

О.И. Молканова, Е.В. Мишанова

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ И КРИОКОНСЕРВАЦИЯ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР)

Федеральное государственное учреждение науки
Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук

Сохранение генетического разнообразия растительных ресурсов является основной задачей ботанических садов и других научно-исследовательских центров. Биотехнологический метод считают одним из наиболее эффективных и вместе с тем воспроизводимых способов сохранения генофонда растений. Метод криоконсервации позволяет поддерживать живые клетки, ткани, культуры при ультранизких температурах (–196 °C) без генетических изменений, обеспечивает хранение биологических материалов в течение длительного времени. В работе приведен обзор основных направлений в области биотехнологии и криоконсервации растений.

Ключевые слова: биотехнология, сохранение биоразнообразия, генетические банки *in vitro*, клональное микроразмножение

Цитирование: Молканова О.И., Мишанова Е.В. Биотехнологические методы и криоконсервация растений (Обзор) // Промышленная ботаника. 2025. Вып. 25, № 4. С. 60–66. DOI: 10.5281/zenodo.17800789

Сохранение биоразнообразия растений *ex situ* в настоящее время является самым эффективным и распространенным методом благодаря деятельности ботанических садов [8, 11, 29]. Сохранение генетических ресурсов в коллекциях *in vitro* становится важной задачей биотехнологии в стратегии сохранения *ex situ* [24]. Наряду с традиционными способами сохранения растений все большее значение приобретает использование для этих целей культуры изолированных тканей и органов. Разработка эффективных методов воспроизводства фиторесурсных видов растений *in vitro* является основой работ по сохранению генофонда.

Протоколы микроразмножения, разработанные для нескольких тысяч растений, служат основой для успешного введения в культуру, размножения и сохранения в банке культур *in vitro* новых образцов [21, 26]. Так, в США (штат Орегон, Корваллис) функционирует National Clonal Germplasm Repository USDA, где сохра-

няют 500000 образцов хозяйственно ценных, а также редких и исчезающих растений, принадлежащих к 10000 видам [31]. В коллекции Королевского ботанического сада (Кью, Великобритания) в банке *in vitro* поддерживается свыше 6000 таксонов, большинство из которых редкие и исчезающие виды [43]. В ряде зарубежных стран сформированы и эффективно функционируют коллекции клеток, органов и растений, культивируемых *in vitro*. Из европейских можно отметить коллекцию Института генетики и селекции сельскохозяйственных растений им. Лейбница (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research) (Германия, Гатерслебен), в которой поддерживают более 700 образцов линий клеточных культур, которые принадлежат к 80 семействам растений, причем большинство этих культур синтезируют фармакологически важные вторичные метаболиты [19]. Подобные коллекции существуют во Франции, Италии, Испании, Бельгии, Польше,

Румынии, Японии, Индии и ряде других стран, в том числе в России.

Число биотехнологических коллекций постоянно увеличивается. Согласно Е.Е. Бенсон [15], биотехнологические методы сохранения гермоплазмы должны быть интегрированы как дополнительная опция в существующие программы по сохранению биоразнообразия.

Теоретически, благодаря тотипотентности, почти все клетки растений способны дать начало целому организму под влиянием благоприятных факторов. В качестве исходного материала для введения в культуру ткани могут быть использованы зиготические эмбриониды или вегетативные части растений, такие как почки, побеги, луковичы, листья, семена, надземные и подземные органы или их фрагменты, растительные ткани [6, 9, 22].

Успех введения в культуру *in vitro* во многом зависит от выбора подходящего экспланта и его размеров, эффективности стерилизации и последующего удаления стерилизующих веществ, подбора питательных сред. Не менее важны физические факторы – свет, температура и влажность [5, 6, 8].

Одним из ключевых моментов является использование растительного материала, идентифицированного специалистами-ботаниками. В паспортные данные необходимо вносить информацию о месте сбора, включающую координаты GPS, фотографии зоны распространения и максимальные сведения о естественной среде [40]. При возможности образцы должны быть взяты из разных природных популяций в количестве, достаточном для дальнейшей разработки протоколов сохранения *in vitro* [2]. Подобный подход позволяет учесть основные аспекты (морфофизиологический, эколого-географический, генетический) современной концепции биологического вида [3].

Выбор оптимальной модели культивирования *in vitro* и особенности клонального микроразмножения растений различных таксономических групп тесно связаны с их биологическими особенностями. При разработке и оптимизации методики клонального микроразмножения для каждого таксона необходимо определить

стратегию исследования: выбрать модель размножения и тип экспланта, подобрать условия, способствующие реализации его морфогенетического потенциала. Правильный выбор модели размножения, состава питательных сред и условий культивирования позволяет свести к минимуму риск появления соматоклональных вариантов [6, 10]. Это обуславливает необходимость дифференцированного подхода к разработке методик клонального микроразмножения, поскольку целью использования биотехнологий для редких или элитных генотипов является сохранение гермоплазмы и поддержание ее в стабильном состоянии, то после успешной инициации культур *in vitro* выбираются определенные методы микроразмножения, минимизирующие риск соматоклональных вариаций. К числу таких технологий относится, прежде всего, метод активации уже существующих в растении меристем (апекса стебля, пазушных почек), который в отличие от других типов микроразмножения считается надежным в плане генетической стабильности полученных регенерантов [1, 9, 37].

Следующий этап после успешной инициации культур *in vitro* – это индукция побегообразования и собственно размножение. Для некоторых видов, особенно это касается древесных, трудно сразу добиться максимального роста и размножения в культуре ткани. Успех применения любого метода определяется изучением условий, необходимых для его реализации. Это тем более важно для культуры изолированных органов, тканей и клеток, которые очень чувствительны к малейшим изменениям внешних условий. Для определения оптимальных условий культивирования и управления морфогенезом того или иного объекта *in vitro*, необходимо оценить морфогенетический потенциал культивируемых тканей и определить факторы, влияющие на эффективность регенерации.

Основными факторами, определяющими процесс органогенеза, являются: эпигенетические характеристики клеток экспланта, физиологическое состояние интактных растений, сроки изоляции экспланта, состав питательной среды и условия культивирования [8]. Известно, что одним из существенных факторов, влия-

ющих на поддержание устойчивой пролиферирующей культуры, является состав питательной среды. Для оптимизации стадии размножения используют различные питательные среды, подбирают концентрации и комбинации регуляторов роста [2, 10].

Важнейшей задачей генетического банка *in vitro* является поддержание генетической аутентичности сохраняемых таксонов, а также их всестороннее изучение. Использование современных молекулярно-генетических методов исследования генетической вариабельности не только позволяет контролировать стабильность хранящихся *in vitro* образцов, но также дает возможность для быстрой и точной идентификации видовой подлинности вновь поступающих растений и молекулярного маркирования растений на популяционном уровне [2, 20].

Методические приемы хранения, существующие на сегодня, делятся на две группы. Одна из этих групп основывается на хранении культур без нарушения процесса роста, тогда как вторая – на хранении либо при замедлении роста, либо при полной его остановке (криоконсервации) [41]. Одним из наиболее доступных и широко используемых способов сохранения генофонда растений является культивирование регенерантов в условиях замедленного роста. Это способ позволяет поддерживать биологический материал от нескольких месяцев до 2–3 лет без субкультивирования в зависимости от используемой технологии и вида растения [2]. Замедление роста обычно достигается за счет модификации сред или условий культивирования. Модификации сред включают изменение концентраций минеральной основы, сахарозы, регуляторов роста и добавление осмотически активных веществ [30]. Из физических факторов культивирования снижают температуру и уменьшают интенсивность освещения. Сроки и специфика условий хранения растительного материала определяются биологическими особенностями конкретных таксонов. В процессе исследований показано, что совместное использование оптимальных показателей интенсивности освещения, состава питательной среды, концентрации осмотиков и ретардантов значи-

тельно увеличивало как период субкультивирования, так и жизнеспособность эксплантов в процессе хранения *in vitro* [8, 30].

Культивирование *in vitro* клеток, тканей и органов растений с помощью периодических пересадок на свежие питательные среды даже в режиме депонирования имеет свои проблемы и недостатки, связанные, прежде всего, с существованием некоторой вероятности потери образцов из-за реинфицирования и возможности появления соматоклональных вариантов [16, 39]. Поэтому для снижения затрат на долговременное содержание коллекций ценного растительного материала *in vitro* и для уменьшения вероятности потерь ценных образцов в настоящее время в странах – членах ФАО, в том числе и в Российской Федерации, широко используют криосохранение [13, 38]. Метод криоконсервации позволяет поддерживать живые клетки, ткани, культуры при ультранизких температурах (–196 °C) без генетических изменений, обеспечивает хранение биологических материалов в течение длительного времени, так как при температуре жидкого азота прекращаются метаболическая активность и деление клеток. Кроме того, криоконсервация не требует больших помещений, образцы не подвергаются риску контаминации или ошибок оператора, что возможно при частых манипуляциях с растительным материалом [25, 26]. В настоящее время криоконсервация считается единственной приемлемой технологией для долговременного, надежного, низкзатратного хранения различных категорий растительного материала, включая неортодоксальные семена, зиготические и соматические эмбриониды, суспензионные клетки, каллусы, протопласты, гаметы и меристемы [30].

Методы создания криоколлекций генетических ресурсов растений для долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых культурных растений стали использоваться относительно недавно. Так, первые успешные опыты по криоконсервации черенков тутовника (*Morus nigra* L.) были проведены с использованием метода медленного замораживания [42]. Около 65 лет назад были разработаны первые методы программного (медленного) заморажи-

вания растительных объектов, к более современным относятся методы быстрого замораживания: инкапсуляции-дегидратации, витрификации, инкапсуляции-витрификации, дроплет-метод, дроплет-витрификации. Все эти методы применяются для криоконсервации образцов полевых генбанков и образцов *in vitro* коллекций [13]. Технологии криоконсервации быстро развивались и в настоящее время широко используются для разных таксономических групп растений [22, 23, 28, 33–36, 44].

Методы криоконсервации продолжают совершенствоваться в направлениях упрощения исполнения и повышения результативности показателей посткриогенного восстановления растительного материала.

Преимуществом криоконсервации образцов *in vitro* коллекций является возможность долгосрочного хранения при сверхнизких температурах эксплантов оздоровленных растений [4]. В системе *in vitro* в качестве эксплантов для криоконсервации используют апикальные меристемы, вегетативные почки, апексы побегов микрорастений, зародыши (половые и соматические), каллусы, клеточные суспензии, протопласты [12, 27, 43, 44]. Криоконсервацию каллусов и клеточных суспензий, протопластов проводят в основном для сохранения коллекций биопродуцентов, например, женьшеня [12, 22].

В подавляющем большинстве работ по криоконсервации больших выборок образцов одного и того же вида, одного и того же уровня плоидности и общего эколого-географического происхождения установлено существенное влияние генотипических отличий на способность к посткриогенному восстановлению [14, 22, 32]. Однако крупных представительных криоколлекций в мире не так много. В частности, коллекция National Center for Genetic Resources Preservation, США [17] насчитывает 2200 таксонов в криобанке, в Network for the Improvement of Banana and Plantain (в настоящее время – Biodiversity International), Бельгия [31] – 1536, в International Potato Center, Перу – около 1533 таксонов [18].

В России Криобанк Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева (г. Москва) ор-

ганизован более 30 лет назад и был одним из первых в мире. Здесь разработан метод криосохранения меристем картофеля. В настоящий момент Криобанк Института состоит из 6 криоколлекций, в которых сохраняют более 1000 образцов растительного материала: 15 штаммов суспензионных культур клеток, 58 сортов плодовых и ягодных культур, а также семена 416 видов из 54 семейств высших растений. Кроме того, в криобанке хранятся штаммы-продуценты вторичных метаболитов – культуры клеток различных видов женьшеня, полисциаса, люцерны, диоскореи [7].

В криобанке Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (г. Санкт-Петербург) сохраняется 220 образцов культурных сортов картофеля и 17 образцов малины и ежевики, каждый образец представлен 90 эксплантами (в 9 криопробирках) с известным уровнем посткриогенной регенерации [13]. Всего в коллекции криобанка Института находятся 1824 образца ряда вегетативно размножаемых культур и 216 образцов апикальных меристем картофеля; поддерживается 750 образцов *in vitro* коллекции; 2687 образцов ДНК.

В дальнейшем на национальном и международном уровнях планируется создание новых и укрепление существующих генетических банков растений *in vitro* и представительных криоколлекций с высоким уровнем посткриогенной регенерации образцов, представляющих меж- и внутривидовое разнообразие культивируемых растений (Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Институт цитологии и генетики СО РАН и ряд других). Предполагается создать ДНК-банк редких и исчезающих видов растений, подкрепленный гербарными образцами и единую интерактивную базу данных по генетическим коллекциям в различных ботанических садах.

Работа выполнена в рамках государственного задания ГБС РАН «Биологическое разнообразие природной и культурной флоры: фундаментальные и прикладные вопросы изучения и сохранения» (Регистрационный № 122042700002-6).

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М., 1999. 160 с.
2. Ветчинкина Е.М., Ширнина И.В., Ширнин С.Ю., Молканова О.И. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro* // Вестник Балтийского государственного университета им. И. Канта. 2012. Вып. 7. С. 109–118.
3. Виноградова Ю.К., Горбунов Ю.Н., Макридин А.И., Молканова О.И. Разработка принципов сохранения и воспроизводства генетических фиторесурсов // Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. С. 343–351.
4. Гавриленко Т.А., Дунаева С.А., Трускинов Э.В., Антонова О.Ю., Пендинен Г.И., Лупышева Ю.В., Роговая В.В., Швачко Н.А. Стратегия долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2007. Т. 164. С. 273–285.
5. Новикова Т.И., Дорогина О.В. Сохранение редких и исчезающих видов флоры Сибири методами *ex situ* // Труды Томского государственного университета. Серия биологическая. Т. 274: Ботанические сады. Проблемы интродукции. Томск, 2010. С. 276–278.
6. Новикова Т.И. Использование биотехнологических подходов для сохранения биоразнообразия растений // Растительный мир Азиатской России. 2013. N 2(12). С. 119–128.
7. Носов А.М., Юрин В.М., Спиридович Е.В., Высоцкая О.Н., Решетников В.Н. Биотехнологические коллекции растений и криобанки – важная часть Национального банка-депозитария живых систем // Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира. Материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (г. Минск, 6–8 июня 2017 г.). Ч. 2. Минск: Медисонт, 2017. С. 284–290.
8. Молканова О.И. Генетические банки растений в ботанических садах России // Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада. 2009. Т. 131. С. 22–27.
9. Молканова О.И., Коновалова Л.Н., Стахеева Т.С. Особенности размножения и сохранения коллекции ценных и редких видов растений в условиях *in vitro* // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. 2016. Вып. 120. С. 17–23.
10. Молканова О.И. Использование биотехнологических методов для размножения и сохранения редких видов растений // Бюллетень Главного ботанического сада. 2017. N 1(203). С. 42–48.
11. Молканова О.И., Мамаева Н.А., Крахмалева И.Л., Королева О.В., Орлова Н.Д. Формирование и сохранение генетического банка *in vitro* ГБС РАН // Ботанические сады как центры сохранения биоразнообразия и рационального использования растительных ресурсов. Сборник статей Всероссийской научной конференции с международным участием (г. Москва, 21–25 июля 2025 г.). М., 2025. С. 140–144.
12. Попов А.С. Криосохранение растений и их клеток // Ветеринарная патология. 2008. N 2(25). С. 158–160.
13. Ухатова Ю.В., Гавриленко Т.А. Методы криоконсервации вегетативно размножаемых культурных растений // Биотехнология и селекция растений. 2018. Т. 1, N 1. С. 52–63.
14. Bamberg J.B., Martin M.W., Abad J., Jenderek M.M., Tanner J., Donnelly D.J., Nassar M.K., Veilleux R.E., Novy R.G. In vitro technology at the US Potato Genebank // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 2016. Vol. 52, N 3. P. 213–225.
15. Benson E.E. Plant Conservation Biotechnology. London: Taylor and Francis, 2002. 309 p.
16. Benson E.E. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and prac-

- tice // Critical Reviews in Plant Sciences. 2008. Vol. 27, Iss. 3. P. 141–219.
17. *Biodiversity International* [Electronic resource]. URL: <https://www.promusa.org/Biodiversity+International> (accessed 01.10.2025).
18. *CIP – International potato center* [Electronic resource]. URL: <https://cipotato.org/> (accessed 01.10.2025).
19. *Cole I.B., Farooq F.T., Murch S.J.* Protocols for establishment of an *in vitro* collection of medicinal plants in the genus *Scutellaria* // *Methods in Molecular Biology*. 2009. Vol. 547. P. 155–165.
20. *Cruz-Cruz C.A., Gonzalez-Arnan M.T., Engelmann F.* Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity // *Resources*. 2013. Vol. 2, Iss. 2. P. 73–95.
21. *George E.F., Hall M.A., De Klerk G.J.* Plant Propagation by Tissue Culture. Dordrecht: Springer, 2008. Vol. 1. 358 p.
22. *Gonzalez-Arnan M.T., Martinez-Montero M.E., Cruz-Cruz C.A., Engelmann F.* Chapter 8. Advances in cryogenic techniques for the long-term preservation of plant biodiversity // *Biotechnology and Biodiversity, Sustainable Development and Biodiversity*. 2014. Vol. 4. P. 129–170.
23. *Gonzalez-Arnan M.T., Panta A., Roca W.M., Escobar R.H., Engelmann F.* Development and large-scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops // *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 2008. Vol. 92. P. 1–13.
24. *Engelmann F., Engels J.M.M.* Technologies and strategies for *ex situ* conservation // *Managing Plant Genetic Diversity*. Rome, 2002. P. 89–104.
25. *Engelmann F.* Plant cryopreservation: Progress and prospects // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2004. Vol. 40. P. 427–433.
26. *Engelmann F.* Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2011. Vol. 47. P. 5–16.
27. *Engelmann F., Takagi H. (eds.)*. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and applications. Japan, 2000. 496 p.
28. *Koroleva O.V., Molkanova O.I., Vysotskaya O.N.* Development of cryopreservation technique for meristems of *Syringa vulgaris* L. cultivars // *International Journal of Plant Biology*. 2023. Vol. 14, Iss. 3. P. 625–637.
29. *Mitrofanova I.V., Molkanova O.I.* Biotechnology strategy of plant biodiversity conservation in botanical gardens of Russia // *Acta Horticulturae*. 2020. Vol. 1298. P. 231–238.
30. *Molkanova O., Gorbunov Y., Shirnina I., Egorova D.* Collection of rare and endangered plant species in the meristem bank of the RAS Main Botanical Garden // *E3S Web Conferences*. 2021. Vol. 254: 06006.
31. *NCGR-Corvallis – Fragaria Germplasm* United States Department of Agriculture [Electronic resource]. URL: <http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=11324> (accessed 12.11.2025).
32. *Niino T., Valle Arizaga M.* Cryopreservation for preservation of potato genetic resources // *Breeding Science*. 2015, Vol. 65, N 1. P. 41–52.
33. *Nits O.S., Sementsova M.V., Osipova E.S., Tereshonok D.V., Gladkov E.A.* IPPRAS Cryobank for the Conservation of Orthodox Seeds of Rare, Endangered, Medicinal, and Ornamental Plant Species – Current Research // *Plants*. 2024. Vol. 13, N 10: 1354.
34. *Panis B., Van den Houwe I., Swennen R., Rhee J., Roux N.* Securing plant genetic resources for perpetuity through cryopreservation // *Indian Journal of Plant Genetic Resources*. 2016. Vol. 29, N 3. P. 300–302.
35. *Panis B., Lambardi M.* Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees) // *The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources. International Workshop (Turin, 5–7 March 2005)*. Rome, 2005. P. 1–12.
36. *Panta A., Panis B., Ynouye C., Swennen R., Roca W., Toy D., Ellis D.* Improved cryopreservation method for the long-term conservation of the world potato germplasm collection //

- Plant Cell Tissue Organ Culture. 2015. Vol. 120. P. 117–125.
37. Rani V., Raina S.N. Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: A critical reappraisal // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2000. Vol. 36. P. 319–330.
38. Reed B.M. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants // *CryoLetters*. 2001. Vol. 22, N 2. P. 97–104.
39. Reed B.M., Hummer K.E. Genetic stability of strawberries in culture // *Strawberry research to 2001. Proceedings of the 5th North American Strawberry Conference*. Alexandria, 2002. P. 98–101.
40. Reed B.M., Engelmann F., Dulloo E., Engels J.M.M. Technical Guidelines for the Management of Field and In Vitro Germplasm Collections. Rome, 2005. 95 p.
41. Reed B.M. Plant cryopreservation: A practical guide. New York: Springer, 2008. 496 p.
42. Sakai A. Survival of the twig of woody plants at -196°C // *Nature*. 1960. Vol. 185. P. 393–394.
43. Sarasan V., Cripps R., Ramsay M.M., Atherton C., Mcmichen M., Prendergast G., Rowntree G.K. Conservation in vitro of threatened plants-Progress in the past decade // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2006. Vol. 42. P. 206–214.
44. Wang B., Wang R.R., Cut Z.K., Bi W.L., Li J.W., Li B.Q., Ozudogru E.A., Volk G.M., Wang Q.C. Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication // *Biotechnology Advances*. 2014. Vol. 32. P. 583–595.

Поступила в редакцию: 15.11.2025

UDC 57.085.23

BIOTECHNOLOGICAL METHODS AND CRYOPRESERVATION OF PLANTS (REVIEW)

O.I. Molkanova, E.V. Mishanova

*Federal State Budgetary Institution for Sciences
Tsitsin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences*

Preserving the genetic diversity of plant resources is the main task of botanical gardens and other scientific research centers. The biotechnological method is considered one of the most effective and at the same time reproducible ways to preserve the plant gene pool. The cryopreservation method makes it possible to maintain living cells, tissues, and cultures at ultra-low temperatures (-196°C) without genetic changes, it ensures the storage of biological materials for a long time. The article provides an overview of the main directions in the field of biotechnology and cryopreservation of plants.

Key words: biotechnology, conservation of biodiversity, gene bank *invitro*, clonal micropropagation

Citation: Molkanova O.I., Mishanova E.V. Biotechnological methods and cryopreservation of plants (Review) // *Industrial botany*. 2025. Vol. 25, N 4. P. 60–66. DOI: 10.5281/zenodo.17800789