



Проблемы сохранения биологического разнообразия
и использования биологических ресурсов
7-9 октября 2015, Минск, Беларусь



Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов

Материалы III Международной научно-практической конференции,
посвященной 110-летию со дня рождения академика Н.В. Смольского



Часть
1

Часть 1

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Центральный ботанический сад
Научно-практический центр по биоресурсам
Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича
Институт леса



Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов

Материалы III Международной конференции,
посвященной 110-летию со дня рождения академика Н.В. Смольского
(7–9 октября 2015 г., Минск, Беларусь)

**В двух частях
Часть 1**

**Секция 1. Ресурсы и биоразнообразие растительного мира:
современное состояние, воспроизводство, охрана
и устойчивое использование**

**Секция 2. Современные направления изучения
ботанических коллекций для сохранения
и рационального использования
биоразнообразия растительного мира**

Минск
«Конфидо»
2015

УДК 502.174:574.1(082)
ББК 20.18я43
П78

Редакционная коллегия:

д.б.н., чл.-кор. НАН Беларуси В.В. Титок (ответственный редактор),
д.б.н. Е.И. Анисимова,
к.б.н. Б.Ю. Аношенко,
к.б.н. Д.Б. Беломесецева,
к.б.н. П.Н. Белый,
д.б.н. Е.И. Бычкова,
к.б.н. Т.В. Волкова,
к.б.н. Л.В. Гончарова,
д.б.н. С.А. Дмитриева,
к.б.н. Е.Я. Куликова,
к.б.н. А.В. Пугачевский,
д.б.н., чл.-кор. НАН Беларуси В.П. Семенченко,
к.б.н. В.А. Цинкевич

Материалы печатаются в авторской редакции.
Иллюстрации предоставлены авторами публикаций.

П78 **Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов:** материалы III Международной научно-практической конференции, посвященной 110-летию со дня рождения академика Н.В. Смольского. (7–9 октября 2015, Минск, Беларусь). В 2 ч. Ч. 1 / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]; редкол.: В.В. Титок [и др.]. – Минск: Конфидо, 2015. – 514 с.

ISBN 978-985-6777-74-8.

В сборнике представлены материалы III Международной научно-практической конференции «Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов», посвященной 110-летию со дня рождения академика Н.В. Смольского. Часть 1: секция 1 «Ресурсы и биоразнообразие растительного мира: современное состояние, воспроизводство, охрана и устойчивое использование» и секция 2 «Современные направления изучения ботанических коллекций для сохранения и рационального использования биоразнообразия растительного мира».

УДК 502.174:574.1(082)
ББК 20.18я43

ISBN 978-985-6777-74-8

© ГНУ «Центральный ботанический сад
Национальной академии наук Беларуси», 2015
© Оформление. ЗАО «Конфидо», 2015

Асептические коллекции и банк ДНК редких растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси

Спиридович Е.В., Власова А.Б., Фоменко Т.И., Козлова О.Н., Вайновская И.Ф.,
Юхимук А.Н., Кузьменкова С.М., Решетников В.Н.

*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь
E.Spiridovich@cbg.org.by*

Резюме. Созданы коллекции *in vitro* редких и эндемичных видов растений дикорастущей флоры Беларуси, России, Кыргызстана на основе природных источников и существующих коллекций *in vitro* стран ЕвразЭС. Коллекция создана для сохранения биоразнообразия, реинтродукции и разработки подходов промышленного использования. Разработаны методы оценки параметров генетического разнообразия природных популяций для включения в коллекцию *in vitro*. Проводится

подбор сред для культивирования и депонирования редких и эндемичных видов растений, в том числе лекарственных. Данные о растениях вносятся в информационно-поисковую систему Hortus Botanicus Centralis – Info.

Summary. Spiridovich E.V., Vlasava A.B., Fomenko T.V., Kozlova O.N., Vaynovskaya I.F., Ukhimuk, A.N., Kuzmenkova S.N., Reshetnikov V.N. **Conservation of rare plants in the aseptic collection and DNA bank of the Central Botanical Gardens of NAS of Belarus.** In vitro collection of rare and endemic plant species was created, it is based on natural sources and existing *in vitro* collections of the countries of Eurasian Economic Community. Biotechnological collections are created for ecological purposes, to store and reintroduce rare and endangered plant species and develop approaches for industrial use. The methods of estimation of parameters of genetic diversity of natural populations for *in vitro* collections were developed. The assortment of culture media, and the deposit of rare and endemic species of plants, including medicinal were held. Data about the plants are in the information research system Hortus Botanicus Centralis – Info.

В настоящее время весьма актуальна проблема сохранения биоразнообразия растений из-за быстрого уменьшения ареалов распространения многих дикорастущих видов в связи с активной хозяйственной деятельностью человека. Конвенция о биологическом разнообразии (КБР) призывает страны содействовать обмену информацией в области сохранения и устойчивого использования биологических ресурсов. Использование методов культуры ткани является оптимальным решением задачи как для размножения видов с затрудненным размножением *in situ* и *ex situ*, так и при массовом производстве ценных генотипов растений из коллекций ботанических садов [1]. Сохранение генофонда в культуре *in vitro* позволяет поддерживать генетические коллекции растений без изменения их наследственной природы.

В отделе биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси создана и постоянно расширяется коллекция асептических культур. Коллекция включена в Государственный реестр ботанических коллекций в 2005 году (свидетельство Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды от 2 августа 2005 г. № 29). В коллекции представлено 200 таксонов из 20 семейств покрытосеменных растений. В основе методических подходов пополнения и изучения коллекций лежит принцип максимального охвата генетического разнообразия, включая дикорастущие виды, интродуцированные растения, а также коллекционный фонд растений, культивируемых *in vitro* [2–4]. Объекты исследований для создания коллекций редких и эндемичных видов выбраны в соответствии со следующими критериями:

- 1) принадлежность видов к одной из категорий редкости, принятых в Красных книгах или эндемизм (распространение только на определенной территории);
- 2) практическая ценность видов (декоративность, лекарственная ценность, значимость для селекции и др.);
- 3) затруднения в размножении традиционными методами.

В 2014 году в рамках проекта межгосударственной целевой программы Евразийского экономического сообщества «Инновационные биотехнологии» создана коллекция *in vitro* редких и эндемичных видов растений дикорастущей флоры Беларуси, России, Кыргызстана на основе природных источников и существующих коллекций *in vitro* стран ЕвразЭС с целью сохранения генофонда и биоразнообразия, реинтродукции и разработки подходов их промышленного использования для получения биотехнологического растительного сырья. Разработка общей методологии комплексного изучения вопросов сохранения *in vitro* и практического использования эндемиков и редких видов растений, как компонента Национальной стратегии сохранения биоразнообразия растений в Беларуси, России, Казахстане и других странах, актуальна для всех. В 2002 году принята Глобальная стратегия сохранения растений, основная целью которой – остановить продолжающийся процесс утраты биоразнообразия растений. Например, флора Беларуси включает около 12 тыс. видов, из них около 2,1 тыс. видов высших и более 9 тыс. низших растений (водоросли, лишайники) и грибов. За последнее столетие на территории Беларуси исчезло около 70 аборигенных видов дикорастущих растений [5].

С целью сбора растительного материала для пополнения коллекции регулярно осуществляются экспедиции по территории Беларуси. Также проводится генетический мониторинг исследуемых популяций. В настоящее время он осуществлен для следующих

локальных популяций редких растений, занесенных в Красную книгу Республики Беларусь: чистоуст величавый (*Osmunda regalis* L.); многоножка обыкновенная (*Polypodium vulgare* L.); сальвиния плавающая (*Salvinia natans* (L.) All.); гроздовник многораздельный (*Botrychium multifidum* (S.G. Gmel.) Rupr.), костенец черный (*Asplenium adiantum-nigrum* L.), *Dactylorhiza ochroleuca* (Wustn. ex Boll.) Holub; профилактическая охрана: страусник обыкновенный (*Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod.); костенец волосовидный (*Asplenium trichomanes* L.); костенец постенный (*Asplenium ruta-muraria* L.), *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo, *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo. [6].

В 2012–2014 гг. были организованы совместные экспедиции с БИН имени Комарова (РФ) по сбору семян редких растений семейства Орхидные (10 видов из 5 локальных популяций) на территории Мядельского, Браславского, Глубокского и Минского районов с целью пополнения коллекции асептических культур. Для некоторых редких видов орхидных были указаны новые точки произрастания. В частности: пололепестник зеленый (*Coeloglossum viride* (L.) Hartm.) – Национальный парк «Нарочанский»; венерин башмачок настоящий (*Cypripedium calceolus* L.) – гидрологический заказник «Сервечь», хаммарбия болотная (*Hammarbya paludosa* (L.) Kuntze) – Березинский биосферный заповедник.

Собранные в экспедициях образцы в дальнейшем могут быть использованы для сохранения генофонда в генетических банках при обеспечении их эффективного средне- и долгосрочного хранения (в том числе в криобанке), создания *ex situ* коллекций редких растений в ботанических садах, а также использования для восстановления *in situ* популяций. В связи с этим целесообразно проводить оценку параметров генетического разнообразия исходного и сохраняемого (воспроизводимого) материалов [7, 8]. После генетического мониторинга популяций организуется сбор семян или частей растений для пополнения коллекции *in vitro* редких и эндемичных видов растений из природных источников Беларуси, России и Кыргызстана с описанием образцов по системе EURISCO и пополнением банка ДНК [9, 10].

В банк ДНК попадают образцы хозяйственно-ценных, а также редких и охраняемых растений. Банк призван решить задачи в области сохранения и изучения биоразнообразия флоры с использованием современных молекулярных методов. Препараты ДНК необходимо сохранять в строго контролируемых условиях (минус 80 °С). К препаратам ДНК для длительного хранения предъявляются повышенные требования по качеству: препарат ДНК должен быть высокомолекулярным, неповрежденным, обладать определенной концентрацией и чистотой, не содержать примесей РНК, белков, ДНКаз, ингибиторов активности Таq полимеразы, чтобы обеспечить возможность его использования в дальнейших анализах (секвенирование, генотипирование различными маркерными системами), а также для обмена информацией и ДНК с различными научными центрами мира в области сохранения и изучения биоразнообразия. Таким образом удастся сохранить редкие и ценные генотипы [11–13].

Пополнение происходит также и за счет обмена материалом. Так, в состав коллекции сегодня включены образцы из коллекций России, а именно, уникальной коллекции Волгоградского регионального ботанического сада: *Eremogone koriniana* (Fisch. ex Fenzl) Ikonn., *Vincetoxicum intermedium* Taliev, *Artemisia hololeuca* M. Bieb. ex Besser, *Lychnis chalconica* L., *Hedysarum cretaceum* Fisch., *Dioscorea caucasica* Lipsky, *Dioscorea nipponica* Makino, *Lilium caucasicum* Misc. ex Grossh.; образцы из Центрального сибирского ботанического сада СО РАН: *Lilium distichum* Nakai., *Lilium cernuum* Kom., *Lilium pumilum* Delile, *Rhododendron dauricum* L. и т. д. Коллекция ДНК пополнена более чем 60 образцами исторически недоступных коммерческих сортов пиона молочнокветкового (*Paeonia lactiflora* Pall.) из ботанического сада Матэй и дендрария Николз мичиганского университета, США (The University of Michigan Matthaei Botanical Gardens and Nichols Arboretum), а также глобально исчезающих видов рода пион (*Paeonia* L.) В табл. 1 приведен генетический паспорт образца коллекции ДНК за номером 264861/24.2 *Paeonia daurica* subsp. *mlokozewitschii* (Lomakin) D.Y. Hong, разработанный и хранящийся в отделе биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси для целей оценки родственности генотипов рода *Paeonia*, а также оценки параметров генетического разнообразия *ex situ* популяций.

Таблица 1. Генетический паспорт пиона_Млокосевича
(*Paeonia daurica* subsp. *Mlokosewitschii* (Lomakin) D.Y. Hong)

Номер	Генотип	Маркер			
		Me05Em01	Me05Em10	Me07Em10	Me07Em01
264861/24.2	<i>Paeonia daurica</i> subsp. <i>mlokosewitschii</i> (Lomakin) D.Y. Hong	Me05Em01 ¹⁹⁰⁸ Me05Em01 ⁷³⁰ Me05Em01 ⁴⁶⁴ Me05Em01 ⁴¹⁰ Me05Em01 ³⁴⁵ Me05Em01 ²⁸³ Me05Em01 ²⁵¹ Me05Em01 ¹⁰⁹	Me05Em10 ⁸⁶⁹ Me05Em10 ⁷⁴⁸ Me05Em10 ⁴⁸⁵ Me05Em10 ³⁴¹ Me05Em10 ²⁹⁶ Me05Em10 ¹⁹⁹	Me07Em10 ⁵⁷⁰ Me07Em10 ⁵⁵⁷ Me07Em10 ⁵¹⁰ Me07Em10 ⁴³¹ Me07Em10 ³⁷¹ Me07Em10 ³⁴² Me07Em10 ²⁹² Me07Em10 ²⁶⁴ Me07Em10 ²⁰⁰ Me07Em10 ¹⁶⁶ Me07Em10 ¹⁵⁰	Me07Em01 ¹¹⁶⁸ Me07Em01 ⁵²⁵ Me07Em01 ³⁵⁶ Me07Em01 ³⁰⁸ Me07Em01 ²³⁸

Полученные по обмену асептические культуры редких и исчезающих видов культивируются в климатических камерах при следующем режиме: температура (25±2)°C, освещенность 3000 лк, фотопериод 16 ч. Основные среды для культивирования *E. koriniana*, *V. intermedium*, *A. hololeuca*, *Drósera rotundifolia*, *L. chalconica*, *H. cretaceum* – среда MS без регуляторов роста или ½MS с добавлением 0,5 мг/л кинетина и 0,1 мг/л НУК. Для культивирования *Lil. caucasicum*, *Lil. distichum*, *Lil. cernuum*, *Lil. pumilum*, *D. caucasica* в качестве основной среды используется MS с добавлением 1мг/л активированного угля. Для размножения используется как безгормональная среда MS, так и с добавлением регуляторов роста 0,5–1,0 мг/л БАП и 0,1–0,5 мг/л НУК. Несмотря на общую концепцию культуры растений *in vitro*, культивирование каждого конкретного генотипа предполагает разработку отдельных модификаций, что особенно касается эндемиков, произрастающих на меловых почвах, а также достаточно автономно от общей группы стоит культивирование орхидных.

В ЦБС НАН Беларуси создана информационно-поисковая система Hortus Botanicus Centralis – Info (№ ГР 20053449 от 14.11.2005) «Ботанические коллекции Беларуси», она доступна в сети Интернет (<http://hbc.bas-net.by>). В проекте используются оригинальные описания образцов коллекций, которые содержат адресную информацию, данные о кураторах, списки образцов коллекций и описания более 7000 видов природной и культурной флоры Беларуси. Полученные данные по ДНК-типированию образцов хозяйственно-ценных коллекций включены в отдельный раздел «Молекулярно-генетические паспорта», на базе асептической коллекции создан раздел «Коллекции *in vitro*». Они служат источником данных для разделов портала Совета ботанических садов России, Беларуси и Казахстана (<http://hortusbotanicus.ru>), что дает перспективу для расширения сотрудничества и информационного обмена в целях сохранения биоразнообразия растений. На основе современных молекулярно-генетических и биотехнологических методов создана комплексная научно обоснованная схема поддержания, сохранения и изучения образцов в коллекции *in vitro* и ДНК-банке ЦБС НАН Беларуси, которые являются частью национального и глобального биологического разнообразия, основой проведения широкого спектра научных исследований, реализации образовательных программ (рис. 1).

Постоянно проводится обмен опытом при создании и развитии коллекций культур растительных клеток, меристем, стерильных растений *in vitro*, редких и эндемичных видов растений, в том числе при их культивировании, депонирование при пониженных температурах и криосохранение в ИФР РАН. Организуются школы и семинары, стажировки по методам получения характеристики культур клеток, органов, тканей и растений *in vitro* редких и эндемичных видов, а также по вопросам создания общих для ЕврАзЭС баз данных по данным коллекциям. Все это обеспечит согласованное взаимодействие специалистов разных стран с учетом национальных законодательств и ведения Красных книг.

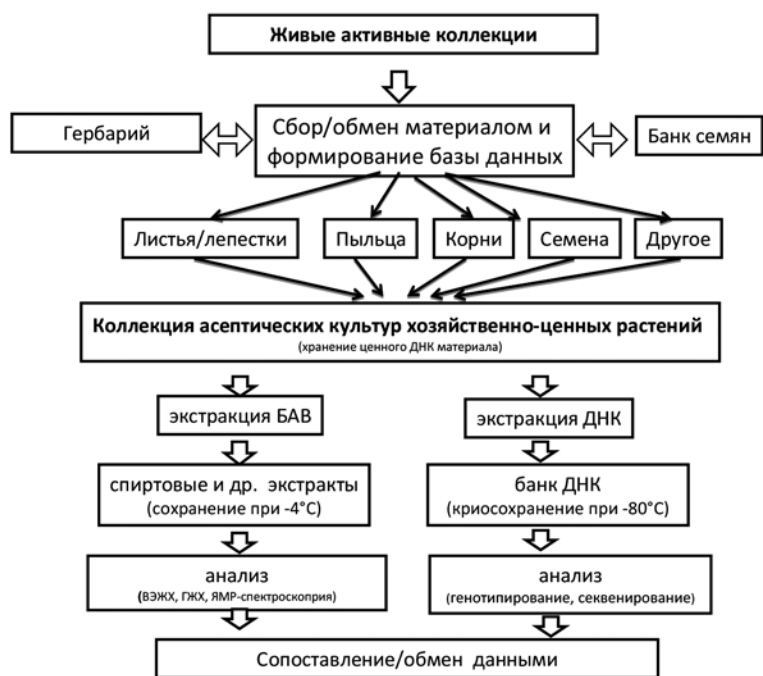


Рис. 1. Комплексная научно обоснованная схема поддержания, сохранения и изучения образцов в коллекции *in vitro* и ДНК-банке ЦБС НАН Беларуси

Список литературы

1. Сохранение растений в генетических банках *in vitro*: преимущества и недостатки / Н.А. Мамаева [и др.] // Бюллетень ГБС. – 2008. – Вып. 194. – С. 141–149.
2. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры / В.Б. Белокурова [и др.] // Цитология и генетика. – 2005. – № 1. – С. 41–51.
3. Решетников, В.Н. Научные и практические аспекты развития биотехнологии растений в Республике Беларусь / В.Н. Решетников, Е.В. Спиридович // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2012. – Т. 7, ч. 1. – С. 57–71.
4. Сохранение биологического разнообразия растений в культуре ткани *in vitro* и его практическое использование / Т.И. Фоменко [и др.] // Центральный ботанический сад НАН Беларуси: сохранение, изучение и использование биоразнообразия мировой флоры; под ред. В.В. Титка, В.Н. Решетникова. – Минск: Беларус. навука, 2012. – Гл. 14. – С. 265–276, 336–338.
5. Красная книга Республики Беларусь: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / Гл. редкол.: И.М. Кочановский (предс.), М.Е. Никифоров, В.И. Парфенов [и др.]. – 4-е изд. – Минск, 2015. – 448 с.
6. Особенности генетической структуры популяций представителей рода *Dactylorhiza* на территории Республики Беларусь по данным изоферментного анализа / Е.Г. Филиппов [и др.] // Материалы X Междунар. науч.-практ. конф. «Охрана и культивирование орхидей», 1–5 июня 2015 г. – С. 250–255.
7. Shaal, B. Population genetic issues in Ex situ conservation. In: Guerrant, E.O., Havens, K., & Maunder, M. / B. Shaal, W.J. Leverich // Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild. – 2004. – Vol. 3. – P. 267–285.
8. Kramer, A.T. Plant conservation genetics in a changing world / A.T. Kramer, K. Havens // Trends in plant science. – 2009. – 14 (11). – P. 599–607.
9. Мультилокусное ДНК-маркирование (RAPD и ISSR) как основа комплексной оценки популяционно-генетических ресурсов редких видов растений / А.Б. Власова [и др.] // IV Междунар. науч. конф. «Озерные экосистемы: биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды», 12–17 сент. 2011 г. – С. 52–53.
10. Власова, А.Б. Лабораторный регламент на методику генетического мониторинга популяций редких и охраняемых видов растений с использованием молекулярных маркеров (RAPD и ISSR) / А.Б. Власова, А.Н. Юхимук, М.С. Тухфатуллина // ЦБС НАН Беларуси. – Минск, 2012. – 19 с.
11. DNA banking for plant breeding, biotechnology and biodiversity evaluation / R. Trevor [et al.] // J. Plant Res. – 2007. – Vol. 120. – P. 17–29.

12. Karp, A. Molecular Techniques in the Assessment of Botanical Diversity / A. Karp, O. Seberg, M. Buiatti // *Annals of Botany*. – 1996. – Vol. 78. – P. 143–149.
13. Molecular markers and ex situ conservation of the European elms (*Ulmus* spp.) / W.P. Goodall-Copestake [et al.] // *Biological Conservation*. – 2005. – Vol. 122 (4) – P. 537–546.