



CCFBD 2017

The effect of climate change on the flora biodiversity
19-21 September, Baku, Azerbaijan

www.dendrologiya.az e-mail: dendrary@mail.az

**“İqlim dəyişkənliyinin bitki biomüxtəlifliyinə
təsiri”**

Бейнəlxalq elmi konfransı
MƏRUZƏLƏR TOPLUSU

Международная Научная Конференция
«Влияние климатических изменений на
биоразнообразии растений»
СБОРНИК ДОКЛАДОВ

The International Scientific Conference
"The impact of climate change on the plant
biodiversity”
COLLECTION OF LECTURES

AZƏRBAYCAN MİLLİ ELMLƏR AKADEMİYASI
Biologiya və Tibb Elmləri Bölməsi
Dendrologiya İnstitutu

RUSİYA ELMLƏR AKADEMİYASI
MDB Botanika Bağları Cəmiyyəti
N.V.SİSİN adına baş botanika bağı

“İqlim dəyişkənliyinin bitki biomüxtəlifliyinə təsiri”
Beynəlxalq elmi konfransı
Azərbaycan, Bakı, AMEA Dendrologiya İnstitutu
19-21 sentyabr 2017-ci il

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АЗЕРБАЙДЖАНА
Отдел Биологических и Медицинских Наук
Институт Дендрологии

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Совета Ботанических Садов стран СНГ
Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина

Международная Научная Конференция
«Влияние климатических изменений на
биоразнообразие растений»
Азербайджан, Баку, Институт Дендрологии НАНА
19-21 сентября 2017

AZERBAIJAN NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
Department of Biological and Medical Sciences
Institute of Dendrology

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES
The Society of Botanical Gardens of the CIS countries
The Main Botanical Garden named after N.V.Tsitsin

The International Scientific Conference
"The impact of climate change on the plant biodiversity"
Azerbaijan, Baku, Institute of Dendrology of ANAS
19-21 September 2017

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ КОЛЛЕКЦИИ И БАНКИ ДНК РАСТЕНИЙ – ЭФФЕКТИВНЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ В УСЛОВИЯХ КЛИМАТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ

Е. В. Спиридович, В. Н. Решетников

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Коллекции асептической культуры и банк ДНК редких и эндемичных видов растений дикорастущей флоры Беларуси и России созданы с целью сохранения биоразнообразия в условиях климатических изменений, реинтродукции и разработки подходов к промышленному использованию их образцов. Проводится подбор сред для культивирования и депонирования редких и эндемичных видов растений, в том числе лекарственных. Данные о растениях регистрируются в информационно-поисковой системе Hortus Botanicus Centralis – Info.

Ключевые слова: *редкие и эндемичные виды растений, асептические культуры, ДНК-банк, информационные ресурсы, HBC-Info*

PLANT BIOTECHNOLOGICAL COLLECTIONS AND DNA BANK - EFFECTIVE TOOLS FOR BIODIVERSITY CONSERVATION IN THE CONTEXT OF CLIMATE CHANGE

E. V. Spiridovich, V. N. Reshetnikov

The Central Botanical Gardens of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk,
Belarus

In vitro collection of and DNA bank of rare and endemic plant species of wild flora of Belarus and Russia on the basis of natural sources and existing collections in EurAsEC countries were established for the purpose of conservation in the conditions of climate change, reintroduction and development of industrial use. Optimization of nutrient media for the tissue culture propagation and the deposit of rare and endemic plants species including medicinal are carried out. Plant data records are deposited in system ‘Hortus Botanicus Centralis – Info’.

Keywords: *rare and endangered species; aseptic cultures; DNA banking; information retrieval system; HBC-Info*

ВВЕДЕНИЕ:

Из-за быстрого сокращения природных ареалов распространения многих дикорастущих видов растений, обусловленного активной хозяйственной деятельностью человека и глобальным изменением климата, сохранение биоразнообразия растений становится крайне актуальным. Конвенция о биологическом разнообразии (КБР) и Глобальная стратегия сохранения растений (ГССР) призывают страны содействовать консолидации и обмену информацией в области сохранения и устойчивого использования биологических ресурсов.

Оптимальным направлением для разработки стратегий сохранения многих видов является интегрированный научный подход, сочетающий применение биотехнологических приемов для культуры *in vitro*, рациональное управление образцами коллекции с целью эффективного восстановления исчезающих популяций и видов,

использование молекулярно-генетических приемов для документирования и поддержания коллекций, пополнение коллекций и обмен информацией [1–4]. Использование методов культуры *in vitro* является оптимальным решением задачи размножения видов с затрудненным размножением *in situ* и *ex situ*, а также при массовом производстве ценных генотипов растений из коллекций ботанических садов [1, 5–8]. Новацией в данном направлении является создание банка ДНК образцов [9–14]. Растительные ДНК-банки, появившиеся как новые ресурсы с большим потенциалом для характеристики и использования биоразнообразия существующих ботанических банков (коллекции генетических ресурсов *ex situ*, гербарии, банки семян и полевые резерваты), представляют собой важные национальные и международные ресурсы. Методы ведения этих банков хорошо развиты [15]. Банки ДНК – это хранилища образцов ДНК (в изолированном виде или в отдельных частях растений), например, хозяйственно-ценных видов растений и их диких сородичей. Создание банков ДНК является важной составляющей в плане сохранения и устойчивого использования биоразнообразия растительного мира, в том числе при проведении научных исследований, выявления наиболее продуктивных генотипов хозяйственных культур и культур с повышенным адаптивным потенциалом к внешним факторам среды, количественной оценки параметров генетического разнообразия природных и создаваемых *ex situ* популяций, а также коллекций отдельных таксонов, диагностики болезней и контроля заболеваемости растений в коллекциях. ДНК банки являются одним из источников создания Генбанков [11, 12, 16].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Объекты исследования – редкие и эндемичные виды, которые 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. Для ряда видов осуществлялся сбор семян или частей растений для пополнения коллекции *in vitro* и одновременно отбор материала для молекулярно-генетического анализа (как правило, это 2–3 листа с растения, собранные с 5–30 экземпляров растений, в зависимости от численности природной популяции).

Методики по созданию коллекции *in vitro* редких и исчезающих растений включают следующие этапы: 1) определение уже известных или новых популяций редких видов растений для сбора семян; 2) описание численного и возрастного состава популяции, а также геоботаническое описание места произрастания исследуемого вида; 3) определение донорных особей (не менее 30 штук в популяции, генеративные особи), их морфометрическое описание; 4) обозначение донорных растений бирками; 5) сбор семенного материала (семенных коробочек, плодов и т. д.) с растений-доноров по достижении сроков созревания; 6) описание собранных образцов (число плодов в соцветии, степень развития семян, завязываемость плодов в пределах каждого соцветия и т. д.); 7) составление этикеток на все собранные образцы с указанием вида растения-донора, времени и места сбора, географических координат местности (по возможности), а также ФИО коллекторов; 8) хранение семенного материала до момента посева с целью определения его жизнеспособности; 9) введение в культуру *in vitro*; 10) размножение и, по необходимости, укоренение *in vitro*; 11) депонирование образцов (в зависимости от специфики образца используются различные способы); 12) адаптация укорененных растений *ex vitro*.

Протокол создания и долговременного хранения препаратов ДНК для представителей *in vitro* коллекции редких видов природной флоры оптимизировали на основании литературных данных для каждого вида на следующих стадиях: 1) хранение

растительного материала (при глубокой заморозке (-80°C) или высушенного с использованием силикагеля), готового для выделения препаратов ДНК; 2) выделение ДНК СТАВ-методом [17, 18] с модификациями; 3) количественная и качественная оценка препаратов; 4) документирование каждого образца с указанием координат и времени места сбора, по возможности с описанием экологических характеристик обитания, количественных характеристик популяции. Разработка протоколов оценки параметров генетического разнообразия проводилась для каждого изучаемого вида и состояла в обнаружении информативной маркерной системы на внутривидовом уровне.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ:

В отделе биохимии и биотехнологии растений ЦБС поддерживается и постоянно расширяется коллекция асептических культур хозяйственно-полезных растений ЦБС НАН Беларуси (свидетельство Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды № 29 от 2 августа 2005 г.). В ней представлено 242 таксона из более 20 семейств покрытосеменных растений. В 2015 г. из коллекции асептических культур выделена коллекция *in vitro* редких и эндемичных видов растений дикорастущей флоры Беларуси и России. Она создана на основе природных источников и существующих коллекций *in vitro* стран ЕврАзЭС с целью сохранения биоразнообразия растительных ресурсов, реинтродукции и разработки подходов к промышленному использованию ее образцов для получения биотехнологического растительного сырья. В основе разработки коллекции лежит принцип максимального охвата ГР для каждого изучаемого таксона, включая дикорастущие виды, в том числе редкие и исчезающие, редкие таксоны интродуцированных растений [2–4]. Сегодня в состав коллекции *in vitro* редких и эндемичных видов растений Беларуси и России входит 38 образцов 33 видов, относящихся к 22 родам и 15 семействам покрытосеменных растений [19].

С целью сбора материала редких растений из природных популяций для пополнения коллекции сотрудники отдела регулярно участвуют в экспедициях на территории Республики Беларусь. За последние 5 лет исследовано более 30 локальных популяций редких видов растений и собран растительный материал для получения асептических культур и пополнения банка ДНК. Для некоторых редких видов указаны новые точки произрастания на территории Беларуси, в том числе: для *Coeloglossum viride* (L.) Hartm. – Национальный парк «Нарочанский», для *Hammarbya paludosa* (L.) Kuntze – Березинский биосферный заповедник и окрестности г. Ушачи Витебской обл., для *Cypripedium calceolus* L. – гидрологический заказник «Сервечь», для *Ophrys insectifera* L. – Ушачский район Витебской области и др. Некоторые виды попадают в коллекцию в результате акций по спасению их локальных популяций в Беларуси, в том числе из-за критических изменений условий местообитаний. В результате одной из таких акций (после изменений гидрологического режима) по спасению популяции охраняемого вида растений Гроздовника многораздельного (*Botrychium multifidum* (S. G. Gmel.) Rupr.) III категории охраны (VU, уязвимый) сотрудниками Центра мониторинга растительного мира Института экспериментальной ботаники (канд. биол. наук И. П. Вознячук, персональное сообщение) в отдел в апреле 2016 г. передано несколько растений вида. Ведется разработка технологии размножения вида *ex situ* и *in vitro* с целью последующего возвращения (после получения достаточного числа растений) в природные местообитания. Семена цинны широколистной (*Cinna latifolia* (Trev.) Griseb (I категория охраны) собраны в результате осмотра нарушенного обитания вида в июне 2016 г. Полушник озерный (*Isoetes lacustris* L.; IV категория охраны) передан Б. П. Власовым и поддерживается в аквакультуре.

Сегодня общепринято, что при проведении любых манипуляций с природными популяциями целесообразно проводить оценку параметров ГР исходного и сохраняемого

(воспроизводимого) материала. В связи с этим во время экспедиций осуществляли сбор (по возможности) генетически репрезентативного материала с целью поддержания в банке асептической культуры, сохранения, воспроизведения и в дальнейшем возвращения в естественные местообитания. На последнем этапе важно вновь оценить показатели ГР особей, чтобы удостовериться, что не наносится урон генетической структуре естественной популяции.

Банк ДНК в ЦБС был создан для интегрирования с существующими коллекциями: гербарными, банками семян, полевыми коллекциями растений, а также с асептической коллекцией редких видов природной флоры, которые являются национальным достоянием Республики Беларусь. На сегодняшний день ДНК-банк редких и хозяйственно-ценных растений ЦБС состоит из более 100 видов 7 родов 6 семейств [32].

Препараты ДНК для закладки на длительное хранение должны удовлетворять определенным стандартам: препарат ДНК должен быть высокомолекулярным, неповрежденным, определенной концентрации и чистоты, не содержать примесей РНК, белков, ДНКаз, ингибиторов активности Таq полимеразы, чтобы обеспечить возможность их использования в дальнейших исследованиях материала (секвенирование, генотипирование с использованием различных маркерных систем, выяснение филогенетических взаимоотношений между популяциями, разработка регламентов охраны и др.).

В 2014–2017 гг. банк ДНК пополнен более чем 60 образцами исторических недоступных коммерческих сортов пиона молочноцветкового (*Paeonialactiflora* Pall.) из ботанического сада Matthaei Botanical Gardens and Nichols Arboretum Мичиганского Университета (MBGNA, США), а также исчезающих видов рода пион (*Paeonia* L.). В табл. 1 приведен генетический паспорт образца № 264861/24.2 коллекции ДНК *Paeonia daurica* subsp. *mlokosewitschii* (Lomakin) D. Y. Hong, разработанный и хранящийся в отделе биохимии и биотехнологии растений ЦБС с целью оценки родственности генотипов рода *Paeonia*, а также параметров генетического разнообразия *ex situ* популяций видов [27]. Проводится разработка методик введения в культуру и создание *in vitro* коллекции редких представителей рода пион (*Paeonia* L.) с целью их сохранения и размножения.