддерживать их жизнеспособность при слабой динамике ростовых процессов. Снижение темпов роста достигается за счет уменьшения температуры и интенсивности освещения и уменьшения

минеральной основы питательной среды, добавления осмотически активных веществ и ретардантов [11, 12]. Полученные результаты позволили установить, что оптимальным условием сохранения для большинства видов является культивирование на питательной среде, содержащей $\frac{1}{2}$ MS и 40,0 г/л сахарозы, дополненной 0,3 мг/л ВАР. После сохранения в течение 1,5 лет на модельном объекте (*Aristolochia manshuriensis* Kom.) проводили оценку регенерационного потенциала. После переноса регенерантов в стандартные условия культивирования наблюдали увеличение регенерационного потенциала до 95%, а также увеличение образования адвентивных почек и микропобегов в 2-3 раза. Однако при дальнейших субкультивированиях уменьшалась активность регенерации и снижалась динамика ростовых процессов (на 10-15 %).

Для редких растений разных таксономических групп были определены оптимальные типы эксплантов и их размер на основе ростового и органогенетического индекса. В таблице 3 приведены оптимальные показатели эксплантов для длительного культивирования редких видов растений разных жизненных форм.

Таблица 3. Оптимальный тип экспланта и его размер (мм) для хранения растений *in vitro*

Виды	Апикальные меристемы	Сегменты микропобегов	Луковицы и их сегменты
Древесные			
<i>Rhododendron schlippenbachii</i> Maxim.	0,2-0,3	8,0-12,0	
<i>Aristolochia manshuriensis</i> Kom.	0,3-0,7	7,0-9,0	
<i>Kalopanax septemlobus</i> (Thunb.) Koidz.	3,0-5,0	12,0-15,0	
Травянистые			
<i>Sanguisorba magnifica</i> I. Schischk. et Kom.	0,2-0,4	0,5-5,0	
<i>Paeonia obovata</i> Maxim.	2,5-4,0	2,0-3,5	
Луковичные			
<i>Gladiolus palustris</i> Gaudin	0,3-0,5		3,0-5,0
<i>Galanthus angustifolius</i> G. Koss	0,2-0,4		2,0-4,5

Основным критерием при выборе оптимального вида экспланта, как для введения таксонов в культуру *in vitro*, так и для длительного воспроизводства и сохранения, является жизненная форма растений. На основе комплекса морфометрических

показателей определены оптимальные размеры и типы эксплантов для длительного хранения коллекции в условиях *in vitro*.

Заключение

Ботанические сады России активно участвуют в сохранении редких и исчезающих растений. Особое внимание уделяется ими видам, включенным в Красную книгу РФ. В 2020 г. в ботанических садах культивировалось 377 видов высших растений из 514 представленных в КК РФ, что составляет 73%. Таким образом, Российской Федерацией практически выполнено требование цели 8 ГССР. Наблюдается значительный прогресс по сравнению с 2012 годом, когда этот показатель составлял 64% [7]. По отдельным систематическим группам наблюдается следующая картина: Покрытосеменные – из 474 сохраняются *ex situ* 343 вида (72%), Голосеменные – из 14 видов 14 (100%), Папоротникообразные – из 26 видов 18 (69%). Подавляющее большинство редких видов растений представлены образцами в коллекциях многих ботанических садов, и надежность их охраны в условиях культуры не вызывает сомнения.

В ходе многолетних исследований по клональному микроразмножению в ГБС РАН сохраняется коллекция *in vitro* редких и исчезающих растений, включающая 82 вида, что составляет 17,3% от общего числа покрытосеменных растений, внесенных в Красную книгу РФ.

Установлено, что сохранению жизнеспособности и минимизации роста эксплантов при хранении *in vitro* в течение 1,5 лет способствовало совместное использование пониженной температуры и освещенности, а также добавление осмотиков в состав питательной среды. Обоснованы типы и размеры эксплантов для растений разных жизненных форм для эффективного сохранения жизнеспособности в процессе депонирования при пониженной температуре в условиях *in vitro*. На основании оценки регенерационного потенциала после длительного хранения культур (при пониженной температуре в течение 1,5 года), на первых этапах культивирования выявлен стимулирующий эффект, который выражался в увеличении регенерационного потенциала и динамики ростовых процессов.

Список использованных источников

1. Wyse Jackson P.S. Experimentation on a large scale - an analysis of the holdings and resources of botanic gardens. [Electronic resource] / BGCNews, Richmond, UK, Botanic Gardens Conservation International. – 1999. – Vol 3. – N 3. – p. 53-72. URL: <http://www.bgci.org/resources/article/0080>.
2. The IUCN Red List of Threatened Species [Электронный ресурс]. – 2020. – URL: <http://www.iucnredlist.org>.
3. Конвенция о биологическом разнообразии. Текст и приложения. UNEP/CBD. – 1995. – 34 с.
4. Стратегия ботанических садов России по сохранению биоразнообразия растений. – М.: Красная звезда, 2003. – 32 с.
5. Глобальная стратегия сохранения растений. – М.: Секретариат конвенции о биологическом разнообразии, 2002. – 19 с.
6. Global strategy for plant conservation: 2011-2020. – London: BGCI, 2010. – 38 p.
7. Горбунов Ю.Н., Соадатова Р.З., Казанцева Е.С. Генофонд растений Красной книги Российской Федерации, сохраняемый в коллекциях ботанических садов и дендрариев. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2012. – 220 с.
8. Информационный бюллетень Совета ботанических садов стран СНГ. – Вып. 1-13. – 2014-2020. <https://sbsgbsad.wordpress.com>.
9. Молканова О.И., Горбунов Ю.Н., Ширнина И.В., Егорова Д.А. Применение биотехнологических методов для сохранения генофонда редких видов растений // Ботан. журнал. – 2020. – Т. 105. – № 6. – С. 610-619.
10. Kauth P., Kane M. E., Vendrame W. A. Comparative in vitro germination ecology of *Calopogon tuberosus* var *tuberosus* (Orchidaceae) across its geographic range. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* – 2011. – Vol. 47. – № 47. – P. 148-156.
11. Mitrofanova I.V., Molkanova O.I. Biotechnology strategy of plant biodiversity conservation in botanical gardens of Russia // *Acta Hort.* – 2020. – № 1298. – P. 231-238.
12. Молканова О.И. Генетические банки растений в ботанических садах России // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 22-27.

=====

Цитирование:

Горбунов Ю.Н., Молканова О.И., Егорова Д.А., Ширнина И.В., Васильева О.Г. Сохранение видов растений Красной книги России *ex situ* в ботанических садах [Электрон. ресурс] // АгроЭкоИнфо: Электронный научно-производственный журнал. – 2021. – №2. – Режим доступа: http://agroecoinfo.narod.ru/journal/STATYI/2021/2/st_211.pdf. DOI: <https://doi.org/10.51419/20212211>.