

В.Б. БЕЛОКУРОВА, Е.В. ЛИСТВАН,
П.Д. МАЙСТРОВ, Й.Й. СИКУРА,
Ю.Ю. ГЛЕБА, Н.В. КУЧУК

Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ МИРОВОЙ ФЛОРЫ



Генетический банк представителей мировой флоры ex situ, включающий коллекцию семян и коллекцию клеточных культур in vitro, создан в Институте клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины на основе сочетания исследований в области классической ботаники и биотехнологии растений. В настоящее время насчитывается более 4000 образцов в банке семян и более 2000 клеточных линий в банке in vitro. Созданный генетический банк, который внесен в список объектов, составляющих национальное научное достояние Украины, является базой для разработки биотехнологических методов сохранения биоразнообразия мировой флоры и поиска в сохраняемом растительном материале соединений с биологической активностью.

© В.Б. БЕЛОКУРОВА, Е.В. ЛИСТВАН, П.Д. МАЙСТРОВ,
Й.Й. СИКУРА, Ю.Ю. ГЛЕБА, Н.В. КУЧУК, 2005

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2005. № 1

Введение. Одной из современных проблем, привлекающих к себе все большее внимание, является быстрое истощение генетического разнообразия как дикорастущих, так и культурных растений [1, 2]. Это происходит, в частности, в результате многолетней селекционной практики, направленной на отбор и сохранение немногих элитных генотипов ограниченного числа сельскохозяйственных видов, и вследствие активной хозяйственной деятельности человека, приводящей к постоянному сокращению ареалов дикорастущих видов. В связи с этим сохранение зародышевой плазмы растений приобретает важнейшее значение.

Внести весомый вклад в решение стоящих задач может современная биотехнология, в частности, путем создания, поддержания и использования так называемых банков зародышевой плазмы растений (germplasm banks). Растительный материал из таких банков может использоваться как для будущего улучшения сельскохозяйственных культур, так и для сохранения и восстановления численности дикорастущих исчезающих, редких и эндемичных видов [2, 3]. Все большее значение методы биотехнологии приобретают для изучения и использования лекарственных растений [1, 4, 5].

Создание коллекций генетического разнообразия растений считается наиболее эффективным путем его сохранения, обогащения и использования. Подтверждением этому является создание Международного института генетических ресурсов растений (IPGRI) со штаб-квартирой в Риме, деятельность которого направлена на развитие технологий сохранения генетических ресурсов растений ex situ, в частности, с использованием методов культуры in vitro [6]. В Харькове функционирует Национальный центр генетических ресурсов растений Украины; большая работа в этом направлении ведется в Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) [7]. Созданные и функционирующие коллекции растений рассматриваются прежде всего как источник исходного материала для селекции и поэтому часто специализируются на конкретных коммерчески важных культурах, таких как кукуруза и пшеница [8], клевер [9] и др. Большинство образцов, собранных в генетических банках, принадлежат к очень ограниченному числу сельскохозяйственных видов. По некоторым оценкам, лишь около 15 % из них — дикорастущие родственники культурных растений [3].

Вместе с тем разработанные методы хранения, в том числе с применением культуры *in vitro*, могут с успехом использоваться для сохранения огромного количества дикорастущих видов растений, чьи ареалы неуклонно сокращаются, в том числе редких, исчезающих и эндемичных, а также видов, которые могут быть потенциальными донорами ценных признаков для практической селекции [1, 4, 10, 11]. Сохранение зародышевой плазмы растений можно осуществлять как путем хранения семян, так и в асептической культуре в виде культивируемых на питательных средах растений. Важную роль использования методов культуры тканей в программах по сохранению генетических ресурсов растений подчеркивают целый ряд авторов [1, 6, 12, 13].

В настоящей работе представлена информация о созданном в Институте клеточной биологии и генетической инженерии (ИКБГИ) НАН Украины генетическом банке *ex situ*, в котором сохраняются представители как культурных, так и дикорастущих видов.

Материалы и методы. *Создание и поддержание банка семян.* Исходный материал для создания банка семян собирался из двух основных источников — в ходе ряда научных экспедиций в различные районы земного шара и как результат сотрудничества с ботаническими учреждениями разных стран мира, которые любезно предоставили семенной материал. Образцы семян хранятся в условиях пониженных температур (2–4 °С) в промышленных холодильных камерах. Каждый образец сохраняется в отдельном пакете и имеет свой порядковый номер, занесенный в компьютерную базу данных. Регулярно проводится работа по повторному проращиванию *in vitro* тех или иных образцов семян с целью проверки их жизнеспособности после длительного хранения, а также, при необходимости, для обновления соответствующих асептических линий. Созданный банк семян стал основой для получения асептически культивируемых растений и клеточных линий, которые составляют банк представителей мировой флоры *in vitro*.

Введение в культуру in vitro. Семена использовали в качестве исходного материала для получения асептических линий. Поверхностную стерилизацию проводили согласно стандартным методикам [14] с использованием соединений, содержащих ртуть или хлор, в качестве стерили-

зующих агентов. Время обработки, которое подбирали эмпирически для каждого конкретного вида растений в зависимости от величины семян и характера их поверхности, составляло от 3 до 30 мин. Семена переносили для прорастания на модифицированную безгормональную среду Мурасиге и Скуга [15] (MS/2) с вдвое уменьшенным содержанием макрокомпонентов и сахарозы и инкубировали в темноте либо в условиях 16-часового фотопериода при 23–25 °С. Для успешного прорастания семян ряда видов растений требовалась стратификация, которую проводили согласно рекомендациям для каждого конкретного вида [16]. Для этого после стерилизации семена инкубировали на среде, содержащей 0,5 мг/л гибберелловой кислоты (ГК₃), либо на безгормональной среде при пониженных температурах (2–8 °С; длительность холодной обработки зависела от вида растений и составляла от 2 нед до 8 мес).

Культивирование асептических растений. Проростки, полученные из семян, культивировали при 23–27 °С и 16-часовом фотопериоде на безгормональных средах MS, MS/2, B₃ [17] или на тех же средах, но с добавлением 0,1–1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП). Если эти среды были неэффективными, использовали рекомендации, приведенные в монографии [18], или другие данные литературы, опубликованные для конкретных видов растений. Субкультивирование проводили в зависимости от темпов роста растений каждого конкретного вида с интервалом от двух до четырех месяцев путем пересадки верхушки побега или розетки на свежую среду того же состава. Вегетативные органы асептических проростков (листовые пластинки, междоузлия, корни) использовали как экспланты для получения клеточных линий.

Индукция и поддержание клеточных линий. Клеточные линии (калусные ткани) индуцировали и культивировали на питательных средах пяти основных вариантов, созданных на основе среды MS с различными комбинациями регуляторов роста (табл. 1). Коллекция клеточных линий поддерживается при 23–27 °С в условиях 16-часового фотопериода с интервалом субкультивирования 3–4 нед.

Информационное обеспечение работы и создание базы данных. С целью упорядочения больших объемов информации, которые неизбежно на-

Таблица 1

Состав питательных сред для индукции и культивирования каллусных тканей различных видов растений, содержащихся в банке зародышевой плазмы, мг/л

Компоненты среды	Питательная среда				
	4x	4c	NB	K	LS
Макрокомпоненты	MS	MS	MS	MS	MS
Микрокомпоненты	MS	MS	MS	MS	MS
Fe-хелат	MS	MS	MS	MS	MS
Витамины	MS	MS	MS	MS	MS
2,4-Д	2	2	1	1	0,2
НУК	0,5	0,5	0,2	—	0,2
ИУК	0,5	0,5	—	—	—
БАП	—	—	0,2	1	—
Кинетин	0,2	0,2	—	—	—
Гидролизат казеина	—	150,0	—	—	—
Сахароза	30 000	30 000	30 000	30 000	30 000
pH	5,6—5,8	5,6—5,8	5,6—5,8	5,6—5,8	5,6—5,8

капливаются при реализации проектов подобного рода, была использована реляционная модель баз данных. Выбор программного продукта Microsoft Access 2.0 был обусловлен, во-первых, широким распространением пакета программ Microsoft Office на территории стран СНГ и, во-вторых, наличием лицензионной версии данного пакета программного обеспечения. По мере реализации проекта менялись версии программного продукта, и последняя версия базы данных реализована на основе новейшей версии Microsoft Office 2003 Professional. Основой информационного обеспечения проекта была идея уникальности идентификатора каждого вовлеченного в коллекцию экземпляра растения, будь-то образцы семян либо линии, введенные в культуру *in vitro*.

Результаты исследований и их обсуждение. Цели, которые мы ставили перед собой при создании банка *ex situ*, многозначны и не отличаются от задач, возникающих перед создателем любой коллекции. Они четко обозначены в публикации [7] и включают в себя сбор, идентификацию, описание и номенклатуру образцов; хранение, репродуцирование и изучение материала; создание базы данных и поддержание информационных файлов по каждому образцу из состава коллекции. На базе коллекции проводятся исследования, связанные с отработкой методов введения в асептическую культуру растительного материала

разных видов, а также культивирования клеточных линий и регенерации растений; отработка технологий размножения растительного материала разных видов в условиях *in vitro* и изучение возможности использования клеточных культур как источника новых соединений с биологической активностью.

Работы по созданию в ИКБГИ коллекции дикорастущих видов мировой флоры начались в 1992 г. Исходный материал собирали в ходе научных экспедиций в разные регионы земного шара от Казахстана до Южной Америки, а также в результате сотрудничества с ботаническими учреждениями разных стран. В результате собрано около 17 500 сухих образцов и более 4500 видов в виде семенного материала флоры Европы, Азии, Америки и Африки. На этой основе создан научный гербарий и банк семян, который насчитывает около 5000 образцов, принадлежащих более чем к 1000 родам и 187 семействам. Поддержание коллекции дикорастущих видов в виде семян позволяет сохранять большие популяции, которые обеспечивают полное генетическое разнообразие данного вида [13].

Схема создания и структура банка зародышевой плазмы мировой флоры *ex situ* представлена на рис. 1.

Банк семян и инициация культуры *in vitro*. Банк семян стал основой для создания коллекции клеточных культур. Асептические растения и



Рис. 1. Структура генетического банка ex situ

клеточные (калусные) линии получены в результате проращивания семян в условиях *in vitro* (рис. 2, а, б).

Одной из основных проблем, осложняющих использование семян в качестве исходного материала для создания коллекции клеточных культур, является невозможность прорастить некоторые семена *in vitro* даже несмотря на стратификацию. Как известно, покой семян — часть жизненного цикла многих растений, являющаяся важным приспособительным механизмом сохранения вида [16, 19], в то же время покой семян затрудняет культивирование многих полезных растений, а также осложняет создание коллекций и интродукцию перспективных видов. Несмотря на то, что механизмы покоя семян и его нарушения, приводящего к прорастанию, изучаются уже давно, фундаментальные основы индукции, поддержания и терминирования покоя семян во многом неясны [19]. Так как причины, вызывающие торможение прорастания семян, различны, то различны и условия нарушения покоя. Вместе с тем для большинства видов основными из них являются действие пониженной температуры и влияние регуляторов роста [16].

По нашим данным, в среднем лишь около 40 % семян проросли в стандартных условиях культивирования без использования стратификации. Степень успеха при инициации культуры путем проращивания семян *in vitro* различна для разных видов растений. Как правило, для травянистых растений это удается лучше, чем для древесных [12]. Наши исследования подтверждают это — большинство видов, семена которых проросли *in vitro* без стратифицирующих обработок, являются травянистыми растениями. Семена еще примерно 9 % видов удалось прорастить

при использовании стратификации, направленной на нарушение покоя семян. Для этого применяли инкубацию при пониженных температурах (в частности, для представителей родов *Iris*, *Juno*, *Gladiolus*, *Scilla*, *Primula*, *Malus* и некоторых других) или культивирование на питательных средах, содержащих 1 мг/л ГК₃ (как, например, для *Betula*, *Catalpa*, *Lunaria*, *Caragana*, *Rhamnus*, *Angelica* и др.).

В ряде случаев при проращивании семян формировался только первичный корень, а дальнейшее развитие побега останавливалось. Тем не менее даже фрагменты первичного корня длиной 3–5 мм оказались пригодным материалом для получения асептических линий. В частности, из фрагментов первичного корня были получены соматические эмбриониды и растения *Tulipa kaufmanniana*, *Juno kopetdagensis* и некоторых других видов (рис. 2, в). Тем самым оказалось возможным включить в работу по получению асептических линий даже такие семена, которые не сформировали растений, что в принципе невозможно при использовании традиционных технологий. Применение методов *in vitro* расширяет диапазон исходного материала и дает возможность использовать труднопрорастающие семена, незрелые семена или вегетативный материал, если семян нет в наличии [12].

В связи с невозможностью достичь 100%-ного прорастания семян в условиях *in vitro* число видов в банке клеточных культур меньше, чем число видов этого же рода в банке семян. Например, в банке *in vitro* поддерживается 29 видов рода *Allium* из 70, хранящихся в банке семян; эти же показатели составляют соответственно для *Astragalus* — 10 и 17 видов, для *Betula* — 11 и 25, для *Papaver* — 18 и 23 и т.д. В то же время ввести в культуру *in vitro* из банка семян удалось все виды родов *Amaranthus* (6 видов), *Berberis* (14 видов), *Dianthus* (32 вида), *Digitalis* (11 видов) и др.

Для видов, которые не формируют семян или размножаются в основном вегетативно, сохранение в виде семян невозможно или имеет ограниченное применение. Наиболее общим способом сохранения генетических ресурсов таких видов является хранение в виде растений в полевых генетических банках. При этом возникают такие проблемы, как возможность поражения вредителями или заболеваниями, действие неблагоприятных факторов внешней среды, большие зат-

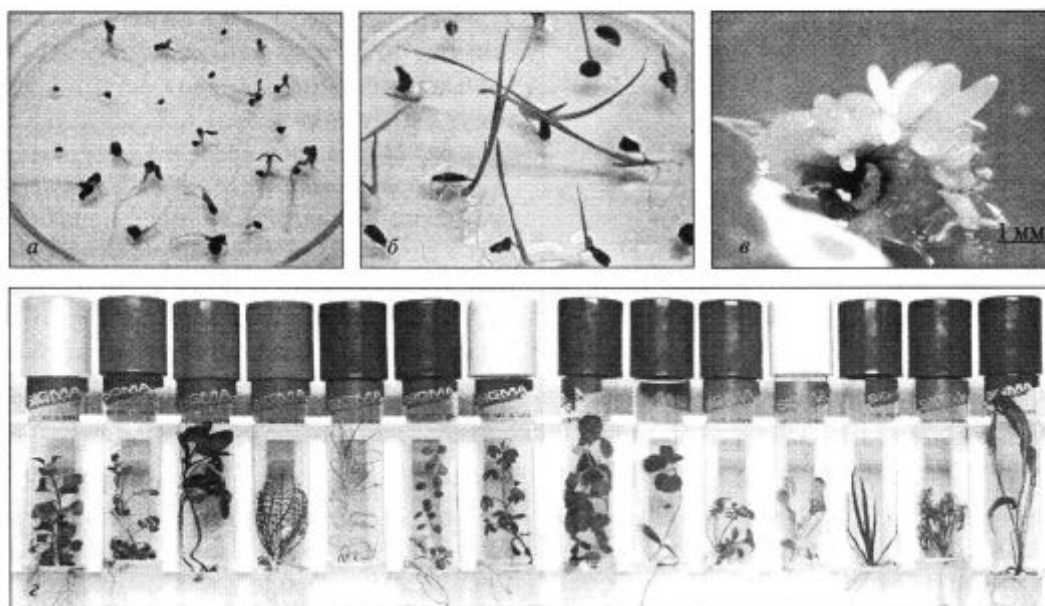


Рис. 2. Инициация культуры *in vitro* и культивирование асептических растений: *a, б* — прорастание семян *Stellaria przewalskii* (Caryophyllaceae) и *Iris sibirica* (Iridaceae); *в* — индукция соматических эмбриоидов в эксплантах первичного корня *Tulipa kaufmanniana* (Liliaceae); *г* — часть коллекции растений (слева направо): *Veronica officinalis* (Scrophulariaceae), *Spiraeanthus schrenkianus* (Rosaceae), *Amaranthus melancholicus* (Amaranthaceae), *Achillea leptophylla* (Compositae), *Plantago cynops* (Plantaginaceae), *Hypericum spruneri* (Clusiaceae), *Spartium junceum* (Leguminosae), *Colutea arborescens* (Leguminosae), *Cersis siliquastrum* (Leguminosae), *Pyrethrum clusii* (Compositae), *Salvia austriaca* (Labiatae), *Sisyrinchium montanum* (Iridaceae), *Chamaemelum mobile* (Compositae), *Echinacea angustifolia* (Compositae)

раты труда и площадей для поддержания коллекции и др. Поддержание растений в культуре *in vitro* представляет собой важный дополнительный вариант сохранения таких видов, дает возможность размножать и хранить растительный материал в асептических условиях, с меньшими затратами труда и на меньшей площади [6].

Коллекция асептических растений. Все виды растений потенциально могут быть размножены через культуру тканей, но далеко не для всех видов на данный момент эти методики разработаны [13]. Определяющим фактором является состав питательных сред. Для культивирования большинства растений, сохраняющихся в коллекции, используются безгормональные среды (MS, B₃) или их модификации. Если такие среды оказываются неэффективными, учитываются опубликованные рекомендации для каждого конкретного вида или, при их отсутствии, оптимальный состав среды подбирается экспериментально. К примеру, для отдельных представителей семейств *Gramineae*, *Iridaceae*, *Ranunculaceae* и некоторых других успешное поддержание культуры асептических растений было возмож-

ным только при добавлении в состав питательных сред 0,1–1 мг/л БАП. Как известно, цитокинины являются эффективными индукторами множественных побегов и быстрого размножения растительного материала *in vitro* [14, 18]. В ряде случаев серьезной проблемой является выделение растениями в среду фенольных соединений, подавляющих рост и вызывающих гибель культуры. Включение в состав сред активированного угля позволило успешно культивировать такие растения, как *Oenothera*, *Papaver*, *Delphinium*. Отдельные представители коллекции асептических растений представлены на рис. 2, г.

Учитывая, что в любом депозитории каждый клон поддерживается в количестве 2–4 особей [12], каждый вид представлен в коллекции как минимум тремя экземплярами. Асептическую культуру растений поддерживают при 20–25 °С и 16-часовом фотопериоде. Субкультивирование проводится каждые 2–4 мес в зависимости от темпов роста и состояния растений каждого конкретного вида. Для снижения трудоемкости процесса и уменьшения количества пересадок можно использовать условия ограниченного рос-

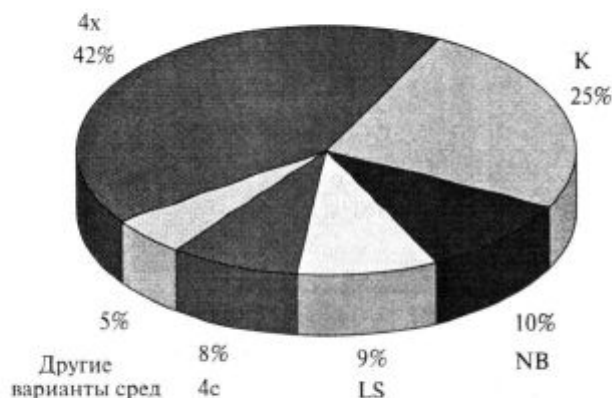


Рис. 3. Соотношение каллусных линий, культивируемых на различных питательных средах

та, такие как пониженные температуры, легкий осмотический стресс, включение ингибиторов роста в состав питательных сред [12]. Мы не применяем этих методов, так как пока не изучено их влияние на стабильность генотипа.

Как известно, при длительном культивировании возникают соматональные варианты, которые, по мнению ряда авторов [7], «лишают метод культурального сохранения коллекций какой-либо перспективы». Вместе с тем технология массового получения растений *in vitro* из верхушечных и пазушных почек (известная как микроклональное размножение) уже давно используется для массовой продукции растительного материала с сохранением всех сортовых признаков. Неоднократно показано, что в результате развития побегов из пазушных почек или индукции соматического эмбриогенеза формируются генетически идентичные растения [14, 20, 21].

Из различных возможных способов получения растений в культуре *in vitro* (культура пазушных и верхушечных почек, регенерация из адвентивных почек, регенерация из дедифференцированных клеток, соматический эмбриогенез и образование множественных побегов из пазушных почек) наиболее простым, естественным и безопасным методом является культура пазушных и верхушечных почек [20]. Именно этот метод используется нами в качестве основного для поддержания культуры растений. Несомненно, что сохранение генетической целостности при размножении *in vitro* абсолютно необходимо для элитных генотипов, которые по тем или иным признакам превосходят исходные ви-

ды. При культивировании дикорастущих растений нет необходимости поддерживать отселектированные генотипы, а возникающие варианты могут быть проявлением природного генетического разнообразия в пределах конкретного вида.

Коллекция клеточных линий. Каллусные ткани большинства видов были индуцированы из зеленых вегетативных органов асептических растений. В случае представителей семейств *Graminae*, *Iridaceae*, *Liliaceae* и некоторых других растений класса однодольных оптимальным эксплантом для инициации каллуса оказались корни проростков, полученных *in vitro*.

Общепринятой практикой является тестирование для каждого нового вида нескольких различных вариантов питательных сред, особенно если в литературе нет однозначных результатов. При создании нашей коллекции состав питательных сред для поддержания каллусных тканей подбирали для каждого конкретного вида растений, стараясь, тем не менее, добиться максимально возможной унификации и упрощения их составов. В результате были подобраны пять основных прописей питательных сред, на которых оказалось возможным культивировать практически всю коллекцию каллусных линий (табл. 1). Для немногих линий (около 5 %) были созданы индивидуальные прописи питательных сред. Соотношение каллусных линий, культивируемых на различных питательных средах, представлено на рис. 3.

Коллекция клеточных линий является исходным материалом для проведения исследований в нескольких направлениях. Информация о содержании важных для человека соединений растительного происхождения ограничена относительно немногими видами, которые человечество уже использует. Почти ничего не известно о химическом составе примерно 250 тысяч дикорастущих и мало используемых видов [22]. С помощью современных научных методов лишь небольшая часть видов растений проанализирована на наличие тех или иных биологически активных соединений. По некоторым оценкам, эта часть составляет от 5 до 10 % всех видов растений, из которых большинство изучено лишь по одному типу биологической активности [23]. Биологическая активность и химический состав экстрактов растений, собранных в природе, непостоянны. Согласно опубликованным данным, более

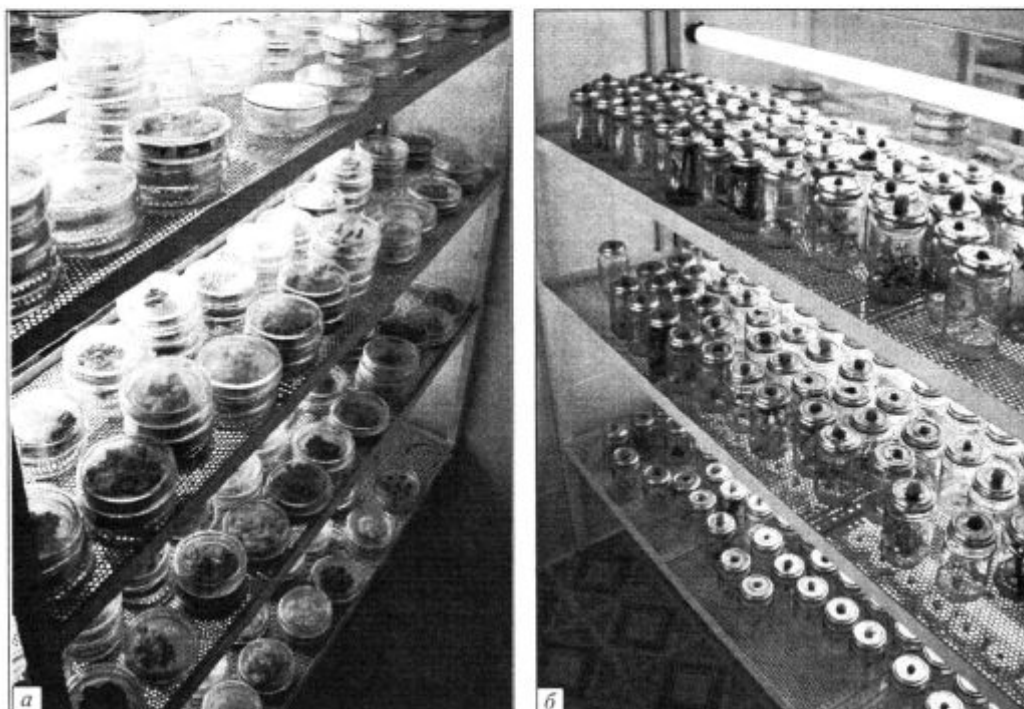


Рис. 4. Стеллажи культуральных комнат с представителями коллекции клеточных линий (а) и асептических растений (б)

40 % растительных экстрактов не воссоздают свою активность при повторном сборе растительного материала и повторной экстракции [24].

В то же время культуры растительных тканей могут быть источником ценных вторичных метаболитов, обладающих биологической активностью [23, 25]. В ряде случаев использование культивируемых клеток и методов элиситации расширяет спектр и увеличивает количество природных соединений с фармакологическим действием [24, 25]. Это дает возможность использовать клеточные линии как сырье для скрининга полученных из них экстрактов на наличие фар-

макологических или агробиологических соединений. В ИКБГИ создана и изучается коллекция экстрактов различных видов растений и соответствующих клеточных линий. К настоящему времени с использованием тестовых систем на основе *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* и *Saccharomyces cerevisiae* нами проанализирована бактерицидная и фунгицидная активность части коллекции экстрактов растений и каллусных линий. Активность каллусных культур, которые выращивались без элиситации, была значительно меньше, чем активность соответствующих экстрактов растений. Обработка каллусных культур метилжасмонатом увеличивала количество экстрактов, которые проявляли заметную активность: в 1,3; 2 и 3 раза для тестовых систем *S. cerevisiae*, *A. tumefaciens* и *E. coli* соответственно. Среди проанализированного материала выявлено четыре экстракта каллусов со значительно более высокой антибактериальной активностью, чем у соответствующих экстрактов растений. Это экстракты каллусных тканей *Acomastylis rossii* (*Rosaceae*), *Rumex pamiricus* (*Polygonaceae*), *Solanum nigrum* (*Solanaceae*) и экстракт обработанного метилжасмонатом каллуса *Digitalis lutea*

Таблица 2
Сравнительная количественная характеристика банка семян и банка клеточных линий *in vitro*

Показатель	Банк семян	Банк <i>in vitro</i>
Общее количество образцов	4165	2164
Семейства	164	107
Роды	1168	715
Виды	3522	1822

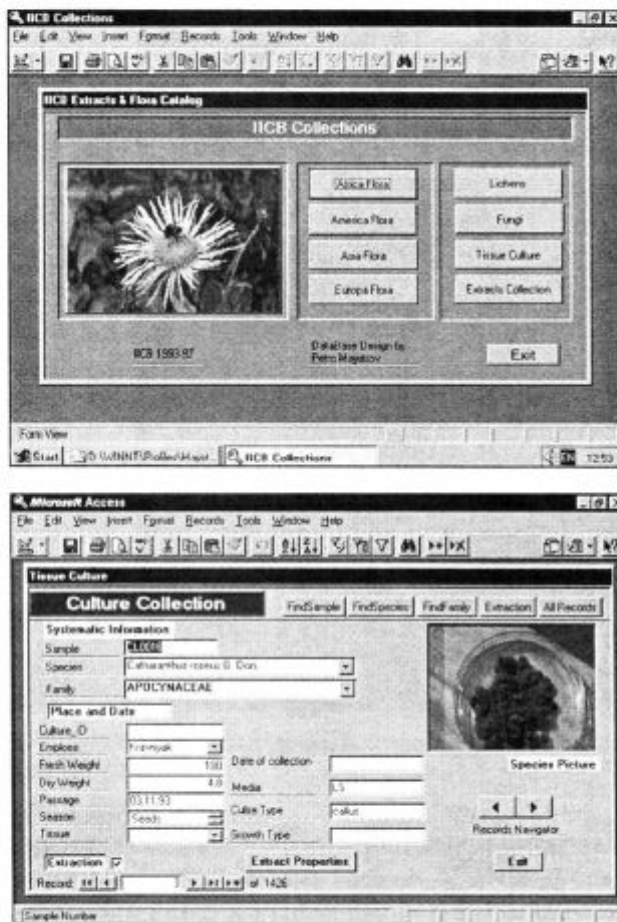


Рис. 5. Скриншоты стартового окна базы данных и одного из окон базы данных по коллекции клеточных линий

(*Scrophulariaceae*). Шансы обнаружить соединения с антимикробной активностью в растительном материале, в том числе культивируемом *in vitro*, расцениваются как высокие [23], и полученные нами данные это подтверждают.

Каллусные культуры являются основой для сравнительного изучения закономерностей регенерации *in vitro* растений разных видов. Создание технологий культивирования и регенерации *in vitro* является необходимой предпосылкой для разработки биотехнологий восстановления численности охраняемых (редких, эндемических и исчезающих) видов растений. В частности, нами были разработаны методы регенерации из каллусных тканей и адаптации к естественным условиям обитания нескольких охраняемых видов класса однодольных, таких как *Iris mandshurica* Meissn. (*Iridaceae*), *Juno kopetdagensis* Vved. (*Iridaceae*) и *Tulipa biflora* Donn. (*Liliaceae*) [26].

С развитием геномики клеточные культуры могут служить также для секвенирования и изучения геномов различных видов. Клеточные культуры в этом случае представляют надежную и стабильную систему поддержания исчезающих растительных геномов планеты.

Сравнительная характеристика численности банка семян и банка клеточных линий *in vitro* приведена в табл. 2. Нужно отметить при этом, что обе коллекции постоянно пополняются новыми образцами.

Общий вид культуральных комнат, в которых сохраняется коллекция асептических растений и клеточных линий, представлен на рис. 4.

Информационное обеспечение проекта. В ходе работы по исследованию и поддержанию генетических ресурсов растений накапливается большое количество экспериментального материала. Чтобы полученные данные можно было сравнивать и использовать, с ними нужно обращаться на стандартизированной основе. Одним из важнейших аспектов работы с масштабными коллекциями является информационная поддержка [1, 13].

В ИКБГИ создана компьютерная база данных, которая содержит детальную информацию обо всех коллекциях, входящих в состав банка зародышевой плазмы. В качестве основного менеджера базы данных был выбран Microsoft Access 2.0. По мере совершенствования этого программного продукта база данных переводилась на новые версии этой программы. На сегодняшний день таковой является Microsoft Access 2003 — новейшая коммерческая версия этого пакета, доступная на рынке программного обеспечения.

Общий объем базы данных составляет 27,5 Мб. Она содержит несколько таблиц, больше сотни запросов, множество форм и макросов. В совокупности в базе данных насчитываются десятки тысяч записей, несущих информацию об основных свойствах каждого экземпляра коллекции — идентификационном номере, таксономическом положении (включая видовое название и семейство), месте и времени сбора материала, времени закладки в банк семян или культуру *in vitro* и т.п. Каждому новому образцу семян, поступающему в коллекцию, а также каждой новой полученной клеточной линии присваивается уникальный идентификационный номер. Использование этикеток и использование бар-кода облегчают компьютеризацию процесса. База данных дает

возможность мгновенно получить информацию относительно любого произвольно выбранного экземпляра коллекции.

К примеру, база данных по коллекции *in vitro* имеет следующую структуру и формат полей: **SAMPLE_ID** — номер экземпляра (текстовое поле); **EXTRACTION** — индикатор химической экстракции данного экземпляра (логическое поле); **CULTURE_ID** — уникальный номер клеточной линии в культуре *in vitro* (текстовое поле); **LAT_NAME** — латинское название растения (текстовое поле); **GENUS** — латинское название рода (текстовое поле); **FAM_NAME** — латинское название семейства (текстовое поле); **FRESH_W_S** — сырая масса каллусной ткани (числовое поле); **DRY_W_S** — сухая масса каллусной ткани (числовое поле); **DATE_INTRD** — дата введения вида в культуру *in vitro* (поле типа дата/время); **LAST_SUBC** — дата последнего пассажа (поле типа дата/время); **EMPLOYEE_ID** — фамилия исполнителя, который занимается поддержанием данного экземпляра в культуре *in vitro* (текстовое поле); **PRIME_EXPL** — тип первичного экспланта (текстовое поле); **MEDIA** — вариант питательной среды для поддержания данной линии (текстовое поле); **TYPE_CLTUR** — тип культивирования (текстовое поле); **GROWTH_TYP** — тип роста культивируемого экземпляра (текстовое поле); **NOTES** — поле для особых заметок. Таким образом, использование перечисленных полей в данной таблице дает возможность сохранить информацию об экземплярах коллекции в культуре *in vitro*. Базы данных по коллекции семян, растительных экстрактов и другие построены по аналогичному принципу. На рис. 5 представлены некоторые скриншоты окон базы данных по культуре *in vitro*.

Выводы. Несмотря на ряд очевидных преимуществ, методы биотехнологии пока не заняли должного места в программах по сохранению биоразнообразия растений. В основном используется система поддержания асептических растений *in vitro* для сохранения материала и культура меристем для элиминации вирусов. Система хранения семян более проста, чем поддержание растений *in vitro*. Этот метод считается более подходящим для базовых коллекций различных видов растений, особенно дикорастущих, так как в большей степени сохраняет генетическое разнообразие вида [12]. Использование системы

in vitro имеет целый ряд преимуществ по сравнению с традиционными методами поддержания коллекций растений. Среди них — экономия земельных площадей, независимость от климатических условий, асептические условия хранения материала, возможность использовать минимальные экспланты для создания клеточной линии и размножить материал, который трудно размножается обычными методами, а также возможность длительного хранения и др. [6, 12].

За последние десять лет исследовательская активность, направленная на консервацию растительных ресурсов *in vitro*, возросла во всем мире. В то же время существует целый ряд проблемных видов, для которых не разработаны методы сохранения *in vitro*. Это является одной из причин того, что возможность рутинного применения методов культуры тканей в настоящее время сводится к ограниченному числу видов, в основном культурных [6]. До сих пор не уделялось должного внимания дикорастущим, в том числе сорным и мало используемым видам. В связи с этим совершенно справедливой представляется точка зрения о важности сохранения биоразнообразия мировой флоры в целом, вне зависимости от его утилитарной ценности на сегодняшний день [7].

Одним из результатов проведенной нами работы по созданию коллекции зародышевой плазмы *ex situ* является полученный опыт культивирования *in vitro* дикорастущих видов растений. Для многих из них подобного рода информация в мировой научной литературе отсутствует либо является противоречивой или неполной. Мы рассматриваем созданную коллекцию как основу для проведения широкого спектра биотехнологических исследований. Среди них, прежде всего, разработка технологий сохранения *in vitro* видов, нуждающихся в охране; поиск в культивируемом материале биологически активных соединений. Кроме того, при наличии современных методов переноса генетической информации дикорастущие виды могут использоваться как доноры хозяйственно ценных признаков для родственных культурных растений. Признается несомненное значение использования генетических коллекций для образовательных целей [7]. Созданный в ИКБГИ генетический банк уже несколько лет используется как «наглядное пособие» для студентов в учебном курсе по основам

биотехнологии растений. Созданный банк *ex situ* и исследования, которые ведутся на его основе, являются вкладом в разработку для разных видов растений надежных, безопасных и полезных технологий с целью их интеграции в программы, направленные на сохранение и использование биоразнообразия мировой флоры.

Работа проведена в ходе выполнения проекта № 6467601 «Скрининг ботанических и микробиологических образцов, собранных в странах СНГ, с целью выявления соединений, имеющих фармацевтическую и агрохимическую активность» программы IPR Департамента энергетики США и проекта «Получение антимикробных, фунгицидных и противоопухолевых веществ растительного происхождения с использованием коллекции клеточных линий и растений мировой флоры», который выполняется в рамках комплексной программы НАН Украины «Новітні медико-біологічні проблеми та оточуюче середовище людини».

SUMMARY. *Ex situ* germplasm bank of plant species of world flora has been created at the Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine as a result of investigations in the fields of botany and plant biotechnology. At present the bank contains more than 4000 samples in seed bank and more than 2000 cell lines in *in vitro* bank. The germplasm bank which has been put on the List of scientific objects of national property of Ukraine is the basis of elaboration of biotechnological methods of plant biodiversity preservation and of plant material screening for biologically active substances.

РЕЗЮМЕ. Генетичний банк представників світової флори *ex situ*, який містить колекцію насіння і колекцію клітинних культур *in vitro*, створено в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України на основі поєднання досліджень в галузі класичної ботаніки і біотехнології рослин. На цей час банк нараховує понад 4000 зразків в банку насіння і понад 2000 клітинних ліній в банку *in vitro*. Створений генетичний банк, який внесено до Переліку об'єктів, що складають національне наукове надбання України, є базою для розробки біотехнологічних методів збереження біорізноманіття світової флори і пошуку в рослинному матеріалі, що зберігається, сполук з біологічною активністю.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuckuck H., Kobabe G., Wenzel G. Safeguarding and utilization of natural genetic diversity // *Fundamentals of plant breeding* (With cooperation of D. Boringer, W. Hondelmann, V. Stoy, T. Tatlioglu). — Springer-Verlag, 1991. — P. 220—230.
2. Villalobos V.M., Ferreira P., Mora A. The use of biotechnology in the conservation of tropical germplasm // *Biotechnol. Adv.* — 1991. — 9, № 2. — P. 197—215.
3. Hammer K., Arrowsmith N., Gladis T. Agrobiodiversity with emphasis on plant genetic resources // *Naturwissenschaften.* — 2003. — 90, № 6. — P. 241—250.
4. Ekiert H. Medicinal plant biotechnology: the Apiaceae family as the example of rapid development // *Pharmazie.* — 2000. — 55, № 8. — P. 561—567.
5. Rout G.R., Samantaray S., Das P. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants // *Biotechnol. Adv.* — 2000. — 18, № 2. — P. 91—120.
6. Engelmann F. In vitro conservation research activities at the International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) // *Plant Tissue Culture and Biotechnology.* — 1997. — 3, № 1. — P. 46—52.
7. Коваль С.Ф., Коваль В.С., Тымчук С.М., Богуславский Р.Л. Генетические коллекции: проблемы формирования, сохранения и использования // *Цитология и генетика.* — 2003. — 37, № 4. — С. 46—53.
8. Pardey F.G., Koo B., Wright B.D., Van Dusen M.E., Skovmand B., Taba S. Costing the conservation of genetic resources: CIMMYT's *ex situ* maize and wheat collection // *Crop Sci.* — 2001. — 41. — P. 1286—1299.
9. Morris J.B., Greene S.L. Defining a multiple-use germplasm collection for the genus *Trifolium* // *Crop Sci.* — 2001. — 41. — P. 893—901.
10. Feijoo M.C., Iglasias I. Multiplication of an undangered plant: *Gentiana lutea* L. subsp. *Aurantiaca* Lainz, using *in vitro* culture // *Plant Tissue Cult. and Biotechnol.* — 1998. — 4, № 2. — P. 87—94.
11. Sediva J. Using the methods *in vitro* for preservation of some endangered species from families *Ranunculaceae*, *Thymelaeaceae* and *Liliaceae* in the Czech Republic // *Proc. of the 9th Int. Conf. of Horticulture, Lednice (Czech Republic), Sept. 3—6, 2001.* — 2. — P. 383—385.
12. Towill L.E. Biotechnology and germplasm preservation // *Plant Breed. Rev.* — 1989. — 7. — P. 159—182.
13. Westwood M.N. Maintenance and storage: clonal germplasm // *Plant Breed. Rev.* — 1989. — 7. — P. 111—128.
14. Dodds J.H., Roberts L.W. Experiments in plant tissue culture. — Cambridge: Univ. press, 1995.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* — 1962. — 15. — P. 473—497.
16. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. — Л.: Наука, 1985. — 347 с.
17. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell. Res.* — 1968. — 50. — P. 151—158.
18. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. — К.: Наук. думка, 1992. — 228 с.
19. Li B., Foley M.E. Genetic and molecular control of seed dormancy // *Trends Plant Sci.* — 1997. — 2, № 10. — P. 384—389.
20. Rani V., Raina S.N. Genetic fidelity of organized meristem-

- derived micropropagated plants: a critical reappraisal // *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.* — 2000. — **36**. — P. 319–330.
21. *Honda H., Liu C., Kobayashi T.* Large-scale plant micropropagation // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* — 2001. — **72**. — P. 157–182.
 22. *Bell E.A.* Mankind and plants: we need to conserve biodiversity // *Parasitology.* — 1993. — **106**, Suppl. S. — P. 47–53.
 23. *Schripsema J., Fung S.Y., Verpoorte R.* Screening of plant cell cultures for new industrially interesting compounds // *Plant cell culture secondary metabolism* / Eds F. Di Cosmo & M. Misawa. — CRC Press, 1996. — P. 1–10.
 24. *Poulev A., O'Neal J.M., Logendra S., Pouleva R.B., Timeva V., Garvey A.S., Gleba D., Jenkins I.S., Halpern B., Kneer R., Cragg G.M., Raskin I.* Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery // *J. Med. Chem.* — 2003. — **46**. — P. 2542–2547.
 25. *Schlatmann J.E., ten Hoopen H.J.G., Heijnen J.J.* Large-scale production of secondary metabolites by plant cell cultures // *Plant cell culture secondary metabolism* / Eds F. DiCosmo & M. Misawa. — CRC Press, 1996. — P. 11–52.
 26. *Белокурова В.Б., Сикура А.Й., Сикура Й.Й., Кучук Н.В.* Разработка биотехнологических методов для восстановления численности некоторых охраняемых видов класса однодольных // *Интродукция растений.* — 2004. — № 3. — С. 17–23.

Поступила 23.11.04