

УДК 57.086.83:502.75

В.Б. БЕЛОКУРОВА

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії  
НАН України, Київ  
E-mail: lera@iicb.kiev.ua

## МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЙ В СИСТЕМІ ЗАХОДІВ ЗІ ЗБЕРЕЖЕННЯ БІОРІЗНОМАНІТТЯ РОСЛИН



*Розглянуто основні методи збереження генофонду рослин на основі підходів in situ та ex situ. Описано методи біотехнології (культура in vitro, криоконсервація), які застосовуються для створення колекцій генетичного різноманіття рослин, і проаналізовано можливості та обмеження кожного з них.*

© В.Б. БЕЛОКУРОВА, 2010

**Вступ.** Поступове зменшення біорізноманіття рослин є проблемою загальносвітового масштабу. Інтенсивність впливу людської діяльності на довкілля призвела до деградації та фрагментації природних ареалів, що супроводжується втратою видів та зменшенням генетичного різноманіття; глобальні кліматичні зміни також істотно впливають на навколишнє середовище [1–5]. За останні десятиріччя значно еволюціонувало розуміння необхідності охорони навколишнього середовища у взаємодії з цілями сталого розвитку. У 80-х роках ХХ сторіччя сформувалась нова галузь біологічної науки – біологія охорони навколишнього середовища (conservation biology), синтетична, міждисциплінарна наука, основні завдання якої полягають у забезпеченні інтелектуальними та технологічними засобами, що покликані запобігати, мінімізувати та/або відновлювати екологічні втрати, у розробці принципів та методів збереження біологічного різноманіття [5, 6]. Кульмінацією важливих міжнародних ініціатив в цьому напрямі стало прийняття у 1992 р. на конференції ООН по оточуючому середовищу Конвенції про біологічне різноманіття. Серед основних завдань, які постають в зв'язку з необхідністю охорони різноманіття рослинного світу, виділяють вивчення та документування рослинного різноманіття, його збереження, екологічно безпечне використання тощо [7]. Необхідність збереження біорізноманіття традиційно пов'язують з етноботанічним використанням рослин як джерела їжі, медикаментів, волокон, будівельних матеріалів, для задоволення культурних потреб. Крім того, рослини відіграють безпосередню роль у створенні широкого спектра життєво необхідних для людини умов існування (якість повітря, регуляція якості ґрунтів та води, утилізація токсичних відходів тощо) [5, 8].

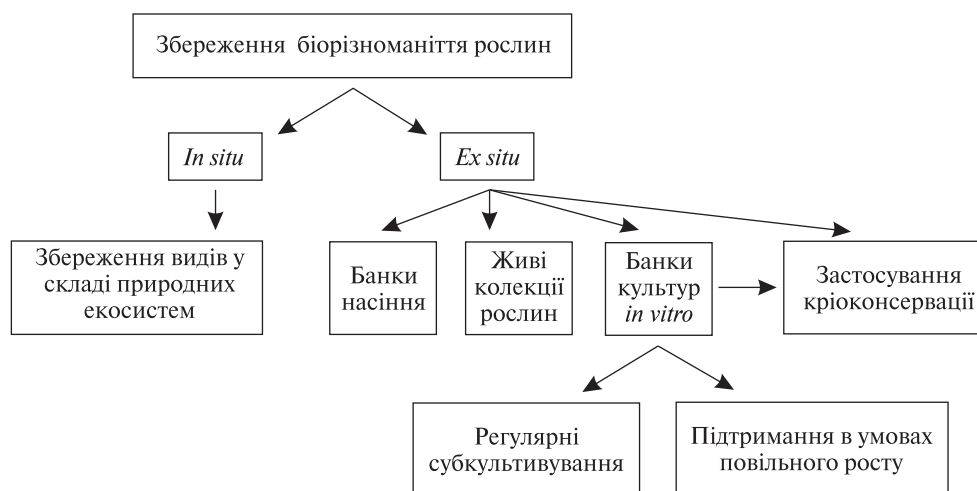
Генетична мінливість рослин, яка потребує збереження, може проявлятися як на рівні виду, так і на рівні різновидів, сортів або місцевих популяцій. Виснаження генетичних ресурсів загрожує генофонду як дикорослих, так і культивованих видів, в тому числі стародавніх місцевих сортів та різновидів, створених в минулому, які являють собою широку вибірку природної мінливості, притаманну виду в цілому. Цей матеріал може бути втрачений, якщо не знаходиться в комерційному використанні. Водночас добре відомим фактом є інтенсивне

використання відносно невеликої кількості сучасних високопродуктивних сортів [1, 5, 9, 10]. Основні недоліки більшості з них – чутливість до захворювань, шкідників, абіотичних факторів, недостатня харчова цінність, неможливість тривалого зберігання плодів тощо, тому потреба в генетичному матеріалі для створення нових якісних сортів не зникає [2, 8, 11, 12].

Генетична основа більшості культурних рослин становить менше 10 % загального генофонду. Найбільшу частину генетичного різноманіття представляють споріднені дикорослі види [3, 9, 11], які завжди використовувались людиною свідомо або несвідомо як джерело генетичного матеріалу для створення і підвищення якості та врожайності культивованих рослин за допомогою традиційних методів селекції. Останнім часом зростає інтерес до використання природного різноманіття рослин як джерела нових алелів для збільшення продуктивності, пристосованості, якості та харчової цінності сільськогосподарських культур, що привертає увагу до необхідності збереження дикорослих родичів сільськогосподарських рослин. Вони мають важливі ознаки (стійкість до захворювань та шкідників, до посухи, засолення та інших абіотичних стресів; ознаки, які дозволяють покращити якість продукції), а сучасні технології полегшують відбір та перенесення таких ознак до сільськогосподарських культур [6, 9, 10, 13]. Існують повідомлення

про успішну інтрогресію алелів дикорослих видів до сільськогосподарських культур, які призвели до значного підвищення врожайності або стійкості до біотичних та абіотичних факторів [9].

Повідомляється, що принаймні 9 тисяч дикорослих видів потребують того або іншого ступеня охорони; більшість з них ростуть в тропічних регіонах [1]. За іншими оцінками, кількість видів, що охороняються, варіює від 8 % в Австралії до 15 % у Сполучених Штатах і 18 % в Європі [14]. Повідомляється також, що завдання Глобальної стратегії збереження рослин передбачає захист 60 % видів світової флори, які знаходяться під загрозою зникнення, і 10 % з них включено до програм відновлення [5]. На даний час в колекціях *ex situ* в світовому масштабі зберігається близько 6 млн зразків, які, однак, належать до обмеженої кількості видів. Близько половини з них – сучасні сорти або селекційні лінії, третина – місцеві старі сорти і лише 15 % – дикорослі споріднені види [3]. Є дані, що в Європі частка дикорослих видів в генетичних банках *ex situ* складає лише 4 %, і більшість дикорослих родичів культурних рослин існують поза будь-якими формами захисту. Головними причинами цього називають пануючий підхід до зберігання з точки зору економічної доцільності та недостатнє розуміння масштабу тих переваг, які можуть бути отримані завдяки збереженню дикорослих видів. В той же час близько 80 % всіх видів, навіть якщо



Основні методи збереження біорізноманіття рослин

розглядати тільки європейську флору, вважаються дикорослими родичами широкого спектра соціально та економічно важливих видів рослин [6].

Розрізняють два основних підходи до збереження рослинного генофонду – збереження *in situ*, тобто в природних умовах існування, та *ex situ* – в банках генів (банках зародкової плазми) [8, 10, 15, 16]. Як видно зі схеми (рисунок), найбільший спектр можливостей надають методи *ex situ*, які дозволяють застосовувати сучасні експериментальні підходи, зокрема, методи біотехнології рослин.

**Збереження *in situ*** – це підтримання виду у складі природної екосистеми, частиною якої він є [4, 17]. Для цього створюються території, що охороняються. Однією з основних переваг використання системи *in situ* є можливість еволюційних змін видів і популяцій, але в той же час просто наявність конкретного виду на території, що охороняється, ще не є запорукою його збереження [7]. Крім того, зберігання *in situ* стає все більш проблематичним через зникнення значної кількості «диких» земельних територій [18]. Тому, хоча збереження екосистем в природних умовах вважається ефективним методом підтримання біологічного різноманіття, суттєвим його доповненням стали технології зберігання біорізноманіття рослин *ex situ*, які розглядаються як необхідні компоненти єдиної глобальної системи.

Під збереженням *ex situ* мається на увазі збір зразків генетичного різноманіття кожного виду та їх зберігання поза умовами природного існування, в яких цей вид еволюціонував. Такий підхід є особливо придатним для зберігання рослин, тому що певні стадії їх життєвого циклу (насіння, спори, пилок) природно адаптовані для підтримання життєздатності протягом тривалих проміжків часу [7]. Консервація *ex situ* розглядається як важливе доповнення до методів збереження *in situ*, а для окремих видів рослин є єдиним способом збереження [4]. Методи *ex situ* дозволяють зберігати окремі зразки генетичного різноманіття популяції впродовж тривалого часу, дозволяючи краще вивчити анатомічні, фізіологічні, біохімічні особливості матеріалу, що зберігається, і надаючи матеріал для використання в програмах селекції та реінтродукції рослин, в системі

освіти тощо [7]. Зберігання *ex situ* може здійснюватись як традиційно (в банках насіння та живих колекціях в умовах інтродукції), так і з використанням технологічно більш складних підходів, таких як культивування *in vitro* та кріоконсервація [5, 7].

**Банки насіння.** На даний час для більшості сільськогосподарських культур розроблено методи зберігання генофонду у колекціях (банках) насіння. Завдяки своїй простоті та економічності щодо технології, інфраструктури та витрат ресурсів такий підхід є одним з найефективніших та розповсюдженіших [5, 7, 17]. Дійсно, цілком реально зберігати велику кількість насіння багатьох різноманітних видів рослин протягом тривалого часу на обмеженій площі і з мінімальним ризиком генетичних змін. Колекції рослинного генофонду почали створюватися з 20-х років ХХ сторіччя, і однією з найбільших та всесвітньо відомих стала колекція насіння, започаткована М.І. Вавіловим [9, 12]. На даний час протоколи збирання та зберігання насіння добре відпрацьовані для багатьох сільськогосподарських видів рослин [19, 20]. Разом з тим зазначається, що існують певні відмінності між консервацією зразків сортів у банках насіння сільськогосподарських видів та консервацією насіння дикорослих видів. В останньому випадку основна увага повинна бути приділена збиранню зразків внутрішньовидового різноманіття, особливо алелів, які кодують корисні ознаки, а також широкого спектра видів, насамперед рідкісних та зникаючих [7]. Підкреслюється, що в останнє десятиріччя технологія зберігання насіння некомерційних дикорослих видів рослин набула значного розвитку [5].

Принципово важливим є питання оптимізації фізіологічного стану насіння, яке зберігається, для забезпечення його життєздатності та можливості проростання впродовж тривалого часу. Фактором, який найбільшою мірою впливає на здатність насіння до тривалого зберігання, є генотип. Насіння більшості видів, які існують в умовах помірного клімату, відносять до звичайного (ортодоксального) типу (*orthodox type*). Таке насіння здатне витримувати без пошкоджень дегідратацію до 5 % і нижче, тому є адаптованим до зберігання при невисокій тем-

пературі і вологості. Насіння «проблемного» типу (recalcitrant) характерне в основному для тропічних та субтропічних видів рослин. Воно може зберігатися тільки у вологому середовищі і при відносно високій температурі; не може бути висушене без пошкодження, проявляє досить низьку природну життєздатність і може проростати протягом досить обмеженого часу (тижні або місяці) [10, 18]. Крім видових генетичних особливостей, до фундаментальних факторів, які впливають на життєздатність насіння при зберіганні, відносять температуру зберігання, рівень вологості та вміст кисню в повітрі [5, 10]. Сучасні методи зберігання засновані на регулюванні співвідношень цих факторів. Вони детально розроблені для насіння різних представників культурних рослин і дещо гірше – для насіння більшості дикорослих видів. Тому рекомендують проводити експериментальні дослідження для кожного конкретного виду, а не обирати загальнометодологічний підхід, особливо в тих випадках, коли мова йде про ендемічну флору [5].

Зразки насіння зберігають в умовах низьких температур. За повідомленнями різних авторів, оптимальні температурні режими знаходяться у межах від  $-15$  до  $-20$  °C [12, 20]; можуть також використовуватись режими від  $0$  °C до  $+4$  °C [12]. Вологість на рівні 5 % вважається оптимальною при зберіганні в герметичних контейнерах. Є дані, що для ряду видів проміжок часу між збиранням насіння та початком його зберігання може бути більш критичним, ніж вважалося раніше, для забезпечення тривалої життєздатності насіння. Вибір способів обробки після збирання насіння може бути різним для різних видів рослин і типів плодів, тому необхідно проводити емпіричні дослідження для створення загальних протоколів збирання насіння з метою його тривалого зберігання [5].

Основні види робіт, які здійснюються при підтриманні банку насіння – це його зберігання, перевірка життєздатності, проведення тестів на здатність до проростання, обробка отриманих даних. Особливо важливим аспектом роботи є періодична перевірка здатності до проростання, зважаючи на те, що в процесі тривалого зберігання насіння поступово втрачає схожість [20].

В той же час значне різноманіття і екологічно вельми специфічні потреби дикорослих видів, включаючи види, споріднені з культурними рослинами, часто утруднюють їх зберігання *ex situ*. Тому проста та ефективна технологія зберігання насіння має певні обмеження і не може бути використана для представників цілого ряду видів рослин, в першу чергу для тих, чиє насіння не витримує тривалого зберігання, або для видів, які не формують життєздатного насіння чи мають низьку насінневу продуктивність, або насіння з низькою схожістю чи таких, що розмножуються в основному вегетативно [16]. Насіння ряду видів, в основному тропічних та субтропічних, належить до типу «recalcitrant» і має обмежену довговічність, що робить неможливим його тривале зберігання [15, 21–23]. До рослин, зберігання яких у вигляді насіння є проблематичним, належать також види з глибоким та важко керованим станом спокою [5]. Зберігання у вигляді насіння є неможливим для сортового матеріалу культурних рослин, наприклад, фруктових та горіхоплідних культур, які є високо гетерозиготними і тому мають підтримуватись методами вегетативного розмноження [11, 12, 24].

Безперечно, для обрання адекватного методу зберігання рослинного матеріалу необхідні знання особливостей біології насіння кожного конкретного виду рослин [7, 25]. У випадках, коли зберігання у вигляді насіння є неможливим або неефективним, варто користуватись методами зберігання рослинного матеріалу у вегетативній формі, хоча технологічно це більш складно та потребує значних витрат матеріальних і трудових ресурсів [11, 15, 22, 26].

**Живі колекції рослин.** Найпростішим з технологічної точки зору та найдавнішим способом збереження рослинного генофонду у вегетативній формі є живі колекції рослин (польові генетичні банки), створені *ex situ*, тобто поза природних ареалів існування [10, 17]. Основу системи збереження біорізноманіття дикорослих видів у складі живих колекцій складають ботанічні сади. Що стосується сільськогосподарських культур, вони можуть зберігатися у спеціальних депозитаріях в польових умовах або в умовах теплиці; при цьому методи збереження рослин, які розмножуються вегетативно, відрізняються від методів збе-

реження рослин, що розмножуються насінням, і є набагато більш затратними [10, 11, 13].

Підтримання рослинного генофонду в живих колекціях пов'язано з рядом проблем. Перш за все така робота потребує великих земельних ділянок та значних затрат праці. Рослини, що вирощуються в польових умовах, можуть бути пошкоджені або знищені шкідниками, захворюваннями або несприятливими погодними умовами. В ізольованих колекціях збільшується ймовірність ауткросинга, який веде до гомозиготності, а у деяких випадках до зниження або повної втрати фертильності. Деякі види рослин не здатні до виживання в умовах інтродукції. Крім того, можливість обміну генофондом при вирощуванні у відкритому ґрунті обмежена через можливий ризик перенесення захворювань [13, 18, 22–24].

Важливими та ефективними методами збереження рослинного різноманіття є використання біотехнологічних підходів, а саме методів культури *in vitro* та кріоконсервації. Зазначається, що біотехнологія надає способи збереження тих видів рослин, які не можуть бути збережені у вигляді насіння, а також у випадках, коли дуже невелика чисельність вихідних батьківських генотипів робить необхідним збереження клональних копій останніх генотипів, що залишилися. Біотехнологія, хоча і не є рутинним підходом у більшості програм по збереженню рослин, може зіграти важливу роль у забезпеченні тривалого захисту генетичного різноманіття, надаючи джерело (інколи єдине) для програм реінтродукції [5].

Застосування біотехнологічних методів сприяє збереженню генетичного різноманіття рослин як прямим, так і непрямим чином. По-перше, методи біотехнології дають можливість зберігати рослинний матеріал у вигляді асептичних культур *in vitro* або із застосуванням кріоконсервації, а в подальшому відновлювати природні популяції за рахунок клонально розмножених рослин. По-друге, особливо якщо мова йде про види, які мають практичну цінність (наприклад, лікарські рослини), асептичні культури можуть бути використані як сировина, що знижує навантаження на природні популяції [23, 27].

**Методи культури *in vitro*.** Застосування цих методів часто є оптимальним рішенням як для

підтримання видів з утрудненим розмноженням *in situ* та *ex situ*, так і при масовому виробництві цінних генотипів рослин з колекцій ботанічних садів. Використання системи *in vitro* для збереження рослинного матеріалу має ряд переваг перед утриманням колекцій живих рослин у відкритому ґрунті. Ці переваги неодноразово обговорювались у відповідній науковій та методичній літературі. Серед них — незалежність від природних та кліматичних умов, відсутність ризику ураження комахами та захворюваннями, можливість розмноження рослин з утрудненим насінневим розмноженням, високий коефіцієнт розмноження, можливість тривалого зберігання рослин, а також оздоровлення від вірусних, бактеріальних та грибкових захворювань, потреба у відносно невеликих площах тощо [10, 11, 13, 15, 16, 18, 22, 23, 28]. Використання культури *in vitro* має особливе значення для видів, що розмножуються вегетативно, або для видів, насіння яких не витримує тривалого зберігання [1, 10, 16].

Важливою особливістю застосування методів *in vitro* є можливість працювати практично з будь-якими експлантами рослин, започатковуючи різні типи асептичних культур з подальшою регенерацією рослин. Технології збереження генофонду рослин *in vitro* можуть бути використані тільки при наявності розроблених методик культивування в асептичних умовах [1], але ефективні відтворювані технології культивування *in vitro* на даний час розроблено для відносно обмеженої кількості видів, хоча це коло постійно розширюється.

Треба також брати до уваги явище генетичної варіабельності при культивуванні *in vitro* (соматоклональна мінливість), що робить необхідним підбір експлантів та умов культивування, в яких її прояв мінімізований. В цілому для тривалого зберігання генофонду рослин найбільш придатні системи, в яких розмноження та підтримання матеріалу базується на розвитку апікальних та пазушних меристем [16, 22, 23, 29].

На успіх роботи зі зберігання рослинного матеріалу біотехнологічними методами впливає ряд факторів. Застосовані технології не повинні викликати незворотних змін або пошкоджень матеріалу і мають забезпечувати можливість повернення до нормального росту та ме-

таболізму з високими кількісними показниками; метод збереження повинен бути надійним та відтворюваним, затрати на застосовану технологію мають бути ефективними і адекватними [29].

В основі технологій збереження рослин *in vitro* лежать методи мікроклонального розмноження з певними модифікаціями [14]. Першим етапом роботи є *введення матеріалу в асептичну культуру*. Насіння або вегетативні органи рослин використовують як експланти [4]. Для збереження клону при роботі з сортовим гетерозиготним матеріалом рослини *in vitro* індують з апікальних і пазушних меристем або бруньок, взятих з вихідних рослин [13]. Для дикорослих видів використання насіння як вихідного матеріалу для розмноження вважається найбільш придатним, тому що дозволяє зберегти широку генетичну базу [14]. Бажано використовувати насіння з якомога більшої кількості природних популяцій для забезпечення більшого генетичного різноманіття [23].

Рослинний матеріал вводять в асептичну культуру з використанням ряду процедур поверхневої стерилізації. За своєю складністю вони можуть варіювати від одностадійних до більш складних обробок і використовувати досить різноманітний спектр хімічних реагентів в залежності від природи рослинної тканини, яка вводиться в культуру. Ускладнити роботу може наявність ендосимбіотичних грибів або бактерій, що містяться в тканинах ряду видів рослин, особливо тропічних, а також фенольних сполук, які синтезуються рослинними тканинами. Цілий ряд технологічних прийомів дозволяє мінімізувати ці проблеми [4]. Методики введення рослинного матеріалу в асептичну культуру мають бути стандартизовані для представників різних таксономічних груп, але в той же час біологічні особливості кожного конкретного виду рослин повинні бути враховані. Для забезпечення достатньо високої відтворюваності результатів треба також максимально стандартизувати умови культивування. Особливо складно взяти до уваги вплив різних факторів і потреби культур різних видів рослин у великих колекціях, які містять представників різних таксономічних груп [12].

Використання методів *in vitro* дозволяє в ряді випадків уникнути проблеми утрудне-

ного проростання насіння певних видів рослин, особливо тих, які мають глибокий спокій або специфічні потреби для розвитку проростків. Це стосується, наприклад, цілого ряду представників родини *Orchidaceae*, які для проростання насіння в природних умовах потребують симбіозу з мікоризними грибами [14, 25].

*Типи асептичних культур*. Наступним кроком після успішної ініціації культури *in vitro* є індукція та мультиплікація пагонів. Для ряду видів, особливо представників деревних рослин, це може бути проблемою. Багато рослинних видів мають свої вельми специфічні потреби для живлення *in vitro*, що призвело до створення великої кількості модифікацій культуральних середовищ за сольовим складом, рослинними регуляторами росту тощо. Умови вирощування представників різних таксономічних груп рослин також варіюють [4].

Рослинний матеріал підтримується *in vitro*, як правило, у вигляді асептично культивованих рослин. Для мінімізації ризику формування генетично змінених форм розмноження матеріалу бажано здійснювати шляхом індукції розвитку апікальних або пазушних бруньок, а не адвентивних [13, 14, 22].

Багато можливостей надає використання явища соматичного ембріогенезу – процесу, в ході якого соматичні клітини проходять морфогенетичні стадії, аналогічні стадіям розвитку статевих зародків [1, 13, 30]. На даний час існують повідомлення про індукцію соматичного ембріогенезу у представників багатьох видів трав'янистих і деревних рослин, як дикорослих, так і господарсько цінних. Розмноження рослинного матеріалу шляхом соматичного ембріогенезу, особливо безпосередньо з тканин експланту, дозволяє зберегти високий рівень генетичної стабільності, на відміну від способів розмноження, які базуються на індукції адвентивних бруньок. На використанні явища соматичного ембріогенезу засновані технології створення так званого штучного насіння, а саме створення інкапсульованих соматичних ембріодів. Вважається, що таке синтетичне насіння може бути використано для ефективного зберігання клонів [4, 13, 31], але на даний час ця технологія розроблена для обмеженої кількості видів, до того ж існує обмаль даних стосовно можливостей тривалого

зберігання життєздатності соматичних зародків або синтетичного насіння. Крім того, питання генетичної стабільності/мінливості матеріалу, розмноженого шляхом соматичного ембріогенезу, потребує подальшого вивчення на прикладі представників різних таксономічних груп. Розробка рутинної технології створення та зберігання штучного насіння для більшості видів рослин та її окремих модифікацій для конкретних генотипів залишається завданням майбутніх досліджень.

*Видові особливості культивування.* Протягом всього періоду розвитку методів культури тканин методи культивування розроблялись, як правило, для модельних об'єктів та господарсько цінних видів рослин з метою розробки технологій їх покращення або отримання тих чи інших цінних рослинних продуктів. Дикорослим видам приділялося значно менше уваги. Крім того, ступінь успіху при використанні культури *in vitro* є різним для представників різних таксономічних груп. Хоча за останні роки дослідницька активність, спрямована на збереження рослинних ресурсів *in vitro*, зростає у всьому світі, все ще існує цілий ряд проблемних видів, для яких не розроблено методів збереження за допомогою методів культури *in vitro*. Тому рутинне застосування методів культури тканин обмежується відносно невеликою кількістю видів, в основному культурних [22]. Як правило, для трав'янистих рослин методики введення в асептичну культуру та культивування розроблені краще, ніж для деревних голонасінних або покритонасінних видів [13]. В цілому багаторічні рослини, що мають тривалий життєвий цикл, належать до об'єктів, культивування яких в асептичних умовах викликає найбільші труднощі (так звані «recalcitrant species», проблемні види). Така «непокірність» в основному визначається на генетичному рівні, і тому її важко контролювати зміною складу живильних середовищ або умов культивування. Багаторічні рослини мають складні сезонні та життєві цикли, що ускладнює контроль їх росту в культурі. Крім того, для них притаманні відносно повільний ріст *in vitro* та високий вміст фенольних сполук у тканинах [32].

*Основні способи зберігання in vitro.* Підтримання рослинного матеріалу в асептичних умовах

може здійснюватись з використанням двох основних методологічних підходів. Перший базується на зберіганні матеріалу без порушень процесів росту (субкультивування), другий – на зберіганні в умовах повільного росту або при повній його зупинці [4, 13, 16, 18, 23, 26, 33].

На найпростішому рівні зберігання *in vitro* можна здійснювати на основі субкультивувань – регулярних перенесень на свіжі живильні середовища. Сталий ріст культури *in vitro* є необхідною умовою та важливим показником ефективності методу зберігання, що використовується. В той же час недоліками системи субкультивувань є збільшення затрат праці та базових матеріалів. Особливо це стосується великих колекцій, які містять значну кількість видів, що належать до різних таксономічних груп [18]. Треба брати до уваги також, що тривале культивування може супроводжуватись зниженням або повною втратою морфогенетичного потенціалу культури [34–36] та збільшенням вірогідності генетичних змін при тривалому культивуванні [34, 37–41]. Існує також ризик втрати матеріалу в результаті людської помилки або зараження патогенами в процесі субкультивування [1], тому бажано, щоб культури під час зберігання зазнавали мінімального втручання.

З врахуванням всіх цих факторів більш ефективним способом зберігання рослинного матеріалу вважається культивування *in vitro* в умовах повільного (обмеженого) росту («slow growth»). Метою застосування цього методологічного підходу є уповільнення росту культур і збільшення інтервалів між субкультивуваннями [18], а також підвищення ступеня безпеки зберігання культур внаслідок зменшення кількості фізичних втручань у систему і мінімізації можливості зараження матеріалу при субкультивуванні [1]. Суть так званих методів «повільного росту» полягає у зміні оптимальних умов культивування на такі, при яких швидкість росту культур значно зменшується. Для цього розроблено цілий ряд підходів, серед яких можна назвати зниження температури, зміну режимів освітлення, зменшення кількості мінеральних елементів та/або цукрів у середовищі, додавання до складу середовищ осмотичних речовин або інших сполук, що здатні упо-

вільнювати ріст [1, 13–16, 18, 21, 26, 28, 33, 39, 42]. Успіх застосування конкретного методологічного підходу залежить від того, наскільки можна подовжити проміжок часу між субкультивуваннями, наскільки тривалим може бути вплив лімітуючого фактора до того моменту, як він почне негативно впливати на культуру, і наскільки швидко можуть бути відновлені нормальні ростові функції після повернення до стандартних умов культивування [1]. Обов'язковою умовою застосування методів повільного росту є вивчення життєздатності різних типів культур та стабільності/мінливості матеріалу, що зберігається [13, 29].

Існує цілий ряд публікацій про успішне застосування низької температури для тривалого збереження рослинного матеріалу. Кожному конкретному виду рослин визначають оптимальну температуру культивування, а далі обирають лімітуючі значення температури, які не зашкоджують матеріалу. Рослини різних таксономічних груп розрізняються за своєю реакцією на зниження температури [43].

Як правило, рослини помірного клімату, для яких оптимальна температура складає 20–25 °С, зберігають при 4–10 °С. Тропічні види, для яких оптимальні значення температури є вищими, краще виживають при більш високій температурі зберігання (10–20 °С) [12, 21, 29]. Результати досліджень із застосування понижених температур для зберігання рослинного матеріалу представлені в ряді публікацій на прикладі таких культур, як асептичні пагоони *Prunus* [44], ряд австралійських ендемічних дерев [37], *Vitis* [45], *Musa* [46], *Populus* [47, 48], *Nephrolepis exaltata* та *Cordyline fruticosa* [49], *Coffea spp.* [50], *Colocasia esculenta* [38], *Xanthosoma spp.* [51], *Camellia japonica* та *Camellia reticulata* [49], *Solanum tuberosum* [28], *Quercus* [53], *Ensete ventricosum* [54], *Fragaria* та *Rubus* [55], *Cedrus* [41], *Drosophyllum lusitanicum* [56], *Malus* [40, 43, 57], мікроцибулини *Lilium* [58], ембріогенні культури *Picea glauca* [36], *Citrus* [59], *Vitis* [31] та калюсні культури ряду видів рослин, що належать до різних родин [34]. В значній частині процитованих публікацій зменшення температури застосовували в комбінації зі змінами світлового режиму, інкубуючи культури в умовах зменшеного освітлення або в темноті.

Ефективним способом індукції повільного росту є зміна концентрації цукрів або додавання до складу середовища осмотично активних речовин (манітол, сорбітол), які створюють ефект водного стресу, що уповільнює ріст культур [21, 29]. Ці дослідження були проведені на таких видах, як *Coffea spp.* [50], *Xanthosoma spp.* [51], *Lilium* [58], *Ensete ventricosum* [54], *Solanum tuberosum* [60, 61], *Vanilla spp.* [62], *Passiflora giberti* [63], *Drosophyllum lusitanicum* [56] тощо.

Затримання темпів росту може бути викликано також зміною складу регуляторів росту у середовищі або додаванням деяких хімічних речовин-ретардантів [18, 28, 29, 64–66]. Треба зазначити, що у великій частині процитованих робіт автори застосовували одночасно декілька обмежуючих факторів.

На темпи росту *in vitro* впливають також летючі компоненти газового середовища. Низький вміст кисню в культуральному посуді веде до зниження дихальної активності культури та уповільнення росту. Зменшити вміст кисню можна завдяки застосуванню ряду методологічних прийомів, таких як зниження атмосферного тиску, використання азоту, застосування мінеральної олії, що відокремлює культуру від газоподібного оточення [1, 29].

В ряді робіт для тривалого зберігання було успішно використано інкапсуляцію апікальних та пазушних бруньок або соматичних ембріоїдів в альгінатні кульки на основі технології «штучного насіння» [18, 52, 55, 62]. Ембріогенні культури були використані для розробки біотехнологічних методів зберігання представників саговників [67]. В той же час зазначається, що описані методи були застосовані для різних видів рослин з різним ступенем успіху; жоден з них не є універсальним і не використовується широко [36].

**Кріоконсервація** – метод, який надає можливість тривалого зберігання живого матеріалу з повною зупинкою росту, це зберігання в замороженому стані, в умовах, які дозволяють значно уповільнити або зовсім зупинити метаболічні процеси в тканинах [4, 13, 15, 16, 18, 24, 33, 35]. Загалом, зберігання при низьких температурах може здійснюватись декількома способами: або шляхом заморожування при температурі близько –20 °С, або при



–79 °С в твердому СО<sub>2</sub>, або в низькотемпературних холодильниках (–80 °С і нижче), або в рідкому азоті при –196 °С. Зберігання в рідкому азоті (кріоконсервація) можна застосувати як для культур дедиференційованих клітин, так і для ізольованих органів [4, 11, 16, 35]. Методологічні підходи кріоконсервації відпрацьовані достатньо добре і описані в багатьох оглядах та методичних публікаціях [11, 13, 15, 16, 18, 21, 26, 33, 42, 68, 69]. Кількість експериментальних статей, присвячених різним аспектам її застосування як для господарсько цінних, так і дикорослих видів, значно перевищує кількість публікацій з культивування в умовах повільного росту *in vitro*. Ще у 1991 р. повідомлялось про те, що технологія кріоконсервації була використана у понад 70 видів рослин [18]. За час, що минув, ця кількість значно зросла. Детальний огляд роботи по використанню кріоконсервації для збереження генетичного різноманіття рослин, яка ведеться в різних міжнародних організаціях та наукових закладах, наводиться в публікації [24].

Використання кріоконсервації для зберігання рослинного матеріалу здійснюється у декілька послідовних етапів, детальні умови кожного з яких повинні бути експериментально підібрані для кожного конкретного типу експланту та виду рослин. Серед цих умов – вибір матеріалу, попередня обробка, заморожування, зберігання, відтаювання, обробка після зберігання та оцінка життєздатності [16, 18, 69].

Зазначається, що матеріал, призначений для зберігання, повинен бути якомога більш молодим і містити достатню кількість меристематичних клітин, які витримують низькі температури з більшою вірогідністю завдяки малим розмірам, невеликій кількості вакуолей і щільній цитоплазмі. Експланти можуть бути взяті як з рослин, що ростуть в природних умовах *in vivo*, так і з рослин, вирощуваних *in vitro*. Останні вважаються більш придатними, тому що вони мініатюризовані та вільні від поверхневого забруднення. Фізіологічний стан матеріалу також має велике значення [18, 69].

Попередня обробка – це культивування протягом певного часу в умовах, які готують матеріал до заморожування, тобто в присутності кріопротекторів (сахароза, манітол, сорбітол, ДМСО, ПЕГ тощо). Це гетерогенна група спо-

лук, які сприяють виживанню клітин при низьких температурах. Механізми їх дії остаточно не з'ясовані, але вважається, що вони захищають мембрани та сайти зв'язування ферментів від пошкодження при заморожуванні [18, 68]. Деякі типи експлантів, що природно пристосовані до дегідратації (сплячі бруньки та насіння), при кріоконсервації можуть зберігатися шляхом без будь-яких попередніх обробок [24].

Різні типи заморожування (ультрашвидке, швидке або повільне) відрізняються за своїм впливом на клітини. Підкреслюється, що для будь-якого типу експлантів повинні бути чітко витримані такі критерії, як швидкість заморожування та температурні режими (заморожування та відтаювання). Основна мета відтаювання – уникнути злипання мікрочастин льоду, який утворюється при заморожуванні, щоб запобігти пошкодженню клітин. У більшості випадків відтаювання проводиться швидко, при температурі близько 40 °С. Обробка після зберігання – це культивування матеріалу в умовах, які забезпечують оптимальне відновлення росту. При цьому, зокрема, проводиться видалення кріопротекторів. Важливим кроком є також оцінка життєздатності матеріалу після відтаювання, яка може бути здійснена із застосуванням стандартних цитологічних або хроматографічних методів [13, 16, 18, 35, 68].

Модифікаціями технології кріоконсервації є інкапсуляція/дегідратація та вітрифікація [18, 69]. Технологія інкапсуляції/дегідратації базується на тому, що інкапсуляція експлантів в альгінатні кульки захищає їх та робить стійкими до таких обробок, які інакше були б летальними. Альгінатні кульки з експлантами культивують протягом певного часу в рідкому середовищі з високим вмістом сахарози, далі підсушують та заморожують в той або інший спосіб. Застосування технології вітрифікації дозволяє усунути проблему формування кристалів льоду всередині клітин. Для цього проводиться швидко та точно за часом попередня обробка в присутності кріопротекторів у дуже високих концентраціях. Використання описаних підходів значно розширює обсяг рослинного матеріалу, який не витримує стандартних умов кріоконсервації.

Теоретично, застосування методів кріоконсервації дозволяє зберігати матеріал протягом

невизначено тривалого часу, тому саме цей методичний підхід вважається найбільш багатообіцяючим для зберігання генофонду рослин [13, 16, 18, 21, 24, 33, 70]. Разом з тим існують певні обмеження. Так, лише невелика частина органів та тканин рослин, за виключенням насіння, мають власну стійкість до наднизьких температур [15, 33]. Треба мати на увазі також, що кожний тип клітин має свою чутливість до кріопротекторів, а також свої умови охолодження та відтаювання. Для успішного здійснення кріоконсервації необхідно експериментально випробувати різні параметри, які часто є взаємопов'язаними, і зміна одного параметра майже завжди веде за собою зміну іншого [68]. Крім того, кріоконсервація вимагає наявності досить коштовного обладнання, що обмежує її застосування [1, 23].

Загалом, яка б з описаних вище технологій не була обрана для зберігання рослинного матеріалу в тій або іншій формі, спектр задач, що постають, залишається практично однаковим. Перш за все треба забезпечити максимальний рівень генетичної стабільності матеріалу, що зберігається [1, 2, 11, 13]. Крім того, методи зберігання не повинні негативно впливати на морфогенетичний потенціал культур та їх здатність розвиватися у життєздатні рослини [21]. Підкреслюється, що важливою задачею є розвиток і вдосконалення технологій зберігання на всіх рівнях для збільшення їх ефективності та можливості застосування у найбільшого числа видів рослин [1].

**Колекції рослинного матеріалу.** Розвиток ефективних методів збереження рослинного матеріалу, в тому числі із застосуванням біотехнології, надав можливість створювати великі колекції, які представляють значне генетичне різноманіття. Розрізняють базові колекції для довготривалого зберігання та діючі (робочі) колекції для зберігання впродовж відносно невеликих проміжків часу з метою їх прямого використання [10]. Головними завданнями робочих колекцій називають збір, підтримання, оцінку та розповсюдження рослинного матеріалу, а також інформаційну підтримку. Базові колекції використовують як резервні, дублюючі, на випадок можливої втрати матеріалу з робочої колекції. Базові і робочі колекції мають різні функції, які доповнюють

одна одну, тому в кожній з них можуть використовуватись різні методи зберігання матеріалу [11, 13]. В ході створення та підтримання колекцій генетичних ресурсів накопичується велика кількість експериментальних даних. Щоб ці дані можна було порівнювати та використовувати, їх треба вести на стандартизованій основі, для чого створюються інформаційні бази даних. Наприклад, коли мова йде про колекції *in vitro*, в таких базах повинні бути відображені дані про біологічні особливості рослинного матеріалу, повна історія культивування (склад живильних середовищ, застосування регуляторів росту, частота субкультивувань) тощо [1, 10].

Як правило, дослідницькі проекти фокусуються на збереженні генетичного різноманіття господарсько важливих видів рослин [39, 71–74]. В той же час все більше уваги приділяється створенню колекцій рослинного матеріалу дикорослих видів, в тому числі таких, що знаходяться під загрозою зникнення та охороняються в різних країнах світу. Відзначається зростаюче значення технологій *in vitro* для розмноження широкого спектра видів рослин, що охороняються. Методи збереження *in vitro* за допомогою мікроклонального розмноження розроблено для представників різних таксономічних груп, в тому числі ендемічних, і таких, які мають значення для практичного використання [4]. Серед них *Vella lucentina* [75], *Saussurea lappa* [76], *Heracleum candicans* [77], *Hypericum foliosum* [78], *Holostemma annulare* [79], *Dianthus superbus* [80], *Salvia* [81], *Ipsea malabarica* [82], *Cedrela fissilis* [83], *Dianthus calizonus* [84], *Eucalyptus impensa* [85], *Scutellaria baicalensis* [86], *Moringa* [87] та багато інших. Цей перелік є далеко не повним і постійно зростає, що відображує усвідомлення значення збереження генетичного різноманіття дикорослих видів та важливої ролі біотехнологічних методів в цьому процесі.

Створення банків генетичних ресурсів рослин розглядається як найнадійніший засіб збереження генофонду рослин [16]. Низку міжнародних і вітчизняних ініціатив зі збереження генетичних ресурсів рослин детально розглянуто в публікації [8]. В Інституті рослинництва ім. В.Я. Юр'єва функціонує Національний генетичний банк рослин, який вклю-

чає понад 130 тисяч зразків з 1250 видів [8, 16]. Унікальний багаторічний досвід створення та підтримання колекції *in vitro* тропічних та субтропічних рослин накопичено в Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка [88]. У Нікітському ботанічному саду розроблено технології збереження асептичних колекцій різних видів рослин з використанням соматичного ембріогенезу та органогенезу [30].

В Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України протягом 15 років ведеться робота по підтриманню та поповненню генетичного банку *ex situ* представників світової флори, який віднесено до переліку об'єктів національного наукового надбання України [89–91]. Його складовими частинами є банк насіння та банк асептичних рослин і клітинних ліній *in vitro*.

На даний час банк насіння, яке зберігається при температурі +2–4 °С, нараховує понад 4500 видозразків, які належать до приблизно 3600 видів та 156 родин насінневих рослин. Банк *in vitro* містить понад 2000 клітинних ліній (близько 2000 видів з 111 родин). Кожен вид в банку насіння представлено асептично культивованими рослинами та відповідними клітинними (калюсними) культурами.

Робота з підтримання та використання генетичного банку є комплексною та багатоплановою. Відпрацьовуються методики введення матеріалу в асептичну культуру, проводиться вивчення життєздатності насіння після тривалого (понад 10 років) зберігання [92]. Ведеться вдосконалення протоколів культивування *in vitro* з метою створення методик, які б були найбільш універсальними для представників різних видів рослин і в той же час враховували індивідуальні особливості кожної таксономічної групи. Колекція є базою для проведення ряду біотехнологічних досліджень, серед яких розробка технологій збереження *in vitro* видів, що потребують охорони [93, 94], пошук сполук з біологічною активністю в різних типах асептичних культур [90, 95], здійснення експериментів з генетичної трансформації за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* та *A. rhizogenes* і вивчення трансгенних культур різних видів рослин [96–98]. Детальна інформація про генетичний банк *ex situ* зберігається у створеній на основі Microsoft Access 2003 комп'ютерній ба-

зі даних [90]. Загалом генетичний банк *ex situ* та дослідження, що ведуться на його основі, є внеском в розробку для представників різних таксономічних груп рослин надійних та ефективних технологій з метою інтеграції їх в програми, спрямовані на збереження та використання біорізноманіття світової флори.

Підсумовуючи, можна сказати, що кожний з описаних експериментальних підходів має певні переваги та недоліки, і для ефективного збереження максимального генетичного різноманіття необхідно застосовувати адекватні методи, що доповнюють один одного [21, 56]. Це дає можливість раціоналізувати утримання колекцій *in vitro*, особливо великих колекцій, які містять рослинний матеріал різних таксономічних груп.

В цілому такі біотехнологічні підходи, як культура *in vitro* та криоконсервація, вважаються найбільш багатообіцяючими для середньо- та довготривалого зберігання генофонду рослин [18, 21, 70]. Вони розглядаються не як заміна традиційним методам збереження біорізноманіття, а як додаткові інструменти, що дозволяють значно підвищити ефективність роботи. Значення біотехнологічних підходів для збереження та використання рослинного генофонду буде, безперечно, зростати.

V.B. Belokurova

#### METHODS OF BIOTECHNOLOGY IN THE SYSTEM OF EFFORTS FOR PLANT BIODIVERSITY PRESERVATION

The main methods of conservation of plant biodiversity using *in situ* and *ex situ* approaches are analyzed in the review. Potentials and problems of biotechnology (*in vitro* culture, cryopreservation) for storage of plant germplasm are discussed.

В.Б. Белокурова

#### МЕТОДЫ БИОТЕХНОЛОГИИ В СИСТЕМЕ МЕРОПРИЯТИЙ ПО СОХРАНЕНИЮ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ

Рассмотрены основные методы сохранения генофонда растений, включающие подходы *in situ* и *ex situ*. Описаны основные методы биотехнологии (культура *in vitro*, криоконсервация), которые применяются для создания коллекций генетического разнообразия растений, а также проанализированы возможности и ограничения каждого из них.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Grout B.W.W. *In vitro* conservation of germplasm // Plant tissue culture: applications and limitations / Ed. S.S. Bhojwani. – Amsterdam : Elsevier Publ., 1990. – P. 394–423.
2. Коваль С.Ф., Коваль В.С., Тымчук С.М., Богуславський Р.Л. Генетические коллекции: проблемы формирования, сохранения и использования // Цитология и генетика. – 2003. – 37, № 4. – С. 46–53.
3. Hammer K., Arrowsmith N., Gladis T. Agrobiodiversity with emphasis on plant genetic resources // Naturwissenschaften. – 2003. – 90, № 6. – P. 241–250.
4. Sarasan W., Cripps R., Ramsay M.M., Atherton C., McMichen M., Prandergast G., Rowntree J.K. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2006. – 42. – P. 206–214.
5. Coates D.J., Dixon K.W. Current perspectives in plant conservation biology // Austral. J. Bot. – 2007. – 55. – P. 187–193.
6. Heywood V., Casas A., Ford-Lloyd B., Kell S., Maxted N. Conservation and sustainable use of crop wild relatives // Agriculture, Ecosystems and Environment. – 2007. – 121. – P. 245–255.
7. Heywood V.H., Iriondo J.M. Plant conservation: old problems, new perspectives // Biol. Conserv. – 2003. – 113. – P. 321–335.
8. Кириченко В.В., Рябчун В.К., Богуславський Р.Л. Роль генетичних ресурсів рослин у виконанні державних програм // Генет. ресурси рослин. – 2008. – № 5. – С. 7–13.
9. Fernie A.R., Tadmor Y., Zamir D. Natural genetic variation for improving crop quality // Curr. Opin. Plant Biol. – 2006. – 9. – P. 196–202.
10. Kuckuck H., Kobabe G., Wenzel G. Safeguarding and utilization of natural genetic diversity // Fundamentals of plant breeding / Eds D. Boringer, W. Hondelmann, V. Stoy, T. Tatlioglu. – Berlin etc : Springer-Verlag, 1991. – P. 220–230.
11. Westwood M.N. Maintenance and storage: clonal germplasm // Plant Breed. Rev. – 1989. – 7. – P. 111–128.
12. Keller E.R.J., Senula A., Leunufna S., Grube M. Slow growth storage and cryopreservation – tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections // Int. J. Refriger. – 2006. – 29. – P. 411–417.
13. Towill L.E. Biotechnology and germplasm preservation // Plant Breed. Rev. – 1989. – 7. – P. 159–182.
14. Fay M.F. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods // In Vitro Cell Dev. Biol. – 1992. – 28. – P. 1–4.
15. Хеншоу Г.Г., О'Хара Дж.Ф. Методи *in vitro* для збереження і використання мирового генофонда рослин // Біотехнологія сільськогосподарських рослин. – М.: Агропромиздат, 1987. – С. 205–224.
16. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин. – Київ : Поліграф консалтинг, 2003. – С. 465–474.
17. Plucknett D.L., Horne M.E. Conservation of genetic resources // Agriculture, Ecosystems and Environment. – 1992. – 42. – P. 75–92.
18. Engelmann F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review // Euphytica. – 1991. – 57. – P. 227–243.
19. Skinner D.Z., Bauchan G.R., Auricht G., Hughes S. A method for the efficient management and utilization of large germplasm collections // Crop Sci. – 1999. – 39. – P. 1237–1242.
20. Pardey P.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.
21. Withers L.A. Cryopreservation and genebanks // Plant cell culture technology / Ed. M.M. Yeoman. – Oxford : Blackwell Sci. Publ., 1986. – P. 96–140.
22. Engelmann F. *In vitro* conservation research activities at the International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) // Plant Tissue Cult. and Biotechnol. – 1997. – 3, № 1. – P. 46–52.
23. Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубаярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального Сибирского ботанического сада // Вестн. ВОГиС. – 2008. – 12, № 4. – С. 564–571.
24. Engelmann F. Plant cryopreservation: progress and prospects // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2004. – 40. – P. 427–433.
25. Whigham D.F., O'Neill J.P., Rasmussen H.N., Caldwell B.A., McCormick M.K. Seed longevity in terrestrial orchids – Potential for persistent *in situ* seed banks // Biol. Conserv. – 2006. – 129. – P. 24–30.
26. Dodds J.H., Roberts L.W. Cryopreservation of germplasm // Experiments in plant tissue culture. – Cambridge : Univ. press, 1995. – P. 196–203.
27. Понов Ю.Г. Создание коллекции культур *in vitro* растений флоры Армении и ее биотехнологический потенциал : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Ереван, 2002. – 48 с.
28. Veramendi J., Arregui L.M., Mingo-Castel A.M. A simple method for medium-term conservation of potato germplasm // Plant Tissue Cult. and Biotechnol. – 1998. – 4, № 3/4. – P. 183–188.
29. Benson E.E., Withers L.A. The application of germplasm storage in biotechnology // Plant cell biotechnology / Eds M.S.S. Pais, F. Mavituna, J.M. Novais. – Berlin etc : Springer-Verlag, 1988. – P. 431–443.
30. Митрофанова І.В. Соматичний ембріогенез та організмогенез як основа біотехнології отримання і збе-

- реження багаторічних садових культур : Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. — Ялта, 2007. — 40 с.
31. Jayasankar S., Van Aman M., Coedts J., Dhekney S., Li Z.T., Gray D.J. Low temperature storage of suspension culture-derived grapevine somatic embryos and regeneration of plants // *In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant.* — 2005. — **41**. — P. 752–756.
  32. McCown B.H. Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: dealing with genetic predeterminism // *In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant.* — 2000. — **36**, № 3. — P. 149–154.
  33. Withers L.A. Preservation of germplasm // *Perspectives in plant cell and tissue culture (International review of cytology. Suppl. 11B) / Ed. I. Vasil.* — New York : Acad. press, 1980. — P. 101–133.
  34. Hiraoka N., Kodama T. Effects of non-frozen cold storage on the growth, organogenesis and secondary metabolism of callus cultures // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1984. — **3**. — P. 349–357.
  35. Mantell S.H., Matthews J.A., McKee R.A. Cultural tools and techniques // *Principles of plant biotechnology. An introduction to genetic engineering in plants.* — Oxford : Blackwell Sci. Publ., 1985. — P. 89–129.
  36. Joy R.W., Kumar P.P., Thorpe T.A. Long-term storage of somatic embryogenic white spruce tissue at ambient temperature // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1991. — **25**. — P. 53–60.
  37. Williams R.R., Taji A.M. Effects of temperature, darkness and gelling agent on long-term storage of *in vitro* shoot cultures of Australian woody plant species // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1987. — **11**. — P. 151–156.
  38. Bessembinder J.J.E., Staritsky G., Zandvoort E.A. Long-term *in vitro* storage of *Colocasia esculenta* under minimal growth conditions // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1993. — **33**. — P. 121–127.
  39. Golmirzaie A., Toledo J. *In vitro* conservation of potato and sweetpotato germplasm // CIP Program Report. — 1997–1998. — P. 351–356.
  40. Hao Y.-J., Deng X.-X. Genetically stable regeneration of apple plants from slow growth // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 2003. — **72**. — P. 253–260.
  41. Renau-Morata B., Arrillaga I., Segura J. *In vitro* storage of cedar shoot cultures under minimal growth conditions // *Plant Cell Rep.* — 2006. — **25**. — P. 636–642.
  42. Withers L.A. Low temperature storage of plant tissue cultures // *Plant cell cultures II / Ed. A. Fiechter.* — Berlin : Akademie-Verlag, 1981. — P. 101–150.
  43. Orlikowska T. Effect of *in vitro* storage at 4 °C on survival and proliferation of two apple rootstocks // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1992. — **31**. — P. 1–7.
  44. Marino G., Rosati P., Sagrati F. Storage of *in vitro* cultures of *Prunus* rootstocks // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1985. — **5**. — P. 73–78.
  45. Galzy R., Compan D. Growth and nutrition of grapevine during *in vitro* long-term storage // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1988. — **13**. — P. 229–237.
  46. Ko W.-H., Hwang S.-C., Ku F.-M. A new technique for storage of meristem-tip cultures of «Cavendish» banana // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1991. — **25**. — P. 179–183.
  47. Son S.H., Chun Y.W., Hall R.B. Cold storage of *in vitro* cultures of hybrid poplar shoots (*Populus alba* L. × *P. grandidentata* Michx.) // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1991. — **27**. — P. 161–168.
  48. Hausman J.-F., Neys O., Kevers C., Gaspar T. Effect of *in vitro* storage at 4 °C on survival and proliferation of poplar shoots // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1994. — **38**. — P. 65–67.
  49. Hvoslef-Eide A.K. Effects of pre-storage conditions on storage of *in vitro* cultures of *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott and *Cordyline fruticosa* (L.) A. Chev // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1992. — **28**. — P. 167–174.
  50. Bertrand-Desbrunais A., Noirot M., Charrier A. Minimal growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.) 2. Influences of reduced concentrations of sucrose and low temperature // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1992. — **31**. — P. 105–110.
  51. Zandvoort E.A., Hulshof M.J.H., Staritsky G. *In vitro* storage of *Xanthosoma* spp. under minimal growth conditions // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1994. — **36**. — P. 309–316.
  52. Ballester A., Janeiro L.V., Vieitez A.M. Cold storage of shoot cultures and alginate encapsulation of shoot tips of *Camellia japonica* L. and *Camellia reticulata* Lindley // *Sci. Hort.* — 1997. — **71**. — P. 67–78.
  53. Romano A., Martins-Loucao M.A. *In vitro* cold storage of cork oak shoot cultures // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1999. — **59**. — P. 155–157.
  54. Negash A., Krens F., Schaart J., Visser B. *In vitro* conservation of enset under slow-growth conditions // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 2001. — **66**. — P. 107–111.
  55. Lisek A., Orlikowska T. *In vitro* storage of strawberry and raspberry in calcium-alginate beads at 4 °C // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 2004. — **78**. — P. 167–172.
  56. Gonçalves S., Romano A. *In vitro* minimum growth for conservation of *Drosophyllum lusitanicum* // *Biol. Plant.* — 2007. — **51**, № 4. — P. 795–798.
  57. Negri V., Tosti N., Standardi A. Slow-growth storage of single node shoots of apple genotypes // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 2000. — **62**. — P. 159–162.
  58. Bonnier F.J.M., Van Tuyl J.M. Long term *in vitro* storage of lily: effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1997. — **49**. — P. 81–87.
  59. Hao Y.-J., Wen X.-P., Deng X.-X. Genetic and epigenetic evaluations of citrus calluses recovered from slow-

- growth culture // J. Plant Physiol. – 2004. – 161. – P. 479–484.
60. Gopal J., Chamail A., Sarkar D. Slow-growth *in vitro* conservation of potato germplasm at normal propagation temperature // Potato Res. – 2002. – 45. – P. 203–213.
61. Sarkar D., Pandey S.K., Chanemougasoundharam A., Sud K.C. The role of calcium nutrition in potato (*Solanum tuberosum*) microplants in relation to minimal growth over prolonged storage *in vitro* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2005. – 81. – P. 221–227.
62. Divakaran M., Nirmal Babu K., Peter K.V. Conservation of *Vanilla* species, *in vitro* // Sci. Hort. – 2006. – 110. – P. 175–180.
63. Faria G.A., Pereira De Carvalho Costa M.A., Jung-hans T.G., Da Silvaledo C.A., Da Silva Souza A. Efeito da sacarose e sorbitol na conservacao *in vitro* de *Passiflora giberti* N.E.Brown // Rev. Brasil. Fruticult. – 2006. – 28, № 2. – P. 267–270.
64. Bertrand-Desbrunais A., Noirot M., Charrier A. Minimal growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.) 1. Influence of low concentrations of 6-benzyladenine // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1991. – 27. – P. 333–339.
65. Watt M.P., Thokoane N.L., Mycock D., Blakeway F. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2000. – 61. – P. 161–164.
66. Sarkar D., Chakrabarti S.K., Naik P.S. Slow-growth conservation of potato microplants: efficacy of ancymidol for long-term storage *in vitro* // Euphytica. – 2001. – 117, № 2. – P. 133–142.
67. Litz R., Moon P.A., Benson E.M., Stewart J., Chavez V.M. A biotechnology strategy for medium- and long-term conservation of cycads // Bot. Rev. – 2004. – 70, № 1. – P. 39–46.
68. Джеймс Е. Хранение клеток в условиях низких температур // Биотехнология сельскохозяйственных растений. – М.: Агропромиздат, 1987. – С. 153–175.
69. Benson E.E. Cryopreservation // Plant cell culture. A practical approach (2<sup>nd</sup> edition) / Eds R.A. Dixon, R.A. Gonsales. – Oxford : Univ. press, 1994. – P. 147–167.
70. Keller E.R.J., Kaczmarczyk A., Senula A. Cryopreservation for plant genebanks – a matter between high expectations and cautious reservation // Cryoletters. – 2008. – 29, № 1. – P. 53–62.
71. Goodman M.M., Gonsales F.C., Holley R.N. US maize germplasm: origins, limitations, and alternatives // Recent advances in the conservation and utilization of genetic resources : Proc. Global Maize Germplasm Workshop, CIMMYT. – Mexico, 1988. – P. 130–148.
72. White G.A., Shands H.L., Lovell G.L. History and operation of the national plant germplasm system // Plant Breed. Rev. – 1989. – 7. – P. 5–56.
73. Goodman M.M. Genetic and germplasm stocks worth conserving // J. Hered. – 1990. – 81. – P. 11–16.
74. Morris J.B., Greene S.L. Defining a multiple-use germplasm collection for the genus *Trifolium* // Crop Sci. – 2001. – 41. – P. 893–901.
75. Lledo M.D., Crespo M.B., Amo-Marco J. *In vitro* multiplication of *Vella lucentina* M.B. Crespo (Brassicaceae), a threatened Spanish endemic species // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 1995. – 31. – P. 199–201.
76. Jonson T.S., Narayan S.B., Narayana D.B.A. Rapid *in vitro* propagation of *Saussurea lappa*, an endangered medicinal plant, through multiple shoot cultures // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 1997. – 33. – P. 128–130.
77. Wakhlu A.K., Sharma R.K. Micropropagation of *Heracleum candicans* Wall: a rare medicinal herb // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 1998. – 35. – P. 79–81.
78. Moura M. Conservation of *Hypericum foliosum* Aiton, an endemic Azorean species, by micropropagation // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 1998. – 34. – P. 244–248.
79. Sudha C.G., Krishnan P.N., Pushpangadan P. *In vitro* propagation of *Holostemma annulare* (Roxb.) K. Schum., a rare medicinal plant // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 1998. – 33. – P. 57–63.
80. Mikulik J. Propagation of endangered plant species by tissue culture // Acta Univ. Palackiana Olomucensis. – 1999. – Biologica 37. – P. 27–33.
81. Cuenca S., Amo-Marco J.B. *In vitro* propagation of two Spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2000. – 36. – P. 225–229.
82. Martin K.P., Pradeep A.K. Simple strategy for the *in vitro* conservation of *Ipea malabarica*, an endemic and endangered orchid of the Western Ghats of Kerala, India // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2003. – 74. – P. 197–200.
83. Costa Nunes da E., Benson E., Oltramari A.C., Araujo P.S., Moser J.R., Viana A.M. *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest // Biodiversity and Conservation. – 2003. – 12. – P. 837–848.
84. Paunescu A., Holobiuc I. Conservation of endemic species *Dianthus callizonus* Schott & Kotsky using *in vitro* techniques // Rev. Roum. Biol. – Biol. Veget. – 2003. – 48, № 1/2. – P. 3–7.
85. Bunn E. Development of *in vitro* methods for *ex situ* conservation of *Eucalyptus impensa*, an endangered mallee from southwest Western Australia // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2005. – 83. – P. 97–102.
86. Alan A.R., Zeng H., Assania A., Shi W.L., McRae H.E., Saxena P.K. Assessment of genetic stability of the germplasm lines of medicinal plant *Scutellaria baicalensis* Georgi (Huang-qin) in long-term, *in vitro*

- maintained cultures // *Plant Cell Rep.* – 2007. – 26. – P. 1345–1355.
87. *Steinitz B., Tahib Y., Gaba V., Gefen T., Vaknin Y.* Vegetative micro-cloning to sustain biodiversity of threatened *Moringa* species // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* – 2009. – 45. – P. 65–71.
88. *Червченко Т.М., Лаврентьева А.Н., Иванников Р.В.* Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. – Киев : Наук. думка, 2008. – 559 с.
89. *Belokurova V.B., Szikura Y.Y., Maistrov P.D., Kuchuk N.V.* Plant germplasm conservation in the bank of cell lines *in vitro* // *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century: Abstr. IX Int. Congr. on Plant Tissue and Cell Culture.* – Jerusalem, 1998. – P. 157.
90. *Белокурова В.Б., Листван Е.В., Майстров П.Д., Сикура Й.Й., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В.* Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры // *Цитология и генетика.* – 2005. – 39, № 1. – С. 41–51.
91. *Сикура Й.Й., Белокурова В.Б., Шиша Е.Н., Кучук Н.В.* Сохранение *ex situ – in vitro* биологического разнообразия различных видов мировой флоры в Институте клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины // *Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира: Материалы II Всерос. науч.-практ. конф.* – Волгоград, 2008. – С. 137–142.
92. *Сикура Й.Й., Капустян В.В., Белокурова В.Б., Сикура А.Й.* Теоретические и методические основы интродукции растений *ex situ – in vitro* // *Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка. Інтродукція і збереження рослинного різноманіття.* – 2007. – № 12/14. – С. 57–62.
93. *Белокурова В.Б., Сикура А.Й., Сикура Й.Й., Кучук Н.В.* Разработка биотехнологических методов для восстановления численности некоторых охраняемых видов класса однодольных // *Інтродукція рослин.* – 2004. – № 3. – С. 17–23.
94. *Белокурова В.Б.* Методы биотехнологии для сохранения исчезающих видов растений в коллекциях *in vitro* // *Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира: Материалы II Всерос. науч.-практ. конф.* – Волгоград, 2008. – С. 34–38.
95. *Листван К.В., Белокурова В.Б., Кучук М.В.* Порівняльна характеристика антимікробної активності екстрактів рослин та отриманих з них клітинних ліній // *Фітопатогенні бактерії. Фітонцидологія. Алелопатія: Зб. ст. учасників Міжнар. конф.* – Київ, 2005. – С. 227–231.
96. *Белокурова В.Б., Головач И.С., Щербак Н.Л., Кучук Н.В.* Регенерация *in vitro* растений *Nicotiana africana* из эксплантов разного типа и мезофильных протопластов // *Цитология и генетика.* – 2004. – 38, № 3. – С. 9–15.
97. *Щербак Н.Л., Белокурова В.Б., Комарницкий И.К., Кучук Н.В.* Генетическая трансформация растений *Nicotiana africana* Мегхп. плазмидами, содержащими сайты рекомбинации *lox* // *Цитология и генетика.* – 2004. – 38, № 4. – С. 3–8.
98. *Белокурова В.Б., Кищенко Е.М., Листван Е.В., Кучук Н.В.* Культура *in vitro* и получение трансгенных корней *Psoralea drupacea* Bunge (Leguminosae) // *Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова.* – Київ, 2009. – С. 199–204.

Надійшла 26.10.09