

**СОХРАНЕНИЕ СОРТОВ И ОБРАЗЦОВ ЛАВАНДЫ УЗКОЛИСТНОЙ *IN VITRO*
И АНАЛИЗ ИХ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ**

© 2025 г. Н. А. Егорова, доктор биологических наук, С. С. Бабанина,
И. В. Ставцева, кандидаты сельскохозяйственных наук

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма,
295453, Республика Крым, Симферополь, ул. Киевская, 150,
E-mail: yegorova.na@mail.ru

Исследования проводили с целью определения особенностей развития эксплантов сортов и образцов лаванды в процессе длительного сохранения *in vitro* при разных условиях (в темноте или при слабом освещении) и последующего возобновления роста, а также оценки их генетической стабильности. В качестве исходного материала использовали сорта и образцы *Lavandula angustifolia* Mill. – Стенная, Синева, Вдала, Волна, Крымчанка, Галлея, № 12-95, № 372-44, Д-356. Развитие эксплантов (сегментов стебля с узлом) анализировали после 6, 9, 12 месяцев депонирования при 6...8 °C в темноте и при освещенности 150...300 лк, а также после их отрастания *in vitro* при 24...26 °C и освещенности 2...3 клк. Число жизнеспособных эксплантов после года хранения в условиях освещения (20,8...63,3 %, в зависимости от генотипа) было выше, чем в темноте (16,3...38,9 %). Анализируемые параметры сильно варьировали в зависимости от сорта и образца. В процессе депонирования отмечали до 44,5...49,8 % эксплантов, у которых формировались побеги. Число жизнеспособных эксплантов при возобновлении роста культур после года хранения при освещении в первом субкультивировании достигало 85,5...98,5 %, а без освещения – всего 30,0...60,0 %. При этом морфометрические параметры и коэффициенты размножения были сопоставимы с таковыми при клональном микроразмножении. На примере сортов Стенная, Синева, Вдала с использованием 7 молекулярно-генетических маркеров (RAPD и ISSR) установлено отсутствие генетической дивергенции после года хранения *in vitro*, по сравнению с исходными растениями. В результате исследований оптимизированы режимы депонирования лаванды (освещение, длительность хранения и последующего отрастания), а также показано сохранение генетической стабильности.

**IN VITRO PRESERVATION OF LAVENDER CULTIVARS AND SAMPLES
AND ANALYSIS OF THEIR GENETIC STABILITY**

N. A. Yegorova, S. S. Babanina, I. V. Stavtseva

Crimea Research Agricultural Institute,
295453, Respublika Krym, Simferopol', ul. Kievskaya, 150
E-mail: yegorova.na@mail.ru

The aim of the study was to identify the developmental features of lavender cultivars and samples explants during long-term *in vitro* storage under different conditions (in the dark or in low light) and subsequent regrowth, as well as to assess their genetic stability. The following cultivars and samples of *Lavandula angustifolia* Mill. were used as the source material: Stepnaya, Sineva, Vdala, Volna, Krymchanka, Galleya, No. 12-95, No. 372-44, D-356. An analysis of the development of explants (stem segments with a node) after 6, 9, 12 months of storage at 6...8 °C in the dark and with illumination of 150–300 lux, as well as after their regrowth under *in vitro* conditions at 24...26 °C and illumination of 2–3 klux was carried out. It was found that after a year of storage under illumination, the number of viable explants (20.8...63.3 %, depending on the genotype) was higher than in the dark (16.3...38.9 %). Significant variability of the analyzed parameters depending on the cultivar and sample was shown. During the deposition process, up to 44.5...49.8 % of developing explants were noted, in which shoots were formed. Analysis of regrowth at 24...26 °C and illumination of 2...3 klx showed that the number of viable explants after a year of storage under illumination in the first subculture reached 85.5...98.5 %, and without illumination – only 30.0...60.0 %. At the same time, restoration of morphometric parameters and multiplication index comparable to those in clonal micropropagation was revealed. Using the example of the Stepnaya, Sineva, Vdala cultivars with the use of 7 molecular genetic markers (RAPD and ISSR), the absence of genetic divergence after a year of *in vitro* storage compared to the original plants was established. As a result, lavender storage conditions (lighting, storage duration and subsequent regrowth) were optimized and the preservation of genetic stability was shown.

Ключевые слова: *Lavandula angustifolia*, хранение *in vitro*, эксплант, субкультивирование, генетическая стабильность, ПЦР-анализ.

Key words: *Lavandula angustifolia*, *in vitro* conservation, explant, subcultivation, genetic stability, PCR-analysis.

Создание коллекций генетической плазмы сортов и перспективных образцов сельскохозяйственных, декоративных и лесных культур, а также редких дикорастущих видов в асептических условиях *in vitro* в последние десятилетия становится все более актуальным не только в плане сохранения генетического разнообразия растений, но и с экономической точки зрения [1]. Долгосрочное депонирование *in vitro* позволяет снизить затраты, по сравнению с традиционными приемами поддержания коллекций в полевых условиях *in situ* или при

постоянном субкультивировании образцов в обычных условиях выращивания культур *in vitro* в ходе клонального микроразмножения, а также обеспечить их генетическую стабильность [1, 2, 3]. Одним из альтернативных приемов длительного беспересадочного сохранения растительных объектов в асептических условиях, считают криосохранение, при котором растительный материал находится в жидком азоте при –196 °C [4]. В таких условиях метаболическая активность клеток и тканей прекращается и биоматериал может сохраняться неогра-

ниченно долго без каких-либо генетических изменений. Однако этот метод требует достаточно сложной аппаратуры, поэтому многие биотехнологические лаборатории используют протоколы сохранения *in vitro* в условиях замедленного роста, которые позволяют проводить субкультивирование эксплантов не через 1...2 месяца (как при обычном микроразмножении), а от 6 месяцев до 2...4 лет, в зависимости от вида растения [5]. Снижение кинетики роста культивируемых тканей при этом обеспечивается путем понижения температуры и освещенности, изменения состава питательной среды, а иногда и таким редким приемам, как насаивание минерального масла [1, 4].

Различные теоретические и методические аспекты создания коллекций *in vitro* достаточно широко представлены во многих экспериментальных и обзорных публикациях, которые главным образом посвящены исследованию декоративных, плодово-ягодных [2], овощных, лесных и других культур [1, 3, 6]. Во всех работах авторы акцентируют внимание на особенности влияния на выживаемость и морфогенез депонируемых объектов таких факторов, как генотип растения, тип и размер экспланта, состав питательной среды, культуральный сосуд, температура и освещенность во время хранения (в том числе и с синергетическим эффектом). Чаще всего для замедления роста культур *in vitro* снижают температуру окружающей среды, при этом для многих видов используют низкие положительные температуры в пределах 4...8 °C [1, 6]. Для некоторых тропических или субтропических видов рекомендуют более высокие значения. Например, виды *Vitis* хранили при 10...15 °C, *Arbutus unedo* и *Ceratonia sativa* – при 18 °C, а *Citrus jambhiri* – при 22 °C [5]. И. В. Митрофанова с соавт. отмечали важность оптимизации температуры хранения для декоративных и ароматических растений. Так, после года депонирования при повышении температуры с 4...6 до 12...14 °C у хризантемы и клематиса жизнеспособность эксплантов снижалась с 98 до 70 % [2], тогда как у хурмы наибольшую жизнеспособность (80 %) отмечали при 8...10 °C, а при 4...6 °C – всего 35 % [2, 7].

К важным факторам, лимитирующим рост культур при хранении *in vitro*, относится состав питательной среды. Чаще всего используют среды с добавлением ингибиторов роста и ретардантов (абсцизовая кислота, хлорхолинхлорид, гидразид малеиновой кислоты) или осмотически активных соединений (сорбит, маннит, полиэтиленгликоль, сахароза) [2, 4, 6]. Хотя для некоторых видов рекомендуют среды, применяемые для микроразмножения, иногда со сниженной концентрацией солей [8, 9, 10].

Многие авторы отмечают существенную роль культурального сосуда и способа его закрытия (особенно в связи с негативным влиянием избыточного накопления этилена и CO₂), при этом в зависимости от генотипа для депонирования рекомендуют пробирки, колбы, стеклянные банки или пластиковые контейнеры различного типа [5, 11, 12]. Что касается других условий культивирования, то выбор исходного экспланта и его размера [2, 5] или освещения [5, 6, 13] также варьирует в зависимости от вида растения и используемой методики.

Протоколы поддержания коллекций *in vitro* разработаны для многих видов, хотя остается немало вопросов, касающихся методических приемов, позволяющих продлить беспересадочное культивирование при сохранении достаточного уровня жизнеспособности культур. Очень важно в такого рода исследованиях определить степень сохранения генотипических особенностей растения после депонирования, поскольку сама процедура

подразумевает ряд стрессовых воздействий – снижение температуры и интенсивности освещения, действие осмотиков и др., что само по себе может не только привести к селекции устойчивых к стрессорам форм, но и индуцировать соматоклональные вариации или эпигенетические изменения. Для мониторинга генетической стабильности применяют различные молекулярно-генетические и цитогенетические подходы. В частности, широкое распространение получили такие молекулярные маркеры, позволяющие идентифицировать изменения на уровне ДНК, как RAPD, AFLP, ISSR, SSR. У каждой из этих маркерных систем есть свои преимущества и недостатки [14, 15]. С использованием разных методов анализа ДНК показана генетическая стабильность растений после хранения *in vitro* у розы [16], хризантемы [17], яблони [12], рябчика [18] и других видов [5, 19, 20], хотя в некоторых работах представлены сведения о появлении определенных изменений в ходе депонирования [5, 21, 22].

Лаванда (в частности, *Lavandula angustifolia*) – одно из основных возделываемых в России эфиромасличных растений, сырье которого активно используют в медицине, кулинарии, при производстве парфюмерно-косметических изделий, в ландшафтном озеленении и др. [23]. Исследования в области клеточной инженерии для видов лаванды проводят достаточно активно, чаще всего это разработки протоколов клонального микроразмножения [2, 24, 25], индукции соматоклональных вариантов в каллусных культурах, клеточной селекции *in vitro*, получения вторичных метаболитов [26]. Имеются сведения и о некоторых аспектах длительного хранения лаванды *in vitro*, которые в основном касаются состава питательных сред и температуры культивирования [2, 7, 27]. Однако многие вопросы, связанные с оптимизацией условий депонирования, а главным образом появления генетической вариативности при хранении, остаются неизученными.

Цель исследования – выявить особенности развития эксплантов сортов и образцов лаванды в процессе сохранения *in vitro* в разных условиях (в темноте или при слабом освещении) и последующего возобновления роста, а также оценить их генетическую стабильность.

Методика. В качестве исходного растительного материала использовали сорта и образцы лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.) из коллекции генофонда пряно-ароматических, эфиромасличных и лекарственных растений ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма» (НИИСХ Крыма) (УНУ № 507515) – Стенная, Синева, Вдала, Волна, Крымчанка, Галлея, № 12-95, № 372-44, Д-356. Работу проводили в лаборатории биотехнологии НИИСХ Крыма с использованием как общепринятых методик культуры органов и тканей растений [2, 7], так и разработанных ранее для лаванды [26].

Для получения асептической культуры участки побегов длиной 3...4 см промывали в мыльном растворе, стерилизовали в 70 %-ном этаноле (40 с) и 50 %-ном растворе препарата «Брадофен» 10Н (ФЛОРИН АО, Венгрия) (12 мин), затем 3 раза промывали дистиллированной автоклавированной водой. Введение в культуру *in vitro* и микрочеренкование осуществляли в ламинарном боксе БАВнп-01-«Ламинар-С»-1,2 (Россия). Из побегов под микроскопом МСП-1 (ЛОМО, Россия) выделяли пазушные почки (3...5 мм), которые помещали на оптимизированную для 1 этапа микроразмножения лаванды питательную среду Мурашиге и Скуга (МС), дополненную 1,0 мг/л кинетина и 0,5 мг/л гибберелловой кислоты (ГК₃) (Sigma, США) [26]. Затем проводили 2...3 субкультивирования на среде МС с 0,5 мг/л

кинетина и 0,1 мг/л ГК₃ [26] в условиях культуральной комнаты при 24...26 °С, 70 %-ной влажности воздуха, освещенности 2...3 клк и 16-часовом фотопериоде.

В экспериментах по долгосрочному хранению *in vitro* эксплантов служили сегменты стебля с одним узлом (5...7 мм), которые культивировали в закрытых ватно-марлевыми пробками пробирках (150×16 мм) на ранее рекомендованной питательной среде МС с добавлением 0,5 мг/л кинетина и 0,1 мг/л ГК₃ [27]. Депонирование культур *in vitro* проводили при пониженной температуре 6...8 °С в холодильной камере НУС-610 (Haier Biomedical, Китай) в условиях круглосуточного освещения 150...300 лк или в темноте (штатив с пробирками закрывали темной бумагой). Через 6, 9 и 12 месяцев определяли число жизнеспособных и развивающихся эксплантов, длину и число побегов, количество узлов на побег, частоту корнеобразования и витрификации. Подсчет числа жизнеспособных эксплантов выполняли визуально, учитывая зеленые микрочеренки без признаков некроза.

После 1 года хранения при низкой температуре проводили анализ эффективности восстановления роста культур. Для этого развившиеся микропобеги черенковали в условиях ламинарного бокса, после чего экспланты (сегменты стебля с 1 узлом) помещали на среду для микроразмножения. На этом этапе выращивание осуществляли в культуральной комнате при 24...26 °С, 70 %-ной влажности воздуха, освещенности 2...3 клк и 16-часовом фотопериоде. В конце первого субкультивирования (30...35 сут) определяли ранее перечисленные морфометрические параметры, а также рассчитывали коэффициент размножения (как произведение количества образующихся на экспланте побегов на число узлов на побег). Во втором субкультивировании проводили аналогичный анализ.

Для оценки генетической стабильности лаванды после низкотемпературного хранения использовали сорта Вдала, Синева и Степная. Материалом для исследования служили исходные растения, выращиваемые в закрытом грунте, а также микрорастения, полученные *in vitro* после низкотемпературного хранения в течение 12 месяцев. Геномную ДНК выделяли из листовой ткани модифицированным СТАВ-методом [28]. Молекулярно-генетический анализ проводили с использованием 2 праймеров RAPD и 5 праймеров ISSR (Евроген, Россия), ранее валидированных для идентификации генотипов лаванды при клональном микроразмножении [29]. Так как все применяемые в работе праймеры уже были апробированы в предыдущей работе на сортах лаванды селекции НИИСХ Крыма и показали надежность в идентификации отдельных генотипов и сохранении зародышевой плазмы при клональном микроразмножении, эффективность использования их при оценке генетической стабильности при холодном хранении не вызывает сомнения. Амплификацию ДНК осуществляли с использованием ДНК Таq-полимеразы (QiaGen, Германия). Условия ПЦР (полимеразной цепной реакции) и электрофоретического разделения продуктов амплификации подробно описаны в работе [29]. Расчет молекулярной массы продуктов амплификации выполняли в программе Totallab v2.01. Расчет генетических дистанций и построение дендрограммы на основе коэффициента сходства (SM) осуществляли в программе NTSYS-pc (Numerical Taxonomy System, версия 2.0).

В каждом варианте опыта анализировали не менее 15 эксплантов в 3-кратной повторности. Статистическую обработку данных осуществляли согласно общепринятым методам математической статистики при помощи

стандартного пакета документов Microsoft Office Excel (2010). Достоверность отличий оценивали по критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$. В таблицах представлены средние значения и их стандартные ошибки, а на графиках – доверительные интервалы.

Результаты и обсуждение. После полугодичного депонирования в темноте у всех сортов и образцов отмечали 100 % жизнеспособных эксплантов, после 9 месяцев величина этого показателя снизилась до 32,8...63,5 %, а после 12 месяцев – до 16,3...38,9 %, в зависимости от генотипа. Наибольшее число жизнеспособных микрочеренков через год отмечали у образцов № 372-44, Д-356 и № 12-95. В условиях проведенного эксперимента не наблюдали полной остановки развития всех эксплантов. Так, после года хранения у 20,0...44,5 % микрочеренков отмечали замедленное формирование тонких светлых этиолированных побегов и пазушных почек (рис. 1, 2а). При этом, как правило, развивалась 1 пазушная почка или микропобег длиной 10...15 мм с 1,5...1,7 узлами. Частота множественного побегообразования достигала 16,7 %. Наибольшее число развивающихся жизнеспособных эксплантов было характерно для сортов Синева и Вдала. У основания микропобегов с частотой до 5...20 % отмечали ризогенез, при котором формировалось 2...3 корня длиной до 30...40 мм.

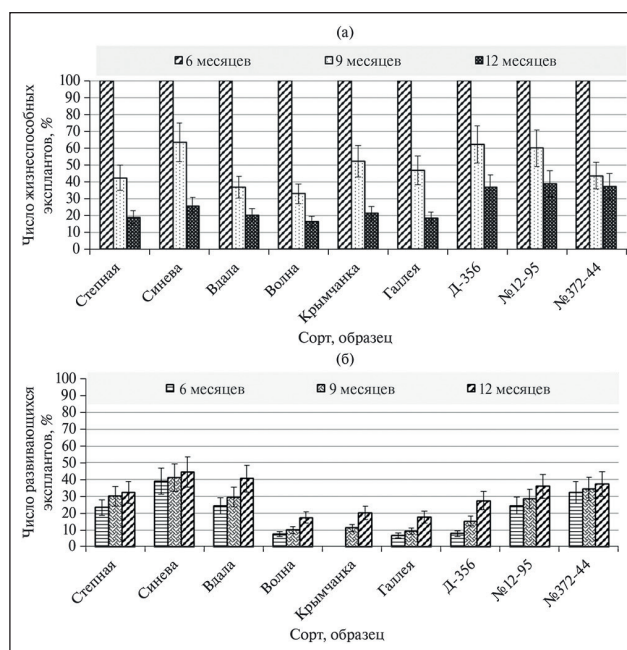


Рис. 1. Число жизнеспособных (а) и развивающихся (б) эксплантов лаванды при депонировании без освещения в зависимости от генотипа и длительности хранения.

При хранении эксплантов в условиях низкой интенсивности освещения (150...300 лк) наблюдали сходные тенденции развития, особенно это касается морфометрических параметров развивающихся микропобегов. Вместе с тем количество жизнеспособных эксплантов после года депонирования в этом варианте у большинства генотипов достигало 20,8...63,3 % (рис. 3), что гораздо выше (до 1,6 раза), чем при хранении в темноте (см. рис. 1).

По основным параметрам развития эксплантов при депонировании установлены значительные генотипические различия. Наибольшая частота жизнеспособных эксплантов после 12 месяцев депонирования отмечена

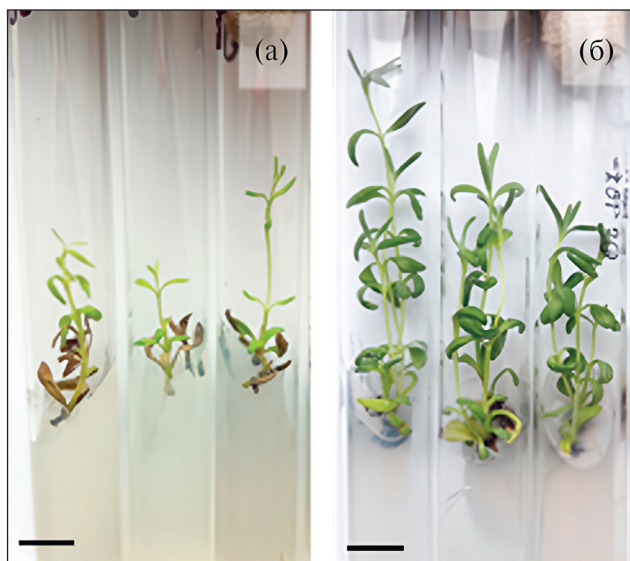


Рис. 2. Развитие эксплантов лаванды сорта Синева: а) после 12 месяцев хранения *in vitro* в темноте; б) при последующем отрастании после года депонирования в культуральной комнате (2-е субкультивирование). Масштаб – 10 мм.

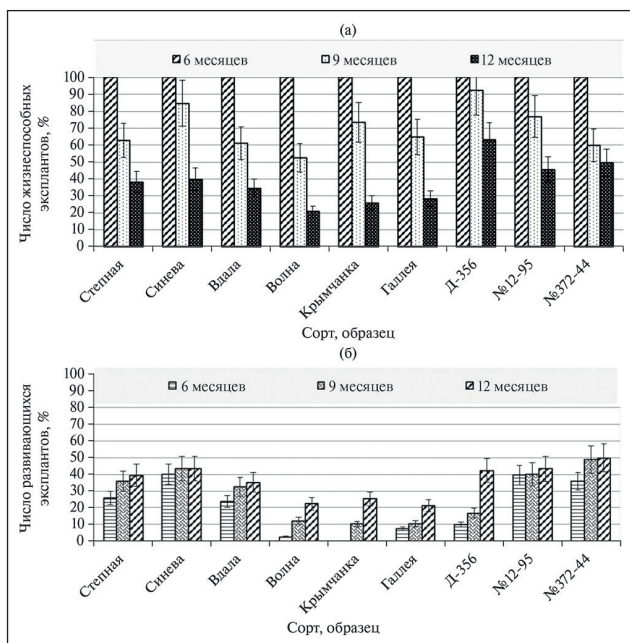


Рис. 3. Число жизнеспособных (а) и развивающихся (б) эксплантов лаванды при депонировании с освещенностью 150...300 лк в зависимости от генотипа и длительности хранения.

у образца Д-356, а наименьшая – у сорта Волна. Часть жизнеспособных эксплантов развивалась (21,3...49,8 %), при этом формировались побеги длиной до 20...30 мм. По числу развивающихся микрочеренков достоверных различий с темновым хранением не выявлено.

Необходимый, на наш взгляд, этап, характеризующий эффективность протоколов депонирования, – определение способности культур восстанавливать рост после переноса из стрессовых условий хранения при низкой температуре в обычные условия *in vitro* (что, к сожалению, многие исследователи не освещают в своих работах). После первого и второго субкультивирования

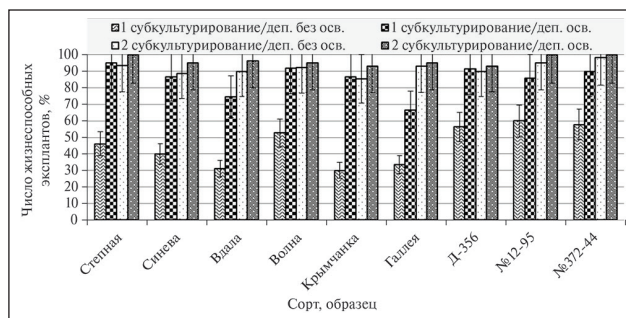


Рис. 4. Число жизнеспособных эксплантов при отрастании в культуральной после 12 месяцев хранения *in vitro* при разных режимах освещения в зависимости от генотипа (деп. без осв. – депонирование без освещения; деп. осв. – депонирования с освещенностью 150...300 лк).

в этих условиях, прежде всего, оценивали основной параметр – число жизнеспособных эксплантов (рис. 4).

Результаты определения способности культур восстанавливать рост и развитие после переноса из стрессовых условий хранения при низкой температуре в обычные условия *in vitro* свидетельствуют, что практически все жизнеспособные экспланты развивались, формируя микропобеги (см. рис. 2б). В результате первого субкультивирования после темнового хранения число жизнеспособных эксплантов было наименьшим – от 30,0 % у сорта Крымчанка до 60,0 % у № 12–92 (рис. 4). После второго субкультивирования величина этого показателя значительно увеличилась до 66,7...95,0 %. Следует обратить внимание на то, что после хранения объектов при освещении число жизнеспособных эксплантов уже в первом пассаже в культуральной комнате достигало 85,5...98,5 %, а во втором – 100 %. Полученные данные свидетельствуют о том, что для полного возобновления роста у лаванды после хранения при освещении достаточно провести всего одно субкультивирование, тогда как после темнового депонирования необходимы 2 пассажа (что более длительно и дороже).

При отрастании после года депонирования в первом субкультивировании отмечали достаточно активное множественное побегообразование – формировалось, в зависимости от генотипа, 1,7...4,2 побега длиной до 15,7 мм (см. табл.). Коэффициент размножения варьировал от 3,2 у сорта Галлея до 11,6 у Д-356. Это свидетельствует о значительной генотипической зависимости морфогенетических процессов как в период хранения лаванды *in vitro*, так и при возобновлении роста. Во втором субкультивировании, по сравнению с предыдущим, наблюдали снижение количества побегов (максимум до 2,7 раза) при увеличении их длины (максимум до 2,9 раза), достоверное у многих генотипов. Коэффициенты размножения в двух анализируемых пассажах были сходны, хотя у сортов Волна и Галлея выявлено достоверное повышение величины этого показателя в 1,6...1,8 раза, а у Д-356, наоборот, – снижение в 1,8 раза. При отрастании культур после хранения в условиях освещения наблюдали сходные закономерности изменения морфометрических параметров. Необходимо отметить, что многие морфометрические показатели были достаточно близкими с таковыми при размножении лаванды *in vitro*. Например, у сортов Степная, Вдала и Синева коэффициенты размножения составили 6,0...8,8 (см. табл.), что сопоставимо с этими показателями, выявленными ранее в 5...6 пассажах [24, 29].

Выявленные при депонировании и отрастании особенности морфогенеза эксплантов лаванды свидетель-

Влияние генотипа на развитие эксплантов лаванды при отращивании в культуральной комнате после 12 месяцев хранения без освещения

Число суб-культиви-рований	Сорт, образец	Число побегов, шт./эксплант	Длина побега, мм	Число узлов, шт./побег	Коэффициент размножения
1	Степная	2,8±0,2	15,7±1,2	2,9±0,3	8,1±0,7
	Синева	4,2±0,2	11,2±0,8	2,1±0,2	8,8±0,8
	Вдала	2,6±0,2	10,9±1,1	2,3±0,2	6,0±0,5
	Волна	2,6±0,2	11,2±0,8	2,0±0,2	5,2±0,5
	Крымчанка	2,3±0,2	11,4±1,0	2,1±0,3	4,8±0,5
	Галлея	1,7±0,2	10,9±0,9	1,9±0,2	3,2±0,3
	Д-356	4,0±0,4	14,1±0,9	2,9±0,2	11,6±1,0
	№12-95	1,9±0,3	14,4±1,8	3,1±0,3	5,9±0,6
	№372-44	2,5±0,2	12,0±1,0	2,6±0,3	6,5±0,6
	Степная	2,3±0,2	29,5±3,2*	3,6±0,3	8,3±0,8
2	Синева	2,2±0,2*	18,0±1,7*	2,9±0,2*	6,4±0,6
	Вдала	1,7±0,2*	20,3±2,0*	3,3±0,3*	5,6±0,6
	Волна	2,0±0,2	32,6±2,1*	4,1±0,4*	8,2±0,8*
	Крымчанка	2,2±0,2	20,4±1,5*	2,6±0,3	5,7±0,6
	Галлея	1,9±0,2	19,5±1,2*	3,1±0,3*	5,9±0,6*
	Д-356	1,5±0,1*	23,7±2,4*	4,3±0,4*	6,5±0,6*
	№12-95	1,7±0,3	26,5±2,0*	3,3±0,4	5,6±0,6
	№372-44	2,4±0,2	26,8±1,9*	3,2±0,2	7,7±0,8

*достоверное изменение во втором субкультивировании, по сравнению с первым, при уровне значимости $p \leq 0,05$.

ствуют о целесообразности использования освещения (150...300 лк) при цикле депонирования, не превышающем 12 месяцев. Для возобновления роста эксплантов после депонирования при освещении достаточно провести одно субкультивирование.

Сопоставление результатов собственных исследований с литературными данными в таких экспериментальных работах затруднено не только из-за разных используемых видов или сортов, но и, прежде всего, из-за различающихся условий культивирования (в частности, культуральных сосудов, температуры), эксплантов, питательных сред и других, часто не описываемых авторами деталей. В частности, по поводу необходимости и эффективности освещения культур при хранении порой даже для одного вида растения разные авторы рекомендуют различные режимы. В частности, в одних работах для фикуса, зизифуса, черники [5], мяты [10], розы [13] использовали хранение в темноте, тогда как в других – экспланты ряда плодовых культур [2], березы [9], земляники, инжира, розы [16], а также редких видов растений [8] выращивали при пониженной интенсивности света 500...1500 люкс. При этом, как правило, сравнительного анализа режимов освещения не проводили. В нашем исследовании для сортов лаванды показана большая эффективность слабого освещения 150...300 лк, по сравнению с темновым хранением.

Что касается немногочисленных исследований депонирования лаванды, в работе А. О. Attia et al. показана значительная вариабельность выживаемости эксплантов (от 0 до 90 %) у *L. dentata*, в зависимости от состава питательной среды после 12 месяцев хранения при температуре $22 \pm 2^\circ \text{C}$ [30]. Наибольший показатель был достигнут при использовании среды МС с добавлением 15 г/л сахарозы и 15 г/л сорбита. При сохранении разных типов эксплантов эти авторы не выявили достоверных различий на некоторых средах по уровню жизнеспособности, хотя на большинстве сред величина этого показателя была выше у пазушных почек, по сравнению с почками, выделенными из верхушек побегов.

В ходе изучения депонирования нескольких сортов *L. angustifolia* и *L. × intermedia* при низких положительных температурах выявлено снижение жизнеспособности эксплантов с 90...100 % до 60 % по мере повышения температуры хранения с 4...6 до 12...14 °C [2]. В наших исследованиях показана значительная вариабельность

большинства морфометрических параметров в зависимости от депонируемого сорта и образца *L. angustifolia* как при хранении, так и при последующем отращивании эксплантов в культуральной комнате. Ранее при анализе хранения *in vitro* эксплантов 6 сортов лаванды была выявлена их различная реакция на питательные среды разного состава [27], что еще раз подтверждает установленную и у других видов растений высокую зависимость эффективности депонирования от генотипа [5]. К сожалению, даже при использовании оптимального для одного сорта протокола среди генотипов в пределах одного вида можно обнаружить разный уровень выживаемости и развития эксплантов.

Поддержание генетической стабильности – критически важный фактор обеспечения эффективного сохранения зародышевой плазмы *in vitro*, поскольку основная задача при создании коллекции – сохранение генотипа исходных сортов, которое можно подтвердить путем анализа ДНК [31, 32]. Анализ генетического профиля микропобегов исследуемых сортов после 12 месяцев хранения при низких положительных температурах, проведенный с использованием маркеров RAPD и ISSR, не выявил различий с исходными растениями. Визуальная оценка электрофореграмм продемонстрировала наличие идентичных полос (бэндов) в спектрах ДНК, выделенной из исходных генотипов и депонированного материала (рис. 5).

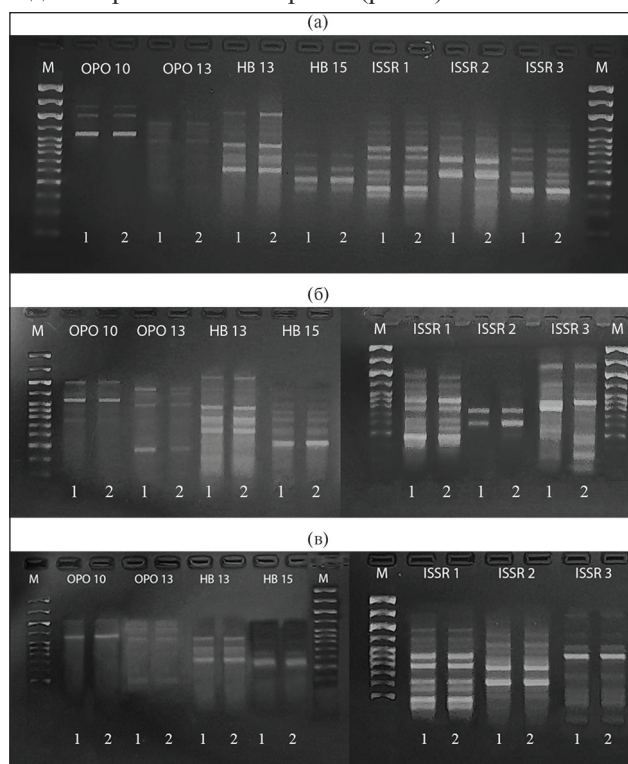


Рис. 5. Электрофореграммы генетических профилей исходных и депонируемых сортов лаванды Вдала (а), Синева (б) и Степная (в) с использованием RAPD и ISSR маркеров: М – маркер молекулярной массы; 1 – растение исходного сорта, 2 – микропобеги после 12 месяцев депонирования; OPO 10, OPO 13, HB 13, HB 15, ISSR 1, ISSR 2, ISSR 3 – названия молекулярно-генетических маркеров.

В результате ПЦП-анализа с 2 RAPD и 5 ISSR маркерами у исходных растений сорта Вдала и микроклонов, депонированных в течение одного года, было амплифицировано по 51 фрагменту. Для сортов Синева и Степная

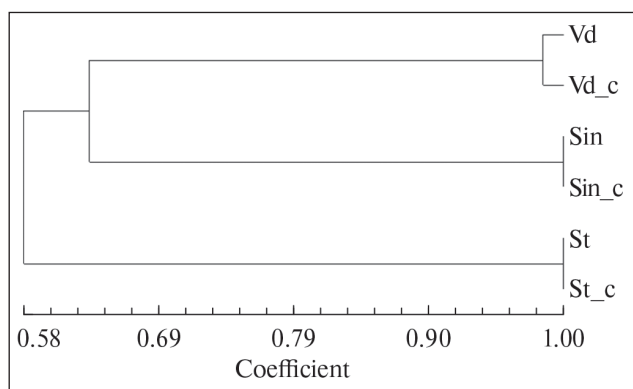


Рис. 6. Дендрограмма исходных и депонируемых сортов лаванды, построенная методом UPGMA на основании матрицы SM дистанций: Vd – исходный сорт Вдала, Vd_c – сорт Вдала после 12 месяцев хранения; Sin – исходный сорт Синева, Sin_c – сорт Синева после 12 месяцев хранения; St – исходный сорт Степная, St_c – сорт Степная после 12 месяцев хранения.

количество амплифицированных фрагментов составило 44 и 40 соответственно. Анализ электрофоретических картин показал, что количество амплифицированных фрагментов и их молекулярная масса у депонированных микрорастений не отличались от таковых у исходных растений.

При кластеризации образцов по данным молекулярно-генетического скрининга установлено расположение исходного и депонированного растений на одной ветке, при этом показана близкородственность сортов Вдала и Синева, при линии дискретизации на уровне коэффициента сходства (SM) 0,64, в то время как SM между исследуемым и сохраненным генотипом был равен 1,00 (рис. 6).

Одной из основных проблем при сохранении генотипов *in vitro* считают соматоклональную изменчивость, возникающую в процессе культивирования [31]. Накопление таких мутаций, а также стрессовые факторы среды культивирования (гормональный дисбаланс, осмотический стресс, др.) могут вызывать генетический дрейф, что уменьшает адаптивный потенциал и ценность сохраняемого материала [15, 33]. В большинстве работ, как и в нашем эксперименте, показана генетическая стабильность при сохранении генетических коллекций [1, 20, 34]. Однако наряду с такими исследованиями есть информация и о генетических изменениях, которые отмечали после хранения при низких температурах. Так, в рамках исследования генетической стабильности растений двух сортов картофеля при криосохранении была проведена оценка полиморфизма длин амплифицированных фрагментов, полученных при амплификации с AFLP-праймерами (7 праймеров), и показано для одного из сортов 100 % генетического сходства, для второго – только 97 % [35]. В работе бразильских исследователей при оценке жизнеспособности растений ананаса, сохраняемых *in vitro* в течение 10 лет в режиме медленного роста, проводили верификацию генетических профилей с использованием ISSR маркеров. Установлено, что у депонируемых растений *Ananas comosus* var. *comosus* и *A. comosus* var. *ananassoides* соматоклональные вариации не были обнаружены, но, вероятно, имели место при сохранении двух образцов *A. comosus* var. *bracteatus* [21]. В работе I. Кос с соавторами показано, что хранение *Pistacia lentiscus* L. при низкой положительной температуре может привести к активации транспозонов и, следовательно, вызвать генетическую нестабильность [22]. Интересен эксперимент, где оценивали

генетическую идентичность с использованием 5 RAPD праймеров после сохранения *in vitro* некоторых дикорастущих растений Саудовской Аравии, в числе которых была и *Lavandula dentata*. Результаты анализа электрофоретических картин свидетельствуют о генетической стабильности микрорастений после депонирования. В то же время в некоторых других вариантах обработки наблюдали потерю отдельных фрагментов, соответствующих определенным полосам [30].

В связи с такими противоречивыми данными для снижения рисков возникновения мутаций необходимы строгий мониторинг и контроль сохранения генетической целостности депонируемых сортов и образцов. Эффективные стратегии сохранения *in vitro* должны быть направлены на минимизацию этих рисков, чтобы обеспечить долгосрочную устойчивость и полезность генетических коллекций.

Выводы. После 6 месяцев депонирования при испытанных режимах у всех генотипов отмечали 100 %-ную жизнеспособных эксплантов. После 12 месяцев их число при хранении в темноте составило 16,3...38,9 %, при освещении – 20,8...63,3 %, в зависимости от генотипа. При обоих режимах культивирования обнаружено замедленное формирование тонких этиолированных побегов и почек с частотой до 44,5...49,8 %. Анализ возобновления роста культур (при 24...26 °C и освещенности 2...3 клк) показал, что после хранения при исвещении в первом субкультивировании число жизнеспособных эксплантов достигало 85,5...98,5 %, тогда как после темнового депонирования – всего 30,0...60,0 %. При этом отмечено восстановление морфометрических параметров и коэффициенты размножения (от 3,2 до 11,6), сопоставимые с таковыми при клональном микроразмножении. При хранении и последующем отрастании эксплантов у изучаемых сортов и образцов выявлена значительная вариабельность анализируемых морфометрических параметров, при этом наиболее эффективное сохранение *in vitro* характерно для образцов Д-356, № 12-95, № 372-44. Для сортов Синева, Степная, Вдала при проведении ПЦР с 2 RAPD и 5 ISSR маркерами была показана их генетическая идентичность исходным сортам после 12 месяцев хранения. Полученные экспериментальные данные позволили оптимизировать режимы депонирования лаванды: для сохранения рекомендуется использование слабого освещения (150...300 лк), цикл депонирования длительностью 12 месяцев, а для возобновления роста объектов после хранения проведение одно субкультивирования. Результаты молекулярно-генетического анализа свидетельствуют о надежности используемых приемов *in vitro* в отношении сохранения генетической стабильности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ.

Данная работа выполнена в рамках госзадания Министерства образования и науки РФ FNZW-2022-0008 (122101300035-2).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Литература.

1. *In vitro Germplasm collection and storage: a review / O. Imarhiagbe, J. O. Osaze, R. O. Aiwansoba, et al. // International Journal of Biology Research. 2016. Vol. 1. No. 1. P. 9–14.*

2. *In Vitro Conservation and Cryopreservation of Clonally Propagated Horticultural Species* / A. Agrawal, S. Singh, E. V. Malhotra, et al. // In: *Conservation and Utilization of Horticultural Genetic Resources*. eds P. Rajasekharan, V. Rao. Singapore: Springer, 2019. P. 529–528. doi: 10.1007/978-981-13-3669-0_18.
3. Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур: коллективная монография / под ред. И. В. Митрофановой. Симферополь: Ариал, 2018. 260 с. doi: 10.32514/978-5-907118-87-4.
4. Cruz-Cruz C. A., Gonzalez-Arnao M. T., Engelmann F. *Biotechnology and conservation of plant biodiversity // Resources*. 2013. No 2. P. 73–95. doi: 10.3390/resources2020073.
5. *In vitro conservation through slow growth storage technique of fruit species: an overview of the last 10 years* / C. Benelli, W. Tarraf, T. Izgu, et al. // *Plants*. 2022. Vol. 11. No. 23. Article 3188. URL: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/23/3188> (дата обращения: 19.03.2025). doi: 10.3390/plants11233188.
6. *In vitro conservation of ornamental plants* / D. P. C. da Silva, E. A. Ozudogru, M. V. D. Reis, et al. // *Ornamental Horticulture*. 2018. Vol. 24. No. 1. P. 28–33. doi: 10.14295/oh.v24i1.1163.
7. Моделирование контролируемых условий, необходимых для адаптации и длительного хранения растительного материала декоративных, ароматических и плодовых культур в генобанке *in vitro*: методические рекомендации / И. В. Митрофанова, О. В. Митрофанова, Н. Н. Иванова и др.; под общ. ред. И. В. Митрофановой. Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2018. 72 с. doi: 10.32514/978-5-907118-88-1.
8. Применение биотехнологических методов для сохранения генофонда редких видов растений / О. И. Молканова, Ю. Н. Горбунов, И. В. Ширнина и др. // *Ботанический журнал*. 2020. Т. 105. № 6. С. 610–619. doi: 10.31857/S0006813620030072.
9. Табацкая Т. М., Машикина О. С. Опыт долговременного хранения коллекционных генотипов березы с использованием безгормональных питательных сред // *Лесоведение*. 2020. № 2. С. 147–161. doi: 10.31857/S0024114820020084.
10. Егорова Н. А., Загорская М. С., Абдурашитов С. Ф. Особенности длительного сохранения мяты сортов Ажурная и Бергамотная в коллекции *in vitro* // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2022. Т. 12. № 1. С. 64–75. doi: 10.21285/2227-2925-2022-12-1-64-75.
11. *Effect of culture container and carbohydrate content on in vitro slow growth storage of the cherry rootstock 'Gisela®5'* / E. A. Ozudogru, C. Benelli, G. Dradi, et al. // *Acta Physiol Plant*. 2017. No. 39. Article 94. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-017-2372-2> (дата обращения: 19.03.2025). doi: 10.1007/s11738-017-2372-2.
12. *Medium, container and genotype all influence in vitro cold storage of apple germplasm* / I. Kovalchuk, Y. Lyudvikova, M. Volgina, et al. // *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2009. Vol. 96. P. 127–136. doi: 10.1007/s11240-008-9468-8.
13. *Micropropagation and medium-term conservation of Rosa pulverulenta* / S. Kavand, M. J. Kermani, A. Haghazari, et al. // *Acta Scientiarum Agronomy*. 2011. Vol. 33. No. 2. P. 297–301. doi: 10.4025/actasciagron.v33i2.10279.
14. Sahin E. C., Aydin Y., Uncuoglu A. A. *Molecular Marker Applications in the Selection of Elite Genotypes for Plant Stress Tolerance and Genetic Fidelity* // *OBM Genetics*. 2024. Vol. 8. No. 3. Article 260. URL: <https://www.lidsen.com/journals/genetics/genetics-08-03-260> (дата обращения: 17.03.2025). doi: 10.21926/obm.genet.2403260.
15. *Epigenetic and Genetic Integrity, Metabolic Stability, and Field Performance of Cryopreserved Plants* / M. R. Wang, W. Bi, M. R. Shukla, et al. // *Plants (Basel)*. 2021. Vol. 10. No. 9. Article 1889. URL: <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/9/1889> (дата обращения: 17.03.2025). doi: 10.3390/plants10091889.
16. Влияние условий сохранения *in vitro* на жизнеспособность и генетическую стабильность садовых растений / Н. Н. Иванова, Н. В. Корзина, В. А. Цюпка и др. // *Таврический вестник аграрной науки*. 2024. № 2(38). С. 53–66. doi: 10.5281/zenodo.12178658.
17. Иванова Н. Н., Цюпка В. А., Корзина Н. В. Влияние состава питательной среды на сохранение жизнеспособности и генетической стабильности эксплантов хризантемы садовой при депонировании *in vitro* // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2023. Т. 13. № 4. С. 483–493. doi: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-483-493.
18. Сохранение эндемика Западного Саяна *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) в коллекции *in vitro* / Д. С. Мурасева, Н. С. Звягина, Т. И. Новикова и др. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017. Т. 21. № 5. С. 554–560. doi: 10.18699/VJ17.272.
19. *Efficient long-term conservation of Taraxacum pininicum synthetic seeds in slow growth conditions* / M. Kaminska, M. Golebiewski, A. Tretyn, et al. // *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2018. Vol. 132. P. 469–478. doi: 10.1007/s11240-017-1343-z.
20. *In Vitro Conservation and Genetic Stability in Vanilla planifolia* Jacks. / J. R. Bautista-Aguilar, L. G. Iglesias-Andreu, J. Martinez-Castillo, et al. // *Hort Science*. 2021. Vol. 56. No. 12. P. 1494–1498. doi: 10.21273/HORTSCI16118-21.
21. *Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of in vitro conservation* / R. L. da Silva, C. F. Ferreira, C. A. da Silva Ledo, et al. // *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2016. Vol. 127. P. 123–133. doi: 10.1007/s11240-016-1035-0.
22. *Cold-induced genetic instability in micropropagated Pistacia lentiscus L. plantlets* / I. Koc, H. Akdemir, A. Onay, et al. // *Acta Physiol Plant*. 2014. Vol. 36. P. 2373–2384. doi: 10.1007/s11738-014-1610-0.
23. Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра / В. С. Папитецкий, Н. В. Невкрытая, А. В. Мишнев и др. Симферополь: ИТ «Ариал», 2018. 320 с.
24. *Morphogenetic, Physiological, and Biochemical Features of Lavandula angustifolia at Long-Term Micropropagation In Vitro* / N. A. Yegorova, I. V. Mitrofanova, V. A. Brailko, et al. // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2019. Vol. 66. No. 2. P. 326–334. doi: 10.1134/S1021443719010060.
25. *Micropropagation of lavender: a protocol for production of plantlets* / J. Koefender, C. E. Manfio, J. N. Camera, et al. // *Hortic. Bras*. 2021. Vol. 39. No. 4. P. 404–410. doi: 10.1590/s0102-0536-20210409.
26. Егорова Н. А. Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение *in vitro*. Симферополь: ИД «Автограф», 2021. 315 с. doi: 10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4.
27. Егорова Н. А., Ставцева И. В., Коваленко М. С. Длительное хранение сортов лаванды в культуре *in vitro* при использовании питательных сред разного

- состава // Таврический вестник аграрной науки. 2024. № 3(39). С. 58–71. doi: 10.5281/zenodo.13782781.
28. Загорская М. С. Некоторые аспекты выделения геномной ДНК из растений лаванды разного происхождения // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки: материалы V международной научно-практической конференции. Симферополь: ИТ «Ариал», 2020. С. 177–179. doi: 10.33952/2542-0720-2020-5-9-10-90.
29. Генетическая стабильность растений лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.) при длительном клональном микроразмножении / С. С. Бабанина, Н. А. Егорова, И. В. Ставцева и др. // Российская сельскохозяйственная наука. 2023. № 1. С. 13–19. doi: 10.31857/S2500262723010039.
30. *Ex situ* preservation for some endemic and rare medicinal plants in Taif, KSA / Attia O. Attia, El Dessoky S. Dessoky, Yassin M. Al-Sodany, et al. // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2017. Vol. 31. No. 5. P. 912–920. doi: 10.1080/13102818.2017.1356690.
31. Tavazza R., Rey N. A., Pagnotta M. A. *Globe artichoke in vitro conservation protocol to meet germplasm preservation and production management* // *Acta Hort.* 2016. No. 1147. P. 421–428. doi: 10.17660/ActaHortic.2016.1147.59.
32. Drew R. A. *Biotechnology and conservation of tropical fruit species* // *Acta Hort.* 2000. No. 523. P. 183–188. doi: 10.17660/ActaHortic.2000.523.23.
33. *Conservation Genetics in the Age of Genomics* / Ed. by G. Amato, O. Ryder, H. Rosenbaum, et al. New York: Columbia University Press, 2009. 248 p.
34. *Genetic stability of cryopreserved shoot tips of Rubus germplasm* / N. R. F. Castillo, N. V. Bassil, S. Wada, et al. // *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*. 2010. Vol. 46. P. 246–256. doi: 10.1007/s11627-009-9265-z.
35. *Evaluation of genetic stability in cryopreserved Solanum tuberosum* / R. Zarghami, M. Pirseyedi, S. Hasrak, et al. // *African Journal of Biotechnology*. 2008. Vol. 7(16). P. 2798–2802.

Поступила в редакцию 21.03.2025

После доработки 14.04.2025

Принята к публикации 20.05.2025