

УДК 578:581.5(470.62)

UDK 578:581.5(470.62)

**ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*  
НЕКОТОРЫХ РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ  
ВИДОВ ФЛОРЫ ЗАПАДНОГО КАВКАЗА**

**INTRODUCTION OF SOME RARE AND  
ENDANGERED SPECIES OF WESTERN  
CAUCASUS FLORA TO *IN VITRO* CULTURE**

Соколов Роман Николаевич  
аспирант, м.н.с.

Sokolov Roman Nikolayevich  
Postgraduate student, junior research assistant

Коломиец Татьяна Михайловна  
к.с.-х.н, ст.науч.сотр

Kolomijets Tatyana Mikhailovna  
Cand.Agr.Sci., senior research assistant

Маляровская Валентина Ивановна  
к.б.н, заб.лаб.

Malyarovskaya Valentina Ivanovna  
Cand.Biol.Sci., Head of the Laboratory

*Государственное научное учреждение  
Всероссийский научно-исследовательский  
институт цветоводства и субтропических  
культур Россельхозакадемии, Сочи, Россия*

*All-Russian Scientific and Research Institute of  
Floriculture and Subtropical Crops of the Russian  
Academy of Agricultural Sciences, Sochi, Russia*

Разработаны приемы стерилизации и введения в культуру *in vitro* исчезающих видов растений Кавказской флоры: *Campanula sclerophylla* Kolak., *Lilium caucasicum* Misch. ex Grossh., *Daphne woronowii* Kolak., *Pancratium maritimum* L. Изучено влияние различных фитогормонов, их сочетаний и концентраций на процессы регенерации, роста и развития растений. В результате клонального размножения в культуре ткани сохраняется более ста растений колокольчика твердолистного (*Campanula sclerophylla* Kolak), около 30 растений панкрация морского (*Pancratium maritimum* L.) и 150 образцов лилии кавказской (*Lilium caucasicum* Misch. ex Grossh)

There were developed some methods of sterilization and introduction of the following endangered species of Caucasian flora to *in vitro* culture: *Campanula sclerophylla* Kolak., *Lilium caucasicum* Misch. ex Grossh., *Daphne woronowii* Kolak., *Pancratium maritimum* L.. The effect of different plant hormones as well as their combinations and concentrations on the regeneration, growth and development of plants is studied. As a result of clonal propagation, more than 100 plants of *Campanula sclerophylla* Kolak, about 30 plants of *Pancratium maritimum* L., and 150 samples of *Lilium caucasicum* Misch. Ex Grossh are saved in tissue culture

Ключевые слова: CAMPANULA SCLEROPHYLLA, LILIUM CAUCASICUM, DAPHNE WORONOWII, PANCRATIUM MARITIMUM, IN VITRO, СТЕРИЛИЗАЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ, МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ

Keywords: CAMPANULA SCLEROPHYLLA, LILIUM CAUCASICUM, DAPHNE WORONOWII, PANCRATIUM MARITIMUM, IN VITRO, DECONTAMINATION, REGENERATION, MICROPROPAGATION

**ВВЕДЕНИЕ**

Сохранение биологического разнообразия — одна из важнейших задач в деле охраны природы, которой уделяют большое внимание во всем мире. Связано это с ограниченностью необходимых для существования человека биологических ресурсов и угрозой их истощения. Важность сохранения биоразнообразия осознана людьми, как на планетарном, так и на национальном уровнях. Об этом свидетельствует принятая на Генеральной ассамблее Международного союза биологических наук при поддержке ЮНЕСКО Международная программа "DIVERSITAS"[17] и

Международная Конвенция о сохранении биологического разнообразия [6]. Последняя была ратифицирована Россией в 1995 году, и на ее основе была подготовлена российская государственная научно-техническая программа "Биологическое разнообразие"[25].

Вышеперечисленные программные документы предлагают в качестве мер по сохранению биоразнообразия, в частности разнообразия флоры, использование методов *ex situ* (создание ботанических садов, хранилищ зародышевой плазмы и др.) и *in situ* (образование на территории государств заповедников, заказников и других природоохранных зон). Но, наряду с традиционными способами сохранения растений *ex situ* и *in situ*, все большее значение приобретает использование для этих целей методов биотехнологии, в частности, методик культивирования изолированных тканей и органов. Созданием коллекций *in vitro* исчезающих и редких видов занимаются в Индии [18]; в США [22]; в Великобритании [15, 20, 23, 24]; в Австралии — [16], и в целом ряде других стран.

В России исследования по проблемам сохранения растительного разнообразия методами культуры тканей проводятся в Главном ботаническом саду им. Н.В. Цицина [3], Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН [10], в Волгоградском региональном Ботаническом саду [1], Алтайском государственном университете [4] и других научных заведениях.

На Черноморском побережье Западного Кавказа также повсеместно отмечается нарушение режима функционирования и деградация древних природных сообществ. В связи с этим, актуальными являются исследования по разработке методов сохранения растений, численность популяций которых резко падает, а также уникальных слабоизученных форм, способных в будущем расширить и улучшить сортимент возделываемых культур. Широко используемые методы сохранения исчезающих видов флоры, такие как создание особо охраняемых

природных территорий и сохранение редких видов в ботанических садах не всегда способны в полной мере обеспечить сохранность исчезающих генотипов растений, и современное экологическое состояние района проведения XXII Зимних Олимпийских игр лучшее тому подтверждение [11].

В 2003—2007 гг. в ГНУ ВНИИЦиСК Россельхозакадемии были проведены исследования по разработке методик клонального микроразмножения некоторых эндемичных видов флоры Западного Кавказа: *Campanula longistyla* Fomin., *C. alliarifolia* Willd., *C. latifolia* L., *C. taurica* Juz., *C. bzybica* [5], *Crocus speciosus* Vieb. [14]. В настоящее время работа в этом направлении продолжается.

В связи с вышесказанным нами поставлена цель — создать резервную медленнорастущую коллекцию редких, эндемичных и исчезающих видов растений Западного Кавказа для сохранения их от вымирания, последующего изучения и вовлечения в хозяйственную деятельность. На начальном этапе исследований решали следующие задачи:

- определить оптимальные режимы стерилизации;
- изучить особенности развития различных типов эксплантов в культуре *in vitro*;
- оптимизировать составы питательных сред для введения растений в стерильную культуру и их размножения.

Необходимо отметить, что регенерация растений может быть осуществлена несколькими путями:

- через активацию уже существующих меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля);
- через индукцию возникновения почек и эмбриоидов *de novo*, которая включает:
  - а) образование побегов непосредственно тканями экспланта;

б) индукцию прямого или непрямого соматического эмбриогенеза;  
в) дифференциацию адвентивных почек в каллусной ткани [13].  
Предпочтительными для достижения цели данной работы являются способы регенерации, исключающие формирование каллусной ткани, при этом обеспечивающие наибольшую генетическую стабильность микропобегов [9].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследований для введения в культуру *in vitro* выбирали в соответствии со следующими критериями:

1. Принадлежность вида к одной из наиболее уязвимых категорий редкости, принятых в Красных книгах России [8] и Краснодарского края [7];
2. Практическая ценность видов (декоративность, лекарственная ценность) или их слабая изученность;
3. Затруднения в размножении традиционными способами.

На основе указанных критериев были выбраны 4 вида западно-кавказской флоры, различающиеся по статусу редкости (исчезающие, эндемичные, редкие): *Campanula sclerophylla* Kolak. (*Campanulaceae*), *Lilium caucasicum* Misch. ex Grossh. (*Liliaceae*), *Daphne woronowii* Kolak. (*Thymelaeaceae*), *Pancratium maritimum* L. (*Amaryllidaceae*).

Подготовку эксплантов и введение их в культуру *in vitro* производили в стерильных условиях согласно общепринятым рекомендациям [2]. В процессе введения в культуру необходимо было оптимизировать стерилизацию эксплантов изучаемых растений в зависимости от их происхождения. Нами было опробовано действие различных дезинфицирующих агентов: гипохлорита натрия, этанола и нехлорсодержащего препарата «Велтолен» (активное начало — клатрат карбомид дидецилдиметиламмоний).

В качестве эксплантов *Campanula sclerophylla* использовали существующие меристемы вегетирующих растений. Каудексы<sup>1</sup> освобождали от листьев, после чего промывали в проточной воде, а затем, в течении 5 минут в слабом растворе перманганата калия. После этого растительный материал снова промывали проточной водой. Далее изучали влияние различных стерилизующих составов: 10 % (V/V) раствор гипохлорита натрия и 0,2 % раствор «Велтолена» при экспозиции 10 и 15 минут. Таким образом, было испытано четыре варианта способов обеззараживания эксплантов. После стерилизации и отмывки дезинфицирующих средств, в ламинар-боксе при помощи скальпеля отделяли меристемы и помещали их в пробирки с питательной средой. Для введения в культуру *in vitro* *Campanula sclerophylla* в первом пассаже использовали питательную среду Ван-Гоофа [26]. В процессе микроразмножения данного вида применяли среду *Murashige, Skoog* — (MS) [21] содержащую половинные количества макроэлементов и дополненную различными регуляторами роста цитокининовой и ауксиновой природы.

Стерилизация эксплантов *Daphne woronowii* проходила в два этапа: сначала апикальные и пазушные почки взрослых растений на несколько секунд погружали в 80 % раствор этанола для обезжиривания поверхности, а затем в основной стерилизующий состав (гипохлорит натрия или «Велтолен») на разное время. Опытным путем было изучено четыре варианта стерилизации: два обеззараживающих раствора по 5 и 10 минут экспозиции. Для введения в культуру *Daphne woronowii* использовали среду WPM (Woody Plant Media) [19] с добавлением 0,2 мг/л  $\alpha$ -НУК и 0,5 мг/л 6-БАП и концентрацией сахарозы 20 г/л.

---

<sup>1</sup> Каудекс- утолщенное подземное или отчасти надземное образование, лишенное листьев, формирующееся из коротких оснований побегов. В отличие от корневищ каудекс не отмирает в своей нижней части, а переходит в многолетний корень.

В качестве эксплантов *Lilium caucasicum* использовали различные части чешуй луковиц. Стерилизацию также проводили в два этапа. Сначала промытые части чешуй погружали в 96 % этанол на 1 мин., далее их переносили в основной дезинфицирующий раствор, в качестве которого использовали «Велтолен» 2 % или гипохлорит натрия 50 %. Также изучали влияние продолжительности действия стерилизующих веществ на обеззараживание растительного материала. Всего в опыте было шесть вариантов процесса стерилизации: два типа растворов («Велтолен» и гипохлорит натрия) по 5, 10 и 15 минут экспозиции. Для введения в культуру и индукции образования адвентивных почек у лилии кавказской применяли среды MS и ½ MS и несколько вариантов сочетаний ауксинов и цитокининов.

Для введения в стерильную культуру *Panocratium maritimum* использовали вызревшие семена, которые промывали в проточной воде 30 минут, затем погружали в слабый раствор перманганата калия на 10 минут, после чего дезинфицировали 30 минут в 10% растворе «Доместос». Далее снимали с семян губчатую оболочку и помещали на питательную среду MS, дополненную регуляторами роста: α-нафтилуксусной кислотой (α-НУК), 6-бензиламинопурином (6-БАП), индолилмасляной кислотой (ИМК) и аденином.

Содержание сахарозы в среде для культивирования *Campanula sclerophylla* составляло 20 г/л, в среде для индукции побегообразования у *Lilium caucasicum* — 30 г/л, в среде для размножения *Lilium caucasicum* — 20 г/л. Концентрация агар-агара во всех средах составляла 5 г/л. Регуляторы роста и витамины стерилизовали фильтрованием (Millipore, 0,22 мкм) и добавляли в остывшую среду после автоклавирования.

В условиях лаборатории растения *Campanula sclerophylla* и *Panocratium maritimum* выращивали при искусственном освещении (5000 лк) и фотопериоде 16/8ч., температуре 23-25 °С и влажности 70%.

Экспланты *Lilium caucasicum* и *Daphne woronowii* культивировали в темноте в течение 4 недель для инициации ростовых процессов, после чего переносили в культуральную комнату с условиями, аналогичными культивированию *Campanula sclerophylla*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении влияния стерилизующих веществ (гипохлорит натрия, Велтолен) на процесс обеззараживания меристем *Campanula sclerophylla* установлено, что лучший результат стерилизации был достигнут с применением препарата «Велтолен» 0,2 % в течение 10 минут экспозиции. Гипохлорит натрия вызывал некрозы нежных меристематических тканей (табл. 1).

Таблица 1— Стерилизация эксплантов на этапе введения в культуру *in vitro* *Campanula sclerophylla*

Стерилизующий раствор	Время экспозиции, мин	Число эксплантов, шт	Число стерильных эксплантов, шт
Гипохлорит Na, 10%	10	6	1
Гипохлорит Na, 10%	15	6	1
Велтолен 0,2 %	10	6	4
Велтолен 0,2 %	15	6	3

Дальнейшее культивирование полученных микропобегов *Campanula sclerophylla* на питательной среде  $\frac{1}{2}$  MS показало, что добавление ауксина ИУК 0,1 мг/л и цитокинина 6-БАП 3,0 мг/л наиболее благоприятно влияло на их микроразмножение и позволило получить из одного растения до семи меристематических клонов (табл. 2, рис. 1).

Таблица 2— Коэффициент размножения микропобегов *Campanula sclerophylla*, в зависимости от типа питательной среды и фитогормонов

Питательная среда	Максимальное число меристематических клонов, шт	Среднее число меристематических клонов, шт
1/2МС БАП 2,0+ИУК 0,5	3	2,1±0,5
1/2МС БАП 3,0+ИУК 1,0	7	5±0,7
1/2МС КИН 2,0+ИУК 0,5	4	1,7±0,6
1/2МС КИН 3,0+ГК 0,5	3	1,4±0,3
ВГ БАП 2,0+ИУК 0,5	2	1,2±0,2
ВГ БАП 3,0+ИУК 1,0	2	1,3±0,3
ВГ КИН 2,0+ИУК 0,5	3	1,5±0,3
ВГ КИН 3,0+ГК 0,5	2	1,1±0,2

Укоренение растений проводили на среде 1/2 MS дополненной 0,5 мг/л ИУК. При этом растения образовывали хорошую корневую систему, необходимую для дальнейшей адаптации к нестерильным условиям (рис. 1). К настоящему моменту в коллекции *in vitro* имеется более 100 образцов *Campanula sclerophylla*, их размножение и укоренение продолжается.



Рисунок 1. *Campanula sclerophylla* на этапах введения в культуру (А), образования микропобегов (Б), микроразмножения (В) и укоренения (Г).

Для *Lilium caucasicum* также был определен оптимальный режим стерилизации. Опыт показал, что «Велтолен» оказался намного эффективнее гипохлорита натрия (рис. 2). При использовании «Велтолена» в концентрации 2,0 % и экспозиции 10 минут выход стерильных эксплантов составил  $66,7 \pm 8,6$  %, при этом практически отсутствовали некрозы тканей, и не было ни одного бактериального заражения. Гипохлорит натрия в концентрации 50 %, напротив, «обжигал» экспланты, увеличивая этим вероятность дальнейшего развития на них каллусной ткани.

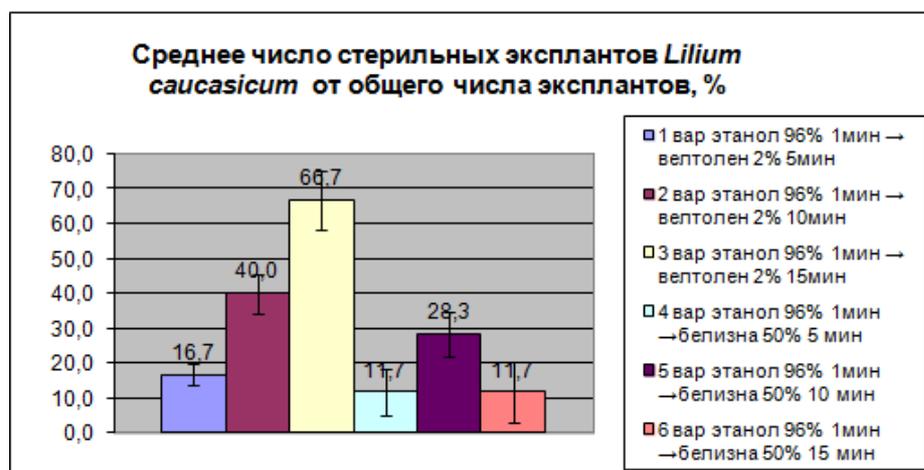


Рисунок 2. Выход стерильных эксплантов *Lilium caucasicum* в зависимости от типа стерилизующего вещества и экспозиции

В процессе культивирования *Lilium caucasicum* наблюдались различные пути образования органов и тканей *de novo*, в зависимости от типа экспланта. Для индукции ростовых процессов использовали среду 1/2МС дополненную 1мг/л НУК и 3 мг/л 6-БАП и три типа эксплантов: базальные, медиальные и апикальные части чешуй лукович. На начальном этапе культивирования из базальных частей чешуй развивались преимущественно адвентивные побеги, реже происходили каллусогенез и образование корней, при этом эксплантов, не давших ответной реакции, не наблюдалось (табл. 3).

Медиальные части чешуй развивались по пути образования корней с той же частотой, что и базальные, а развитие по интересующему нас пути образования адвентивных почек и каллусообразования происходило значительно реже. Ответная реакция на условия *in vitro* апикальных частей чешуй была невысокой, причем развитие эксплантов происходило в базальной их части и характеризовалось преимущественно дедифференцировкой клеток и развитием каллусной ткани.

Таблица 3— Развитие разных эксплантов *Lilium caucasicum* через 48 дней после введения в культуру *in vitro*

Тип экспланта	Число эксплантов, шт	Корнеобразование, шт	Индукция адвентивных почек, шт	Каллусогенез, шт	«Безответные» экспланты, шт
Базальная часть	45	13±1,07	20±0,53	12±0,92	0
Медиальная часть	45	13±1,92	15±1,60	9±0,92	8±1,07
Апикальная часть	45	2±0,53	3±0,92	7±1,07	33±0,92

Впоследствии при пассировании каллусов на среду MS с добавлением 2 мг/л ауксина 2,4-D (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) наблюдали формирование морфогенных зон и развитие микролуковичек в очагах интенсивного органогенеза (рис. 3).

При этом частота образования регенерантов из каллуса была значительно выше, чем при индукции адвентивных почек. Однако они могут генетически отличаться от материнских растений. Дальнейшие молекулярно-генетические и кариологические исследования позволят сделать выводы относительно генетической однородности полученных

через стадию образования каллуса растений-регенерантов и возникновения соматклональных вариаций.

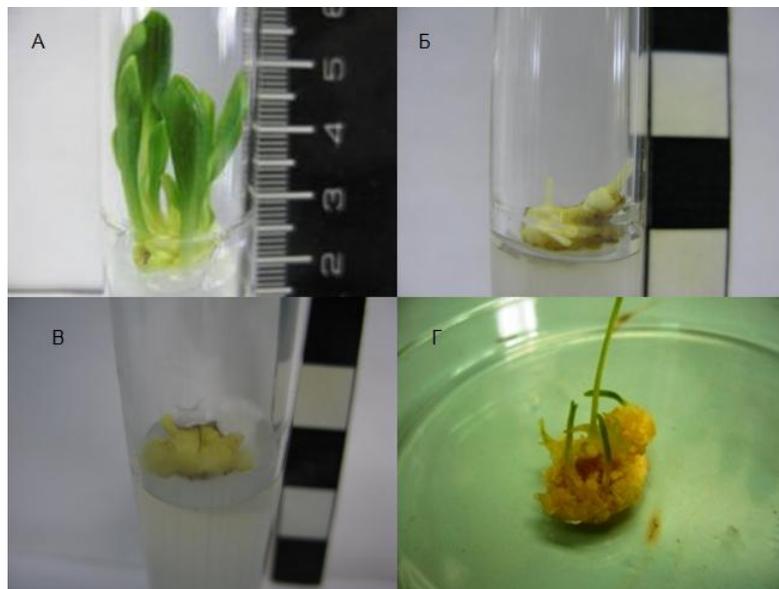


Рисунок 3. Развитие эксплантов *Lilium caucasicum*: А) Адвентивные побеги; Б) Корнеобразование; В) Каллусогенез; Г) Образование микролуковиц из каллусной ткани

В опыте по стерилизации *Daphne woronowii* еще раз была подтверждена эффективность средства «Велтолен» для обеззараживания растительных эксплантов по сравнению с гипохлоритом натрия. Максимальная эффективность (88,9 %) его использования достигнута при экспозиции 15 минут (рис. 4).

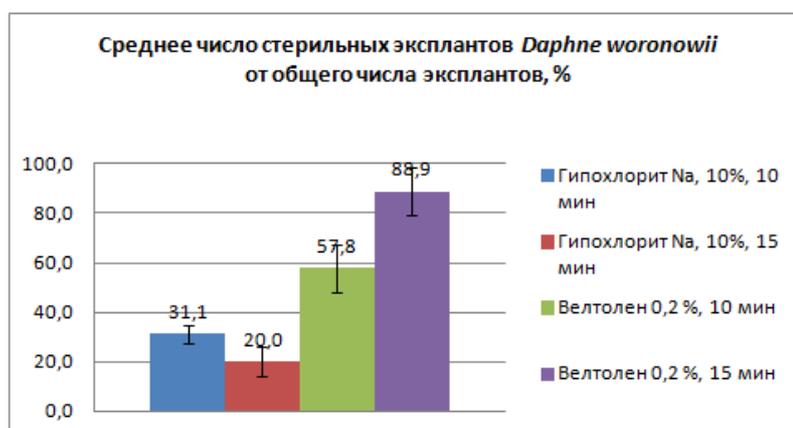


Рисунок 4. Выход стерильных эксплантов *Daphne woronowii*, в зависимости от типа стерилизующего вещества и экспозиции.

После инокуляции на среду WPM, дополненную 0,2 мг/л  $\alpha$ -НУК и 0,5 мг/л 6-БАП почки *Daphne woronowii* поместили в темноту для инициации ростовых процессов и через 4 недели наблюдали первые микропобеги (рис. 5).



Рисунок 5. Введение в культуру *Daphne woronowii* с использованием среды WPM

Культивирование семян *Pancratium maritimum* показало, что срок наступления их массового прорастания незначительно изменялся на разных вариантах питательных сред. Наибольшее значение он принимал при добавлении в среду только ауксина ИМК, без цитокининов и составлял 8 дней. На рисунке 6 показано развитие семян в культуре (рис. 6).

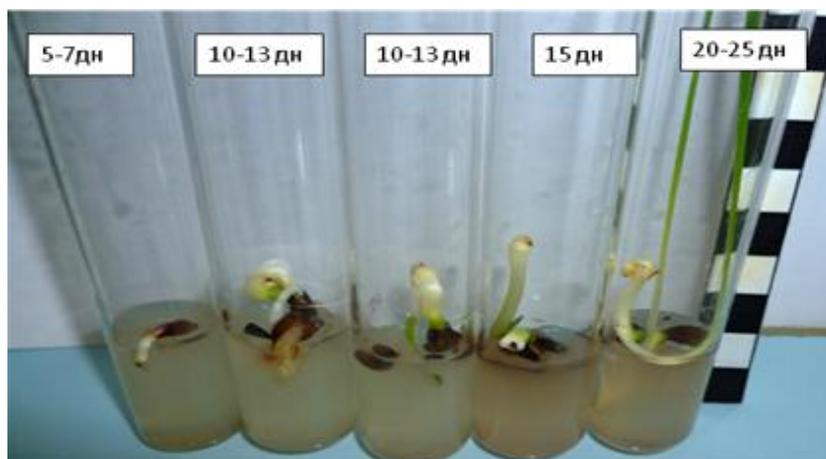


Рисунок 6. Прорастание и развитие *Pancratium maritimum in vitro* на среде MS

Существенные различия отмечены по массе растений и количеству образовавшихся микролуковиц при использовании разных регуляторов роста (табл. 4).

Таблица 4. Влияние регуляторов роста (мг/л) на массу регенерантов и количество микролуковиц у панкрация морского спустя 30 дней после инокуляции

Параметры роста	Сочетание фитогормонов		
	БАП 0,25мг/л + ИМК 0,5мг/л	БАП 2мг/л + ИМК 0,5мг/л	ИМК 0,5мг/л
Масса регенеранта, г	0,99±0,39	0,45±0,17	2,23±0,54
Кол-во микролуковиц, шт	2,59±0,92	—	4,43±1,08

Следует заметить, что при последующих пассажах на свежую среду зелёную часть побегов обрезали, после чего наблюдали нарастание основной луковицы и, в некоторых случаях, появление микролуковичек. На питательной среде, содержащей 6-БАП 2 мг/л + ИМК 0,5 мг/л микролуковицы на корнях не образовывались, корневая система развивалась медленно, и масса растений не превышала 600 мг. При понижении концентрации 6-БАП отмечали появление 3-4 микролуковиц, и увеличение массы растений почти в два раза. Максимальное количество микролуковиц наблюдалось на среде, содержащей только ауксин ИМК (без 6-БАП), и составляло 4-5 штук [12].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

— наиболее эффективной является стерилизация: меристем *Campanula sclerophylla* «Велтоленом» 0,2 % в течение 10 минут, чешуй *Lilium caucasicum* «Велтоленом» 2 % в течение 10 минут после погружения в 96 % этанол на 1 минуту, апикальных и пазушных почек *Daphne*

*woronowii* «Велтоленом» 0,2 % в течение 15 минут, семян *Pancreaticum maritimum* «Доместосом» 10 % в течение 30 минут;

— оптимальной средой для микроразмножения *Campanula sclerophylla* оказалась  $\frac{1}{2}$  MS, дополненная 3 мг/л 6-БАП и 1 мг/л ИУК;

— при культивировании *Daphne woronowii* на среде WPM, дополненной 0,2 мг/л  $\alpha$ -НУК и 0,5 мг/л 6-БАП были получены микропобеги;

— для индукции образования адвентивных почек *de novo* у *Lilium caucasicum* оптимальным типом эксплантов являются базальные части чешуй луковицы. При культивировании на питательной среде  $\frac{1}{2}$  MS, дополненной 1 мг/л НУК и 3 мг/л 6-БАП из них развивалось наибольшее количество микропобегов. Добавление в среду MS 2 мг/л ауксина 2,4-D способствовало формированию морфогенного каллуса из которого развивались растения-регенеранты;

— максимальное количество микролуковиц *Pancreaticum maritimum*, до 5 штук на растение, наблюдалось на среде MS с добавлением ИМК 0,5 мг/л.

Исследования проведены при финансовой поддержке РФФИ (грант № 13-04-96572)

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеева С. Е. и др. Сохранение биоразнообразия редких и исчезающих видов растений в Волгоградском региональном Ботаническом саду // Вестник БФУ им. И. Канта. — 2012. №7. — С.103-109.
2. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. — М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. — 158 с.
3. Ветчинкина Е. М. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro* // Вестник БФУ им. И. Канта. — 2012. №7. — С.109-118.
4. Вечернина Н. А. Сохранение биологического разнообразия редких, исчезающих видов, уникальных форм и сортов растений методами биотехнологии: Дис. докт. биол. наук: 03.00.05 / Алтайский гос. ун-т. Барнаул, 2006. 325 с.
5. Евсюкова Т. В., Коломиец Т. М. Некоторые аспекты сохранения генофонда кавказских видов колокольчиков.// Научные основы развития цветоводства России и проектирование садовых ландшафтов. — М: ГНУ ВСТИСЛ, 2006, С. 94-97.

6. Конвенция о биологическом разнообразии [Электронный ресурс]: Конвенция о биологическом разнообразии — Конвенции и соглашения — Декларации, конвенции, соглашения и другие правовые материалы.— 2013. Режим доступа: [http://www.un.org/ru/documents/decl\\_conv/conventions/biodiv.shtml](http://www.un.org/ru/documents/decl_conv/conventions/biodiv.shtml), свободный.
7. Красная книга Краснодарского края. Том Растения и грибы. — Краснодар: ООО «Дизайн Бюро № 1», 2007. — 489 с.
8. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / Министерство природных ресурсов и экологии РФ; Федеральная служба по надзору в сфере природопользования; РАН; Российское ботаническое общество; МГУ им. М. В. Ломоносова; Гл. ред.колл.: Ю. П. Трутнев и др.; Сост. Р. В. Камелин и др.— М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008.— 885 с.
9. Кунах, В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Физиология растений. — М.: Наука, 1999. — № 6. — С. 919-929.
10. Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального сибирского ботанического сада //Вестник ВОГиС.— 2008, Том 12, № 4. —С. 564-571.
11. Отчёт «Комплексное экологическое обследование особо охраняемых природных территорий регионального значения в целях снятия с них статуса особо охраняемой природной территории в связи с утратой ими своей ценности...» 2013 г. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://ewnc.org/files/oopt-kk/sochi-oopt.pdf>, свободный.
12. Самарина Л.С. Сохранение *in vitro* исчезающего псаммофита черноморского побережья России *Pancratium maritimum*. / Л.С Самарина, Т.М. Коломиец, Н.А. Слепченко// Субтропическое и декоративное садоводство: сб. науч. тр. / ГНУ ВНИИЦиСК Россельхозакадемии.— 2012. Вып. 47.— С.172-177.
13. Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб. / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, С.В. Дегтярев и др.: Под ред. В.С. Шевелухи. — М.: Высш. шк.,1998. —415 стр.
14. Тибилев А.А. Методические рекомендации по клональному микроразмножению шафрана прекрасного в культуре *in vitro*. — М: Россельхозакадемия, 2003, 9 с.
15. Barnicoat H., Cripps R., Kendon J., Sarasan V. Conservation *in vitro* of rare and threatened ferns - case studies of biodiversity hotspot and island species/ *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, —2011. № 47. — P.37-45.
16. Coates D. J., Dixon K. W. Current perspectives in plant conservation biology./ *Australian Journal of Botany* №55(3) P.187—193 <http://dx.doi.org/10.1071/BT07037> Published online: 18 May 2007.
17. DIVERSITAS, Mission and History. [Электронный ресурс]: Mission and History; DIVERSITAS.— 2011. Режим доступа: <http://www.diversitas-international.org/about/mission-and-history>, свободный.
18. Edison S., Unnikrishnan M., Vimala B., Santha V.. Biodiversity of Tropical Tuber Crops in India. NBA Scientific Bulletin № 7, National Biodiversity Authority, Chennai, Tami lNadu, India, 2006, P.60.
19. Lloyd, G., McCown B.H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Combined Proceedings. International Plant Propagators Society, USA — 1980. № 30. —P. 421-427.
20. Marriott, P., Sarasan, V. Novel micropropagation and weaning methods for the integrated conservation of a critically endangered tree species, *Medusagyne oppositifolia*. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, — 2010. №46. — P. 516-523.

21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiologia Plantarum*, — 1962. № 15. — P. 473-497.
22. Reed B., Sarasan M., Kane V. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools // *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, — 2011. № 47. — P. 1-4.
23. Sarasan, V. Importance of *in vitro* technology to future conservation programmes worldwide // *Kew Bulletin*, — 2010. № 65, —P. 549-554.
24. Sarasan V., Kite G., Sileshi C. Applications of phytochemical and *in vitro* techniques for reducing over-harvesting of medicinal and pesticidal plants and generating income for the rural poor // *Plant Cell Rep.*, —2011. № 30. —P. 1163-1172.
25. Sokolov V.E., Striganova B.R., Reshetnikov Y.S. e.a. Russian National Biodiversity Conservation Programme // *Biology International*, — 1994. № 28. — P. 29-32
26. Van-Hoof P. Methods de culture in vitro de meristemes pour l'obtention d' oeilletons non virosses // *Parasitica*. — 1971. №.2. — P. 27-35

### References

1. Ageeva S. E. i dr. Sohranenie bioraznoobrazija redkih i ischezajushhh vidov rastenij v Volgogradskom regional'nom Botanicheskom sadu // *Vestnik BFU im. I. Kanta*. — 2012. №7. — S.103-109.
2. Butenko, R.G. Biologija kletok vysshih rastenij in vitro i biotehnologii na ih osnove. — M.: FBK-PRESS, 1999. — 158 s.
3. Vetchinkina E. M. Sohranenie redkih vidov rastenij v geneticheskikh kollekcijah in vitro // *Vestnik BFU im. I. Kanta*. —2012. №7. — S.109-118.
4. Vechernina N. A. Sohranenie biologicheskogo raznoobrazija redkih, ischezajushhh vidov, unikal'nyh form i sortov rastenij metodami biotehnologii: Dis. dokt. biol. nauk: 03.00.05 / Altajskij gos. un-t. Barnaul, 2006. 325 s.
5. Evsjukova T. V., Kolomic T. M. Nekotorye aspekty sohraneniya genofonda kavkazskih vidov kolokol'chikov.// *Nauchnye osnovy razvitija cvetovodstva Rossii i proektirovanie sadovyh landshaftov*. — M: GNU VSTISL, 2006, S. 94-97.
6. Konvencija o biologicheskom raznoobrazii [Elektronnyj resurs]: Konvencija o biologicheskom raznoobrazii — Konvencii i soglasheniya — Deklaracii, konvencii, soglasheniya i drugie pravovye materialy.— 2013. Rezhim dostupa: [http://www.un.org/ru/documents/decl\\_conv/conventions/biodiv.shtml](http://www.un.org/ru/documents/decl_conv/conventions/biodiv.shtml), svobodnyj.
7. Krasnaja kniga Krasnodarskogo kraja. Tom Rastenija i griby. — Krasnodar: OOO «Dizajn Bjuro № 1», 2007. — 489 s.
8. Krasnaja kniga Rossijskoj Federacii (rastenija i griby) / Ministerstvo prirodnyh resursov i jekologii RF; Federal'naja sluzhba po nadzoru v sfere prirodnopol'zovanija; RAN; Rossijskoe botanicheskoe obshhestvo; MGU im. M. V. Lomonosova; Gl. red.koll.: Ju. P. Trutnev i dr.; Sost. R. V. Kamelin i dr.— M.: Tovarishhestvo nauchnyh izdanij KMK, 2008.— 885 s.
9. Kunah, V.A. Izmenchivost' rastitel'nogo genoma v processe dedifferencirovki i kallusoobrazovanija in vitro // *Fiziologija rastenij*. — M.: Nauka, 1999. — № 6. — S. 919-929.
10. Novikova T.I., Nabieva A.Ju., Polubojarova T.V. Sohranenie redkih i poleznyh rastenij v kollekcii in vitro Central'nogo sibirskogo botanicheskogo sada // *Vestnik VOGiS*.— 2008, Tom 12, № 4. —S. 564-571.
11. Otchjot «Kompleksnoe jekologicheskoe obsledovanie osobo ohranjaemyh prirodnyh territorij regional'nogo znachenija v celjah snjatija s nih statusa osobo ohranjaemoj prirodnoj territorii v svjazi s utratoy imi svoej cennosti...» 2013 g. [Elektronnyj resurs]: Rezhim dostupa: <http://ewnc.org/files/oopt-kk/sochi-oopt.pdf>, svobodnyj.

12. Samarina L.S. Sohranenie in vitro ischezajushhego psammofita chernomorskogo poberezh'ja Rossii *Pancreatum maritimum*. / L.S. Samarina, T.M. Kolomic, N.A. Slepchenko// Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo: sb. nauch. tr. / GNU VNIICiSK Rossel'hozakademii.— 2012. Vyp. 47.— S.172-177.
13. Sel'skohozjajstvennaja biotehnologija: Ucheb. / V.S. Sheveluha, E.A. Kalashnikova, S.V. Degtjarev i dr.: Pod red. V.S. Sheveluhi. — M.: Vyssh. shk.,1998. —415 str.
14. Tibilov A.A. Metodicheskie rekomendacii po klonal'nomu mikrorazmnozheniju shafrana prekrasnogo v kul'ture in vitro. — M: Rossel'hozakademija, 2003, 9 s.
15. Barnicoat H., Cripps R., Kendon J., Sarasan V. Conservation in vitro of rare and threatened ferns - case studies of biodiversity hotspot and island species/ *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, —2011. № 47. — P.37-45.
16. Coates D. J., Dixon K. W. Current perspectives in plant conservation biology./ *Australian Journal of Botany* №55(3) P.187—193 <http://dx.doi.org/10.1071/BT07037> Published online: 18 May 2007.
17. DIVERSITAS, Mission and History. [Jelektronnyj resurs]: Mission and History; DIVERSITAS.— 2011. Rezhim dostupa: <http://www.diversitas-international.org/about/mission-and-history>, svobodnyj.
18. Edison S., Unnikrishnan M., Vimala B., Santha V.. Biodiversity of Tropical Tuber Crops in India. *NBA Scientific Bulletin* № 7, National Biodiversity Authority, Chennai, Tami lNadu, India, 2006, P.60.
19. Lloyd, G., McCown B.H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings. International Plant Propagators Society, USA* — 1980. № 30. —P. 421-427.
20. Marriott, P., Sarasan, V. Novel micropropagation and weaning methods for the integrated conservation of a critically endangered tree species, *Medusagyne oppositifolia*. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, — 2010. №46. — P. 516-523.
21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiologia Plantarum*, — 1962. № 15. — P. 473-497.
22. Reed B., Sarasan M., Kane V. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools // *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, — 2011. № 47. — P. 1-4.
23. Sarasan, V. Importance of in vitro technology to future conservation programmes worldwide // *Kew Bulletin*, — 2010. № 65, —P. 549-554.
24. Sarasan V., Kite G., Sileshi C. Applications of phytochemical and in vitro techniques for reducing over-harvesting of medicinal and pesticidal plants and generating income for the rural poor // *Plant Cell Rep.*, —2011. № 30. —P. 1163-1172.
25. Sokolov V.E., Striganova B.R., Reshetnikov Y.S. e.a. Russian National Biodiversity Conservation Programme // *Biology International*, — 1994. № 28. — P. 29-32
26. Van-Hoof P. Methods de culture in vitro de meristemes pour l'obtention d' oeillettes non virosses // *Parasitica*. — 1971. №.2. — P. 27-35