



# БЮЛЛЕТЕНЬ ГНБС

Выпуск 120

---

Ялта 2016

12+

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НИКИТСКИЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД

---

# БЮЛЛЕТЕНЬ ГНБС

Выпуск 120

---

Ялта 2016

**Редколлегия:**

Плугатарь Ю.В. – главный редактор, Багрикова Н.А, Балькина Е.Б., Ильницкий О.А., Исиков В.П., Клименко З.К., Коба В.П., Корженевский В.В., Маслов И.И., Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Опанасенко Н.Е., Работягов В.Д., Смыков А.В., Шевченко С. В., Шишкин В.А. – ответственный секретарь, Ярош А.М. – зам. главного редактора

THE STATE NIKITA BOTANICAL GARDENS

---

# **BULLETIN SNBG**

**Number 120**

---

**Yalta 2016**

**Editorial Board:**

Plugatar Yu.V. – chief editor, Bagrikova N.A., Balykina E.B., Ilnitsky O.A., Isikov V.P., Klymenko Z.K., Koba V.P., Korzhenevsky V.V., Maslov I.I., Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Opanasenko N.E., Rabotyagov V.D., Smykov A.V., Shevchenko S.V., Shyshkin V.A. – responsible secretary, Yarosh A.M. – deputy chief editor

## СОДЕРЖАНИЕ

**Биотехнология растений**

Канчит Таммасири

Сохранение тайских видов орхидей с помощью криобиотехнологии..... 7

Молканова О.И., Коновалова Л.Н., Стахеева Т.С.

Особенности размножения и сохранения коллекции ценных и редких видов растений в условиях *in vitro*..... 17

Иванова Н.Н., Митрофанова И.В., Хохлов С.Ю.

Различные пути регенерации растений *Diospyros kaki* Thunb. сорта Золотистая в условиях *in vitro*..... 24

Тимофеева С.Н., Юдакова О.И., Степанова А.И.

Гистологические аспекты клонального микроразмножения *Laburnum anagyroides* Medic..... 30

Егорова Н.А., Ставцева И.В., Митрофанова И.В.

Влияние сорта и факторов культивирования *in vitro* на клональное микроразмножение розы эфиромасличной ..... 36**Биохимия растений**

Бехтерев В.Н., Коломиец Т.М., Маляровская В.И.

Биохимические исследования редких и исчезающих видов Западного Кавказа ..... 43

**Репродуктивная биология**

Бекузарова С.А., Комжа А.Л., Соколова Л.Б.

Репродуктивные особенности дикорастущих видов клевера горных фитоценозов... 49

**Физиология растений**

Терлецкая Н.В., Исакова А.Б., Зобова Н.В., Ступко В.Ю., Луговцова С.Ю.

Фотосинтезирующая каллусная культура различных видов пшеницы и ее фотосинтетическая активность в условиях абиотических стрессов *in vitro*..... 54

Палий А.Е., Митрофанова И.В., Браилко В.А., Гребенникова О.А., Зубкова Н.В., Челомбит С.В.

Морфологические изменения и метаболические процессы, происходящие в вегетативных органах *Canna × hybrida hort. ex Backer* при поражении вирусными патогенами..... 61**Селекция**

Грошева Е.В., Маслова М.В.

Скрининг сортов лилии в условиях *in vitro* по признаку устойчивости к фузариозу.. 68**Правила для авторов**..... 75

## CONTENTS

**Plant Biotechnology**

Kanchit Thammasiri

Conservation of Thai orchid species using cryobiotechnology..... 7

Molkanova O.I., Konovalova L.N., Stakheyeva T.S.

Propagation and conservation characteristics of valuable and rare species collection *in vitro*..... 17

Ivanova N.N., Mitrofanova I.V., Khokhlov S.Yu.

Various regeneration ways of *Diospyros kaki* Thunb. cultivar "Zolotystaya" *in vitro*..... 24

Timofeyeva S.N., Yudakova O.I., Stepanova A.I.

Histological aspects of clonal micropropagation of *Laburnum anagyroides* Medic..... 30

Yegorova N.A., Stavtseva I.V., Mitrofanova I.V.

Influence of cultivar and cultivation factors *in vitro* on the essential oil rose clonal micropropagation..... 36**Plant biochemistry**

Bekhterev V.N., Kolomiyets T.M., Malyarovskaya V.I. Biochemical researches of rare and endangered species within West Caucasus..... 43

**Reproductive biology**

Bekuzarova S.A., Komzha A.L., Sokolova L.B.

Reproductive characteristics of wild-growing *Trifolium* within mountain phytocenoses .. 49**Plant physiology**

Terletskaya N.V., Iskakova A.B., Zobova N.V., Stupko V.Yu., Lugovtsova S.Yu.

Photosynthetic callus culture of different wheat cultivars and its photosynthetic activity being effected by abiotical stress factors *in vitro*..... 54

Paly A.Ye., Mitrofanova I.V., Brailko V.A., Grebennikova O.A., Zubkova N.V., Chelombit S.V.

Morphological changes and metabolic process in vegetative organs of *Canna × hybrida* hort. ex Backer being affected by viral pathogens..... 61**Selection**

Grosheva Ye.V., Maslova M.V.

Screening of lily cultivars *in vitro* according to Fusariosis-resistance..... 68**Rules for authors**..... 75

UDK 582.794.2:58.085.(593)

## CONSERVATION OF THAI ORCHID SPECIES USING CRYOBIOTECHNOLOGY

Kanchit Thammasiri

Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road,  
Phayathai, Bangkok 10400, Thailand  
kanchitthammasiri@gmail.com

Thailand is the origin of about 1,300 tropical orchid species and 180-190 genera. Deforestation and over-collection of wild Thai orchids for trade has placed orchid species at a risk of extinction. Therefore, the conservation, as well as sustainable use is urgently needed to conserve orchids by various means. The genus *Paphiopedilum* and *Dendrobium cruentum* are listed in Appendix I of CITES. At the Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, various methods of cryopreservation of Thai orchid species are implemented. For cryopreservation, recent methods were used, namely vitrification (dehydration in PVS2 solution, consisted of 30% (w/v) glycerol, 15% (w/v) ethylene glycol and 15% (w/v) dimethyl sulfoxide, prepared in modified Vacin and Went liquid medium), encapsulation-dehydration (encapsulation in calcium alginate beads followed by air-drying in a laminar air-flow cabinet), encapsulation-vitrification (encapsulation in calcium alginate beads followed by dehydration in PVS2 solution) droplet-vitrification (fast freezing from small drops of PVS2 solution on aluminium strip) and cryo-plate (a combination of encapsulation and droplet on very fast freezing aluminium plate) dehydrated with silica gel and drying beads. Application of these methods in seeds was successful in *Dendrobium chrysotoxum* (99%, vitrification), *Dendrobium cruentum* (32%, vitrification), *Dendrobium draconis* (95%, vitrification), *Dendrobium hercoglossum* (80%, encapsulation-vitrification), *Doritis pulcherrima* (62%, vitrification), *Rhynchostylis coelestis* (85%, vitrification), *Vanda coerulea* (67%, vitrification), as well as in protocorms of *Dendrobium cruentum* (33%, vitrification; 27%, encapsulation-dehydration), *Dendrobium cariniferum* (15%, encapsulation-vitrification), *Grammatophyllum speciosum* (14%, encapsulation-vitrification), *Rhynchostylis gigantea* (19%, vitrification), *Vanda coerulea* (40%, encapsulation-dehydration) and *Seidenfadenia mitrata* (67%, vitrification) and *Arundina graminifolia* (76% and 74%, cryo-plate dehydrated with drying beads and silica gel, respectively; 33% droplet-vitrification; 64% encapsulation-dehydration with drying beads or silica gel). Cryopreserved seeds and protocorms were able to develop into normal seedlings. These methods appear to be promising techniques for cryopreservation of some Thai orchid germplasm.

**Key words:** vitrification; encapsulation-dehydration; encapsulation-vitrification; droplet-vitrification; cryo-plate; drying beads; silica gel

## Introduction

Thailand is the origin of about 1,300 tropical orchid species and 178 genera. Many Thai orchid species have good horticultural characteristics and are used as parents for breeding, making Thailand the No.1 orchid exporter. Climate change, deforestation (habitat destruction) and over-collection of wild Thai orchids for trade has placed Thai orchid species at a risk of extinction. Therefore, conservation, social awareness and consciousness, as well as sustainable use are urgently needed to conserve orchids by various means [13]. At the Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, various methods of ex situ conservation of Thai orchid species are implemented, namely cryopreservation, seed stores under Orchid seed stores for sustainable use (OSSSU) project and micropropagation [4, 8].

After meeting and discussing with Professor Akira Sakai at the International Workshop on *In Vitro* Conservation of Plant Genetic Resources, July 4-6, 1995 in Kuala Lumpur, Malaysia, he came to demonstrate vitrification-based methods for plant cryopreservation at the Department of Plant Science. A little while later, research on cryopreservation of jackfruit embryonic axes has started and the results were very successful



and novel [11]. Dr. K. Thammasiri then shifted his interest in cryopreservation research into orchids and discovered a new scientific direction. In 2000, the first paper on *Doritis pulcherrima*, a wild Thai orchid, on seed cryopreservation by vitrification with 62% was published [11]. It was also the first paper on seed cryopreservation by vitrification (dehydration in PVS2 solution, consisting of 30% (w/v) glycerol, 15% (w/v) ethylene glycol and 15% (w/v) dimethyl sulfoxide, prepared in modified Vacin and Went liquid medium).

Later M.Sc. and Ph.D. students of Dr. K. Thammasiri studied recent methods, namely vitrification (dehydration in PVS2 solution), encapsulation-dehydration (encapsulation in calcium alginate beads followed by air-drying in a laminar air-flow cabinet), encapsulation-vitrification (encapsulation in calcium alginate beads followed by dehydration in PVS2 solution) and droplet-vitrification (fast freezing from small drops of PVS2 solution with plant materials inside on 7 x 20 mm sterile aluminium foil strip). Application of these methods on seeds was successful for many Thai orchid species. Cryopreserved seeds and protocorms were able to develop into normal seedlings. These methods appeared to be promising techniques for cryopreservation of many Thai orchid species.

Dr. Thammasiri [12] presented "Preservation of Seeds of Some Thai Orchid Species by Vitrification" at the 16<sup>th</sup> World Orchid Conference. *Dendrobium chrysotoxum*, *Dendrobium draconis*, *Doritis pulcherrima* and *Rhynchostylis coelestis* had 99%, 95%, 62% and 85% germination, respectively after seed cryopreservation by vitrification. Other Thai orchid seeds were later successfully cryopreserved, such as in *Dendrobium cruentum* (32% by vitrification) [3], *Vanda coerulea* (67% by vitrification) [14], *Dendrobium hercoglossum* (80% by encapsulation-vitrification) [7], as well as in protocorms of *Dendrobium cruentum* (33% by vitrification and 27% by encapsulation-dehydration) [3], *Dendrobium cariniferum* (15% by encapsulation-vitrification) [6], *Vanda coerulea* (40% by encapsulation-dehydration) [2] and *Seidenfadenia mitrata* (67% by vitrification) [5].

The aim of this study was to develop efficient cryopreservation methods for endangered Thai orchid species.

## Objects and Investigation methods

### Plant materials

Protocorms of *Grammatophyllum speciosum* and *Arundina graminifolia* were used in this study.

Mature fruits, 8-month-old, derived from self-pollination of *G. speciosum* were used. Fruits were cleaned and wiped with 70% ethanol, then placed inside a laminar air-flow cabinet and soaked in 95% ethanol for 1 min, then flamed with an alcohol burner. After cooling, fruits were cut and seeds were removed and placed on sterile Petri dish. Seeds were sown on half strength Murashige and Skoog agar medium ( $\frac{1}{2}$ MS) containing 2% (w/v) sucrose. The medium was adjusted to pH 5.7 before adding 0.2% (w/v) gelrite. Cultures were maintained at standard conditions;  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , under white fluorescent light ("Philips", Thailand) at the intensity of  $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for 16 h  $\text{d}^{-1}$ . Protocorms, 0.1 cm in diameter, developed from 2 month-old germinating seeds were used in this study [8].

Mature seeds of *Arundina graminifolia* were germinated on half strength Murashige and Skoog ( $\frac{1}{2}$  MS) agar medium supplemented with  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$   $\alpha$ -naphthaleneacetic acid,  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  kinetin and  $20 \text{ g L}^{-1}$  sucrose at the Orchid Research Laboratory, Mahidol University, Salaya Campus. The pH was adjusted to 5.8 prior to autoclaving. Cultures were incubated at  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  under white fluorescent light ("Philips", Thailand) at the intensity of  $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for 16 h  $\text{d}^{-1}$ . This medium stimulated the development of protocorms after 70 days. Protocorms, 1-2 mm diameter were used in the experiments.

Desiccation materials used were 50 g silica gel (2.8-3.0 mm diameter) per Petri

dish and 30 g drying beads (6.5 mm diameter) per Petri dish to dehydrate encapsulated protocorms and encapsulated protocorms adhered to cryo-plates. Silica gel, considered to be a low cost and effective product, is largely used to effectively remove moisture from plant materials. Drying beads, developed by the combination of aluminosilicate with clay, allow for easy handling and the ability to be used virtually indefinitely. After these beads have absorbed their maximum amount of moisture, they can be dried in an oven and used again.

#### **Droplet-vitrification**

For droplet-vitrification method [9] (Figure 1), selected protocorms were precultured on filter paper soaked with  $\frac{1}{2}$ MS medium containing 0.4 M sucrose at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  for 0, 1, 2 and 3 days. The precultured protocorms were treated with loading solution (2 M glycerol and 0.4 M sucrose in  $\frac{1}{2}$ MS liquid medium) for 20 min at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Following preculture, the protocorms were treated with loading solution (2 M glycerol and 0.4 M sucrose in  $\frac{1}{2}$ MS liquid medium) for 20 min at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , then dehydrated with PVS2 solution (30% (w/v) glycerol, 15% (w/v) ethylene glycol and 15% (w/v) dimethyl sulfoxide in  $\frac{1}{2}$ MS liquid medium with 0.4 M sucrose at pH 5.7) for 0, 15, 30, 60, 90, and 120 min. Ten small drops of PVS2 solution were dropped on 7x20 mm sterile aluminium foil strip, and then treated protocorms were placed one by one in a prepared drop of PVS2 solution. After that aluminium foil strip containing beads was rapidly transferred into a 1.8 ml cryotube filled with liquid nitrogen (LN) and then the cryotube was incubated in LN for at least 1 h. For rapid warming, aluminium foil strips were removed from LN and transferred into a new cryotube filled with 1.5 ml of  $\frac{1}{2}$ MS liquid medium containing 1.2 M sucrose for 20 min at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  at the intensity of  $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for 16 h  $\text{d}^{-1}$ .

#### **Encapsulation-dehydration**

For encapsulation-dehydration method [9] (Figure 2), encapsulated protocorms were precultured in  $\frac{1}{2}$ MS liquid medium containing 0.4 M sucrose on a shaker (110 rpm) at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  for 0, 1, 2 and 3 days. The precultured beads were exposed to sterile air-flow at 0.5 inches/water column (0.12 kPa) inside a laminar air-flow cabinet at c.  $28^\circ\text{C}$  and 34% RH for 0-12 h. After dehydration, ten dehydrated beads were transferred into 1.8 ml cryotube and then directly plunged into LN and stored for at least 1 h. For rapid warming, cryotubes were removed from LN and rapidly warmed in a waterbath at  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  for 2 min under white fluorescent light ("Philips", Thailand) at the intensity of  $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for 16 h  $\text{d}^{-1}$ .

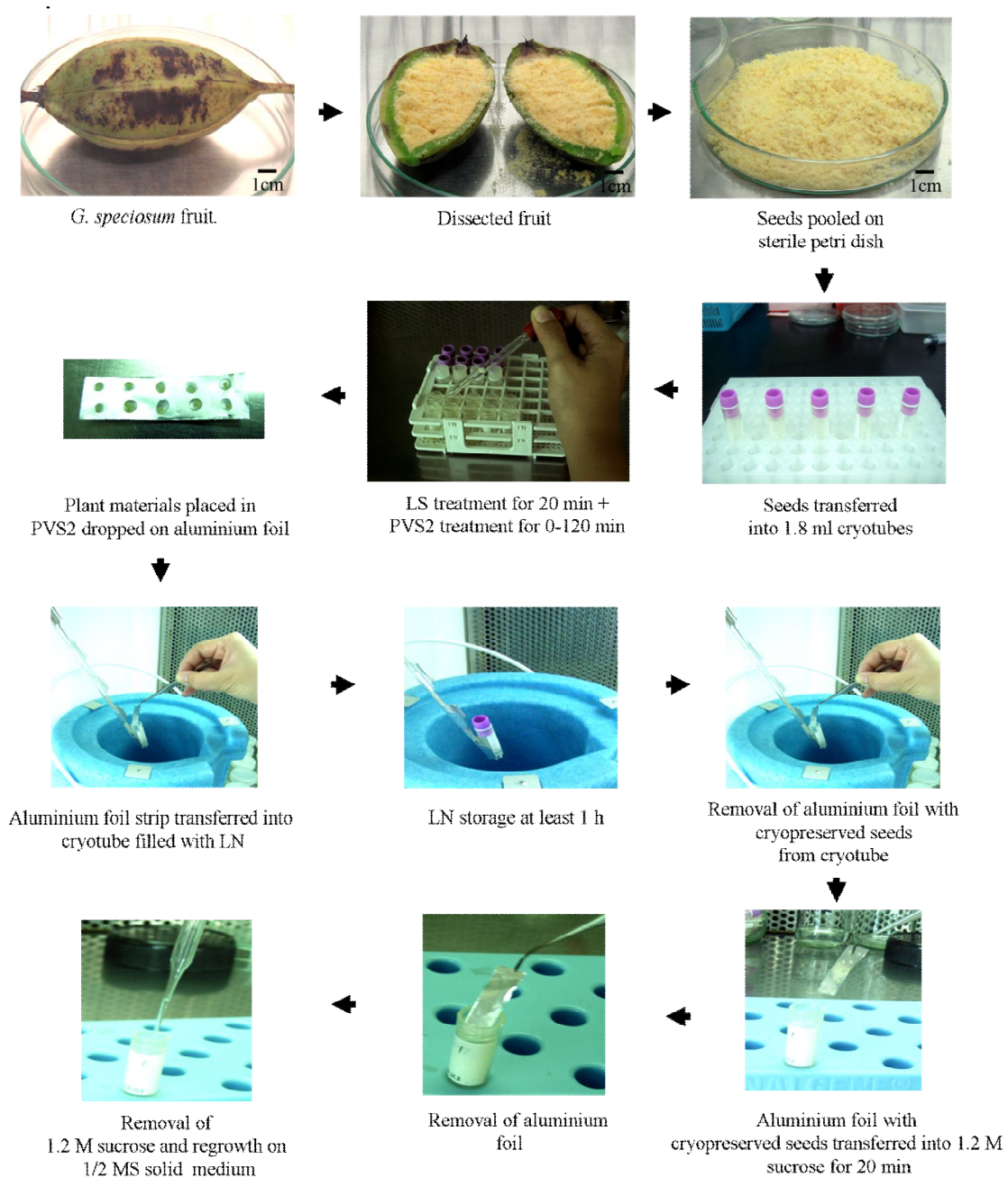
#### **Encapsulation-vitrification**

For encapsulation-vitrification method [9] (Figure 3), encapsulated protocorms were precultured in  $\frac{1}{2}$ MS liquid medium containing 0.4 M sucrose on a shaker (110 rpm) at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  for 0, 1, 2 and 3 days. Then, precultured beads were treated with loading solution for 20 min  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . The precultured beads were dehydrated with PVS2 solution for 0, 15, 30, 60, 90, and 120 min. 10 beads were then transferred into 1.8 ml cryotube containing 1.5 ml PVS2 solution. The cryotubes containing treated beads were directly plunged into LN and stored for 1 h. For rapid warming, the cryotubes were rapidly warmed in a waterbath at  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  for 2 min, then PVS2 solution were removed from cryotubes and replaced by adding 1.5 ml of  $\frac{1}{2}$ MS liquid medium containing 1.2 M sucrose for 20 min at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  under white fluorescent light ("Philips", Thailand) at the intensity of  $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for 16 h  $\text{d}^{-1}$ .

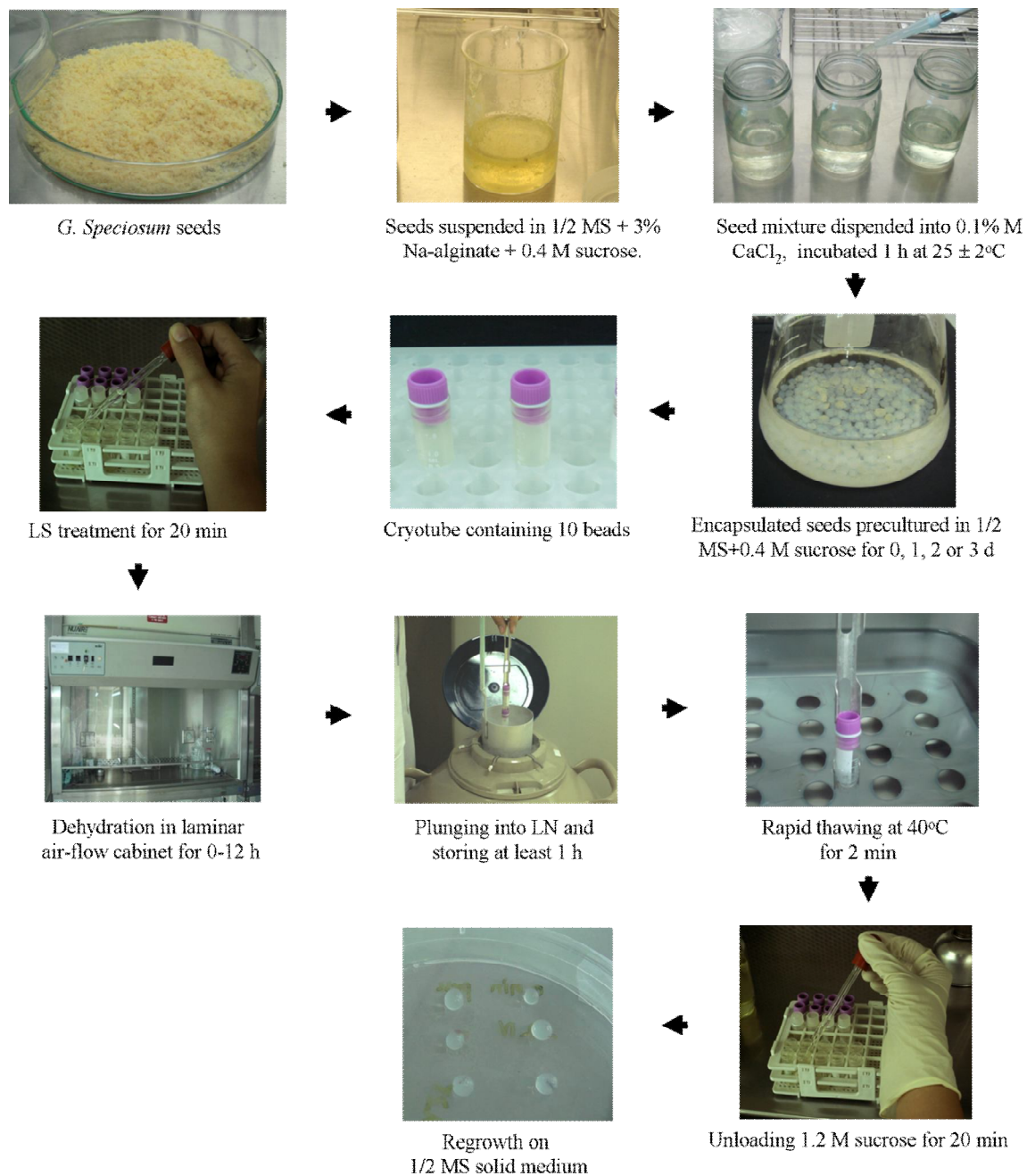
#### **Cryo-plate method**

For cryo-plate method [1] (Figure 4), *Arundina graminifolia* protocorms, 1-2 mm, were placed into the preculture solution consisting of 0.7 M sucrose on a shaker (110 rpm) at  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  for 1 day. After that, protocorms were placed one by one in the wells of cryo-plates pre-filled with the alginate solution containing 2% (w/v) sodium alginate in calcium-free  $\frac{1}{2}$  MS liquid medium with 0.4 M sucrose. The cryo-plates were hardened for 20 min by

slowly dispensing the calcium chloride solution containing 0.1 M calcium chloride in  $\frac{1}{2}$ MS liquid medium with 0.4 M sucrose. Then, the cryo-plates were surface dried using sterile filter paper, placed in Petri dishes containing silica gel or drying beads in a laminar air-flow cabinet. Cryo-plates were dehydrated until the moisture content was 25% and then placed into 2 mL cryotubes (one cryo-plate/cryotube) and plunged directly into liquid nitrogen for 1 day. The cryo-plates were removed from cryotubes and warmed in unloading solution (1.2 M sucrose solution) for 20 min. Protocorms were then removed from the the cryo-plate and placed and cultured on  $\frac{1}{2}$  MS agar medium at  $25\pm 3^\circ\text{C}$  under white fluorescent light (“Philips”, Thailand) at the intensity of  $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for  $16 \text{ h d}^{-1}$  and determined regrowth after 90 days



**Figure 1** Established protocol for cryopreservation of *G. speciosum* seeds by droplet-vitrification



**Figure 2** Established protocol for cryopreservation of *G. speciosum* seeds by encapsulation-dehydration

### Statistical analysis

All experiments were arranged in a completely randomized design (CRD). Data from the experiments were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared using the least significant difference (LSD) test based on four replications.

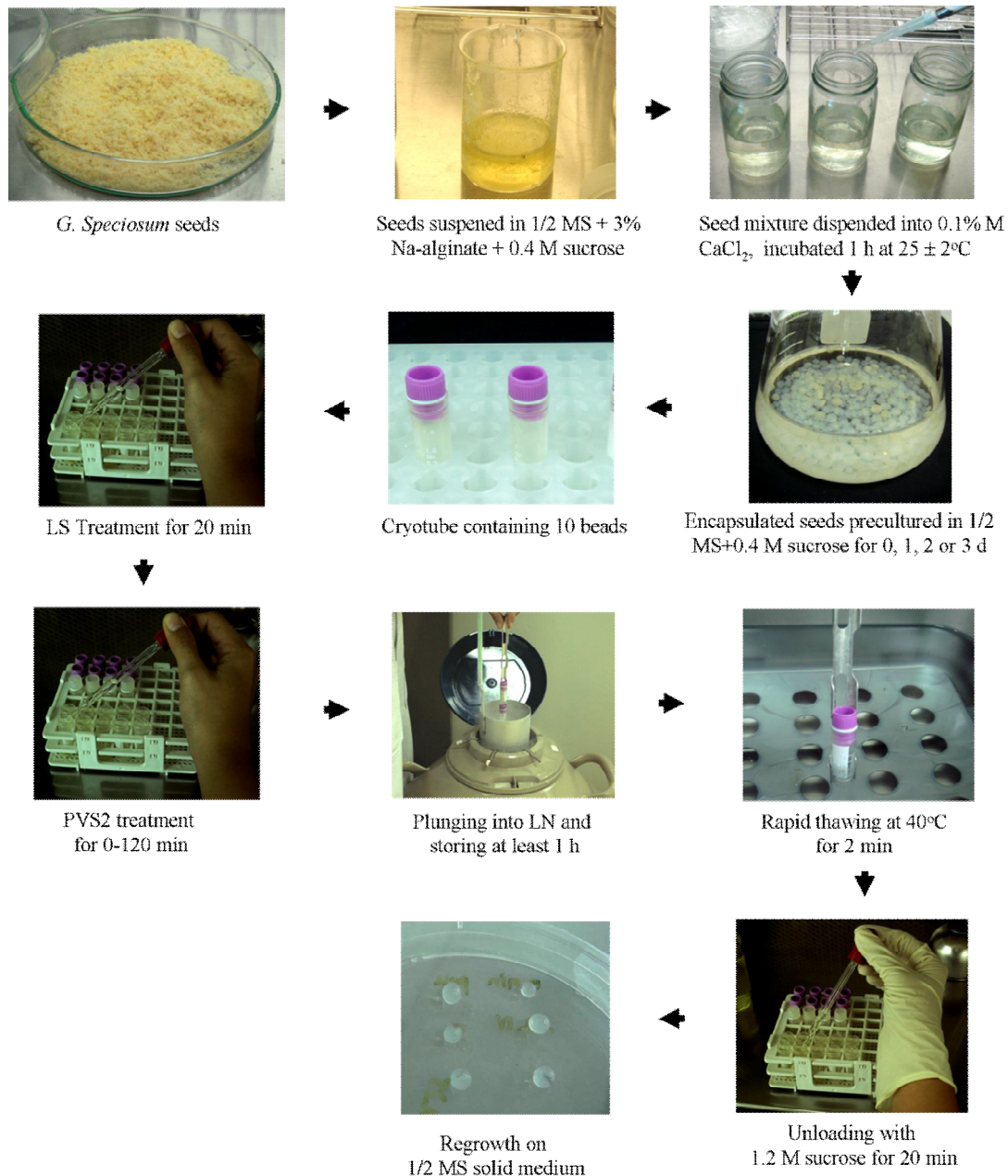
## Results and Discussion

### Droplet-vitrification method

Preculture and treatment with PVS2 solution affected the water content of the protocorms. Water content of protocorms precultured with 0.4 M sucrose for 0, 1, 2 and 3 days and without exposure to PVS2 solution was 83%, 80%, 78% and 75%, respectively. After exposure to PVS2 solution, protocorms without preculture showed significantly higher water content ( $P < 0.05$ ) than protocorms precultured with 0.4 M sucrose for 1, 2 and 3



days at any PVS2 solution exposure time. The preculture of protocorms on 0.4 M sucrose before dehydration with PVS2 solution helped to further reduce the water content of protocorms. Longer preculture times resulted in more desiccation. The water content of precultured protocorms after exposure to PVS2 solution decreased rapidly for the first 30 min, followed by a gradual decline.



**Figure 3** Established protocol for cryopreservation of *G. speciosum* seeds by encapsulation-vitrification

The exposure time to PVS2 solution affected the regrowth rate of protocorms. Increasing exposure time to PVS2 solution led to reduced regrowth in the control treatment (non- cryopreserved). The regrowth rate of non-cryopreserved protocorms decreased rapidly after 30 min of exposure time to PVS2 solution, whether the protocorms were precultured with 0.4 M sucrose or not. The optimum exposure time to PVS2 solution was 30 min. Longer exposure times to PVS2 solution also reduced the growth rate of cryopreserved protocorms. The highest regrowth rate of 38% after cryopreservation was

achieved when protocorms were precultured on 0.4 M sucrose for 2 days, followed by dehydration with PVS2 solution for 30 min.

#### Encapsulation-dehydration method

In contradiction to the previous experiment, the sucrose preculture did not affect the water content of the encapsulated beads when precultured for 0, 1, 2 or 3 days. When the beads were dehydrated under a laminar air-flow cabinet, the water content of encapsulated protocorms linearly decreased. The water content of encapsulated beads was about 20% after 12 h of dehydration. The regrowth rate of non-cryopreserved beads decreased rapidly after 8 h dehydration and was less than 40% when dehydrated for 12 h. After cryopreservation, the highest regrowth rate of 24% was achieved when encapsulated protocorms were precultured with 0.4 M sucrose for 2 days and then dehydrated for 8 h. The survival of encapsulated protocorms after cryopreservation by encapsulation-dehydration was successful when precultured for 0, 1, 2, or 3 days and dehydrated for 6 to 10 h. There was no survival of encapsulated protocorms after cryopreservation when dehydrated for 12 h.

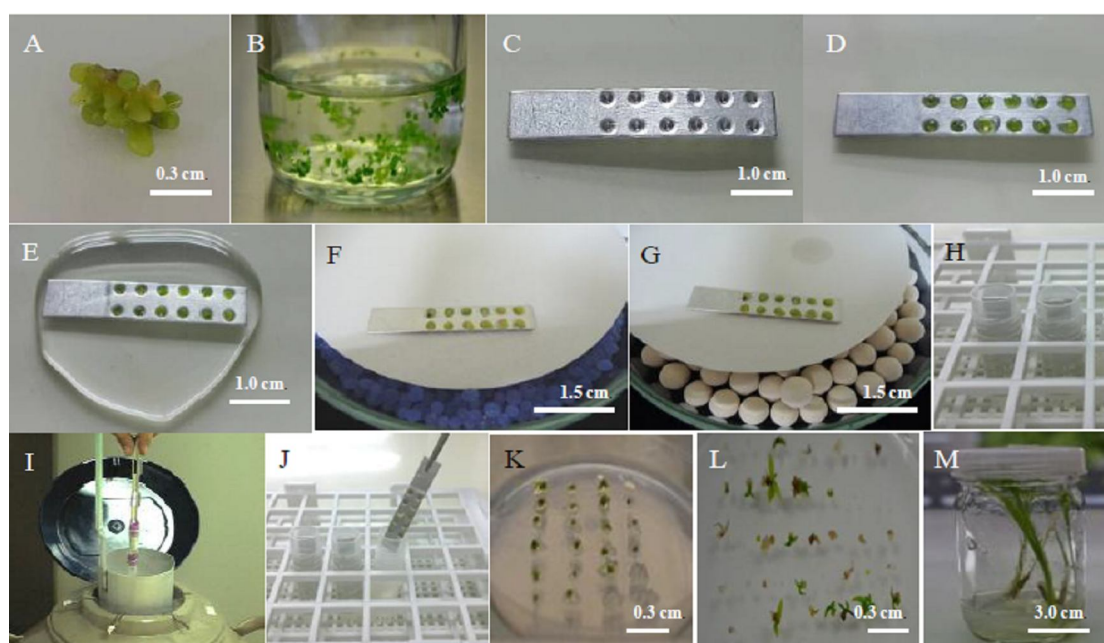


Figure 4 Cryo-plate method dehydrated with silica gel or drying beads:

A – protocorm development; B – preculture of protocorms in 1/2 MS liquid medium with 0.7 M sucrose for 1 day; C – pour the alginate solution containing 2% (w/v) sodium alginate in calcium-free 1/2 MS basal medium with 0.4 M sucrose in the wells; D - place the precultured protocorms in the wells one by one; E - pour the calcium chloride solution containing 0.1 M calcium chloride in 1/2 MS basal medium with 0.4 M sucrose; F – dehydration with 50 g silica gel; G – dehydration with 30 g drying beads; H – put each cryo-plate in a 2 ml cryotube; I - plunge 2 ml cryotubes into liquid nitrogen for 1 day; J - warming in 1.2 M sucrose solution for 20 min; K – plate on 1/2 MS agar medium; L – regrowth; M - regrowth after 60 days

#### Encapsulation-vitrification method

This experiment showed that sucrose preculture time did not have much effect on water content of encapsulated beads. At 0 min exposure time to PVS2 solution, the water content was 85%, 85%, 85% and 84% when precultured with 0.4 M sucrose for 0, 1, 2 and 3 days, respectively. The water content of encapsulated protocorms after exposure to PVS2 solution decreased rapidly in the first 60 min of the treatment.

Exposure time to PVS2 solution affected the regrowth rate of non-cryopreserved beads, increasing exposure time to PVS2 solution significantly reduced the regrowth rate. After cryopreservation by encapsulation-vitrification, the highest regrowth rate of about 14%

was achieved when encapsulated protocorms were precultured with 0.4 M sucrose for 1 and 2 days, and then dehydrated with PVS2 solution for 60 min.

#### **Cryo-plate method**

Preculture, encapsulation adhered to cryo-plates and dehydration using 50 g silica gel or 30 g drying beads per Petri dish for 5 h had a little effect on survival (92% for silica gel; 95% for drying beads) and regrowth (90% for silica gel; 92% for drying beads) of non-cryopreserved encapsulated protocorms adhered to cryo-plates. Survival and regrowth of cryopreserved encapsulated protocorms adhered to cryo-plates were hardly different (74-77%) and close to values observed for non-cryopreserved materials.

Regrowth was observed at the 2<sup>nd</sup> week after culture on ½MS agar medium. Dehydration using silica gel or drying beads did not obviously affect regrowth rate. Subsequently, protocorms developed into normal plantlets.

In this study, *G. speciosum* protocorms cryopreserved by droplet-vitrification gave the highest regrowth rate (38%) among these three methods. This regrowth rate seems to be low but it is sufficient for *Grammatophyllum* plants because the cost to maintain these large plants in the greenhouses is high. Droplet-vitrification combines fast freezing and the application of concentrated intracellular solution which is important for successful vitrification-based cryopreservation. Placing plant materials on aluminium foil strips and then directly plunging into LN has a cooling rate of around 130°C s<sup>-1</sup>.

Pretreatment which prepares the plant materials to the freezing process is an important process for successful cryopreservation. However, the suitable condition depends on species. In this study, preculture of protocorms and encapsulated protocorms with 0.4 M sucrose induced freezing tolerance. Protocorms precultured with 0.4 M sucrose for 2 days before exposure to PVS2 solution and LN showed higher survival compared to protocorms without preculture. Encapsulated protocorms precultured with 0.4 M sucrose for 1 and 2 days before exposure to PVS2 solution and LN showed higher regrowth rates than encapsulated protocorms without preculture. Osmosis occurs in the presence of high concentrations of sucrose and results in a slow reduction of moisture content. Sucrose is able to enter the cells which leads to soluble sugar accumulation and acts as the protectant of proteins and membranes from dehydration and freezing damage. The preculture of mature seed, 3-day germinating seed and protocorms of *Bletilla striata* with high concentrations of sucrose and sorbitol enhanced their tolerance of PVS2 treatment and improved the regrowth rate of cryopreserved materials [2].

PVS2 solution is the most commonly used cryoprotectant for plant cryopreservation; however, it could be highly toxic. Optimization of the exposure time to PVS2 treatment is known to reduce the injurious effects that might occur during the dehydration process. Our results showed that optimum exposure time to PVS2 solution depended on plant materials, 30 min for protocorms and 60 min for encapsulated protocorms. PVS2 solution is highly toxic to *G. speciosum* protocorms. Regrowth rate of non-cryopreserved was significantly decreased when exposure times to PVS2 solution was increased. The regrowth rate of non-cryopreserved protocorms was <60% when protocorms or encapsulated protocorms were exposed to PVS2 solution for 90 min, and the regrowth rate was less than 40% when plant materials were exposed to PVS2 solution for 12 h.

Encapsulation of protocorms with 3% Na-alginate affected the regrowth rate of non-cryopreserved protocorms. The regrowth rate of non-cryopreserved protocorms without exposure to PVS2 was 93%, while the regrowth rate of encapsulated protocorms without exposure to PVS2 or before being subjected to dehydration by air-flow was about 83%.

It was noted that droplet-vitrification is the most suitable method for the cryopreservation of *G. speciosum* protocorms among the three methods tested. However, the regrowth rate obtained from droplet-vitrification was quite low. To obtain higher survival and

regrowth rate, protocorms of different developmental stages, sucrose or other sugar concentrations for preculture, preculture conditions, exposure times to loading solution or recovery method after cryopreservation will need to be further investigated for droplet-vitrification.

Cryopreserved protocorms of *Arundina graminifolia* using the cryo-plate method had the highest regrowth (77%) using drying beads after 90 days. This could be attributed to the removal of a reasonable amount of water from the cells that allowed for regeneration without ice crystal formation. It can also be suggested that good cold / heat conduction of the cryo-plate at  $4,500^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , and the reduction in harmful chemicals had an effect on the regrowth of the protocorms.

Using the cryo-plate method permits for the encapsulation of protocorms directly on the plate itself. Doing so may increase survival and decrease cell destruction due to dehydration. Utilizing the cryo-plate method does not require the use of toxic cryoprotectants, such as DMSO and ethylene glycol, which has been applied in standard vitrification techniques. This work allows for the development of new research techniques, such as the testing of genetic loss over time in orchid species that have been cryopreserved. The technique might also be suitable for application to other species of rare and endangered plants. In conclusion, this is the first report of using silica gel and drying beads successfully to dehydrate orchid materials cryopreserved by the cryo-plate method.

#### Acknowledgements

This research project was supported by the Faculty of Science, and the Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, The National Research Council and the Biodiversity-Based Economic Development Office (Public Organization).

#### References

1. Cordova II, L.B., Thammasiri K. Cryopreservation on a cryo-plate of *Arundina graminifolia* protocorms, dehydrated with silica gel and drying beads // *CryoLetters*. – 2016. – 37. – P. 68-76.
2. Jitsopakul N., Thammasiri K., Ishikawa K. Cryopreservation of *Vanda coerulea* protocorms by encapsulation-dehydration method // *CryoLetters*. – 2008. – 29. – P. 253-260.
3. Kagawa K. Cryopreservation of *Dendrobium cruentum* Rchb. f. M.Sc. Thesis, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, Thailand. – 2006. – 104 p.
4. Kaewubon P., Sangdam S., Thammasiri K., Meesawat, U. Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus-derived PLBs of tropical slipper orchid (*Paphiopedilum niveum* (Rchb. f.) Pfitz.) // *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. – 2010. – 4 (Special Issue 1). – P. 29-35.
5. Moonpen P. Cryopreservation of *Seidenfadenia mitrata* (Rchb. f.) Garay by vitrification. B.Sc. Senior Project, Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand. – 2006. – 45 p.
6. Pornchuti W., Thammasiri K. Cryopreservation of protocorms of *Dendrobium cariniferum* Rchb. f. // *Acta Horticulturae*. – 2008. – 788. – P. 63-68.
7. Sheranaravenich K. Cryopreservation of seeds of *Dendrobium hercoglossum* Rchb. f. by vitrification, B.Sc. Senior Project, Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand. – 2002. – 53 p.
8. Sopalun K., Thammasiri K., Ishikawa K. Micropropagation of the Thai orchid *Grammatophyllum speciosum* Blume. // *Plant Cells, Tissue & Organ Culture*. – 2010. – 101. – P. 143-150.



9. *Sopalun K., Thammasiri K., Ishikawa K.* Vitrification-based cryopreservation of *Grammatophyllum speciosum* protocorms // *CryoLetters*. – 2010. – 31. – P. 347-357.
10. *Thammasiri K.* Cryopreservation of embryonic axes of jackfruit // *Cryo-Letters*. – 1999. – 20. – P. 21-28.
11. *Thammasiri K.* Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification // *CryoLetters*. – 2000. – 21. – P. 237-244.
12. *Thammasiri K.* Preservation of seeds of some Thai orchid species by vitrification // *Proceedings of The 16<sup>th</sup> World Orchid Conference (April 28 – May 2, 1999)*. – Vancouver, Canada, 1999. – P. 248-251.
13. *Thammasiri K.* Cryopreservation of some Thai orchid species // *Acta Horticulturae*. – 2008. – 788. – P. 53-62.
14. *Thammasiri K., Soamkul L.* Cryopreservation of *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. seeds by vitrification // *ScienceAsia*. – 2007. – 33. – P. 223-227.

Статья поступила в редакцию 20.07.2016 г.

**Канчит Таммасири** Сохранение тайских видов орхидей с помощью криобиотехнологии // Бюл. Никит. ботан. сада – 2016. – № 120. – С. 7 – 16.

Таиланд считается родиной более 1300 видов орхидей из 180-190 родов. Вырубка леса и чрезмерный уровень экспорта дикорастущих орхидей приводит к их исчезновению. Следовательно, проблема рационального их использования и сохранения видов любыми способами стоит достаточно остро. Роды *Paphiopedilum* и *Dendrobium cruentum* включены в список Конвенции СИТЕС. На кафедре ботаники (Факультет естественных наук, Махидол Университет), применяются различные методы криоконсервации с целью сохранения видов орхидей, произрастающих на территории Таиланда. В последнее время для криоконсервации используются методы витрификации (дегидротация в растворе PVS2, состоящем из 30% (вес/объем) этилена гликоля и 15% (вес/объем) диметилсульфоксида, приготовленном в модифицированной VW жидкой среде), инкапсуляции и дегидротации (инкапсуляция в шариках из альгината кальция с последующим высушиванием в камере с приграничным потоком воздуха), инкапсуляции-витрификации (инкапсуляция в шариках из альгината кальция с последующей дегидротацией в растворе PVS2), капельной витрификации (сверхбыстрый способ замораживания маленьких капель раствора PVS2 на алюминиевой пластине) и применение крио-плато (комбинирование метода инкапсуляции и капельной витрификации на алюминиевых пластинах сверхбыстрого замораживания) путем дегидротации силикагелем и высушивающими шариками. Использование этих методов было довольно успешным при работе с семенами растений следующих родов: *Dendrobium chrysotoxum* (99%, витрификация), *Dendrobium cruentum* (32%, витрификация), *Dendrobium draconis* (95%, витрификация), *Dendrobium hercoglossum* (80%, инкапсуляция-витрификация), *Doritis pulcherrima* (62%, витрификация), *Rhynchostylis coelestis* (85%, витрификация), *Vanda coerulea* (67%, витрификация), так же как и в протокормах *Dendrobium cruentum* (33%, витрификация; 27%, инкапсуляция-дегидротация), *Dendrobium cariniferum* (15%, инкапсуляция-витрификация), *Grammatophyllum speciosum* (14%, инкапсуляция-витрификация), *Rhynchostylis gigantean* (19%, витрификация), *Vanda coerulea* (40%, инкапсуляция-дегидротация) и *Seidenfadenia mitrata* (67%, витрификация) и *Arundina graminifolia* (76% и 74%, использование крио-плато, дегидротация высушивающими шариками и силикагелем, соответственно; 64%, инкапсуляция-витрификация с использованием высушивающих шариков или силикагеля). Семена и протокормы после криосохранения способны образовать стандартные саженцы. Данные методы являются перспективными для криосохранения зародышевой плазмы Тайских видов орхидей.

**Ключевые слова:** витрификация; инкапсуляция-дегидротация; инкапсуляция-витрификация; капельная витрификация; крио-плато; высушивающие шарики; силикагель

УДК 58:57.082.542

## ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ КОЛЛЕКЦИИ ЦЕННЫХ И РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Ольга Ивановна Молканова, Людмила Николаевна Коновалова,  
Татьяна Сергеевна Стахеева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, г. Москва  
127276, г. Москва, Ботаническая ул., д. 4  
molkanova@mail.ru

Наряду с традиционными способами сохранения растений *ex situ* все большее значение приобретает использование для этих целей культуры изолированных тканей и органов. Наиболее эффективные методики клонального микроразмножения были оптимизированы более чем для 150 видов, 1150 культиваров и отборных форм, относящихся к 59 семействам. Разработка эффективных методов воспроизводства растений является основой работ по сохранению генофонда. Для устойчивого воспроизводства растений определены оптимальные экспланты (апикальная меристема с листовыми примордиями). Разрабатываются научные основы формирования и методологические аспекты сохранения редких и ценных видов растений в генетических банках *in vitro*. Большая часть коллекции покрытосеменных растений хранится в условиях замедленного роста (3-7°C). Установлены важнейшие факторы, влияющие на длительность сохранения в условиях *in vitro*. При создании генетических банков особое внимание уделяется репрезентативности и сохранению генетической стабильности видов растений.

**Ключевые слова:** биологическое разнообразие; устойчивое воспроизводство; меристемный комплекс; органогенез; банк *in vitro*.

### Введение

Сохранение биоразнообразия растений является одной из актуальных задач ботанических садов. В настоящее время использование культуры изолированных клеток и тканей для сохранения генофонда растений приобретает все большее значение [1, 5, 9, 12, 13]. Особую значимость представляет изучение возможностей сохранения в условиях *in vitro* видов растений, естественное возобновление которых в природе ослаблено или затруднено. Для таких видов от устойчивости воспроизводства зависит сохранность их генофонда в целом.

Целью данной работы является формирование, сохранение коллекции *in vitro* и изучение биологических особенностей растений на всех этапах культивирования. Объекты исследований - ценные и редкие виды растений.

### Объекты и методы исследования

В настоящей работе представлена информация о генетическом банке *in vitro* ГБС РАН, в котором сохраняются представители культурных и дикорастущих видов растений. Исходным материалом для включения таксонов в банк *in vitro* являются семена и фрагменты вегетативных органов растений из природных мест обитания и полученные из коллекций ботанических учреждений.

Методы исследования основывались на классических приемах работы с культурами изолированных тканей и органов растений [1]. В процессе исследований измеряли длину побегов, корней и рассчитывали коэффициент размножения, органогенетический индекс и эффективность микроразмножения.

Математическую обработку экспериментальных данных осуществляли стандартными методами [3].

### Результаты и обсуждение

Генетический банк растений *in vitro* ГБС РАН является самым представительным в России и содержит около 1200 наименований: 150 видов, 1150 культиваров и отборных форм из 59 семейств. При этом более 70% в его составе относится к фиторесурсным видам. Наиболее полно представлены семейства: Actinidiaceae, Asteraceae, Caprifoliaceae, Ericaceae, Liliaceae, Oleaceae, Rosaceae (рис. 1).

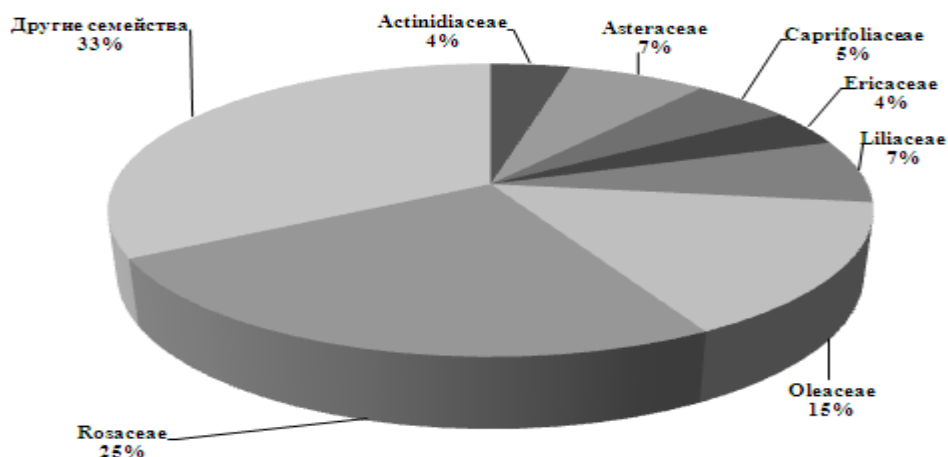


Рис. 1 Количественный состав наиболее представительных семейств в генетическом банке *in vitro* ГБС РАН

В настоящее время проводятся комплексные исследования с лекарственными растениями *Codonopsis lanceolata* Benth., *Chamerion angustifolium* L. Holub., *Potentilla alba* L., *Panax ginseng* C.A. Mey.

С целью выявления наиболее перспективных видов и сортов декоративных, лекарственных, а также редких и исчезающих растений для введения в культуру *in vitro*, проводится массовый скрининг коллекционных фондов ботанических и селекционных учреждений.

При формировании генетических банков видов растений в качестве исходного материала предпочтительно использовать семена. В экспериментальной работе с семенами многих видов возникает такая проблема, как покой семян и его преодоление. Метод культивирования *in vitro* позволяет значительно сократить срок выведения семян из покоя. Необходимо учитывать биологию семян (тип покоя, разнокачественность, жизнеспособность, сезонные колебания в ритмах прорастания и т.д.) и другие характеристики размножаемых видов, такие как жизненная форма, преобладающий способ размножения, устойчивость в культуре и др. [4]. Использование культуры изолированных зародышей позволяет частично или полностью снять необходимость стратификации и соответственно сократить период прорастания семян. Критерием выбора сроков изоляции зародышей является достижение ими стадии относительной автономности. На модельных представителях семейства Iridaceae показано, что оптимальным сроком изоляции зародышей является период 50-60 дней после опыления (стадия дифференциации осевых органов), обеспечивающий максимальный выход регенерантов – 72,5% [8].

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.

Выбор оптимальной модели культивирования *in vitro* и особенности клонального микроразмножения растений различных таксономических групп тесно связаны с их биологическими особенностями. Изучение биологических особенностей видов растений в природных условиях и в коллекциях ботанических садов служит основой для разработки биотехнологических приемов их культивирования с целью дальнейшего устойчивого воспроизводства. При изучении представителей семейств Oleaceae, Actinidiaceae, Rosaceae и др. прослеживается корреляция между динамикой роста при интродукции и темпами развития регенерантов в культуре *in vitro* [9].

Растения, относящиеся к разным таксонам, отличаются уровнем тотипотентности клеток и регенерационным потенциалом. Это обуславливает необходимость дифференцированного подхода к разработке методик клонального микроразмножения. Основным методом, используемый нами при размножении *in vitro* (активация развития существующих в растениях пазушных меристем) обеспечивает устойчивое воспроизводство и генетическую идентичность исходным формам.

Морфолого-анатомический анализ эксплантов показал, что образующиеся *in vitro* побеги являются по происхождению аксиллярными, то есть развиваются из уже существующих на момент начала эксперимента пазушных меристем растений. Активизация деятельности клеток пазушных меристем происходит через прямой органогенез, минуя стадию каллусообразования [7]. Для каждой жизненной формы характерна, в частности своя продолжительность деятельности верхушечной меристемы в онтогенезе и сроки перехода растения от вегетативного состояния к репродуктивному [11]. Для успешной регенерации меристем необходимо наличие субапикальной части конуса нарастания с 2-3 листовыми примордиями (минимальное количество сопутствующих органов, которое должно остаться с меристемой). В период активного роста конус нарастания, значительно увеличивается по сравнению с периодом первоначальной фазы роста, форма и размеры его могут служить показателями способности верхушечной меристемы к выполнению органобразовательной функции и критериями для оценки регенерационной способности в культуре *in vitro*.

На основании изучения морфогенетических процессов в эксплантах древесных растений показано, что в культуре *in vitro* происходит реализация органогенного потенциала зачатков пазушных почек. На представителях родов *Syringa* L. и *Rhododendron* L. установлена тесная взаимосвязь между емкостью почек интактных растений и коэффициентом размножения в культуре *in vitro*. Обоснована возможность прогнозирования регенерационного потенциала в условиях *in vitro* на основе морфологического анализа вегетативных почек древесных растений [2] (табл. 1).

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 [9]. Степень влияния каждого из названных факторов зависит от

генотипа. Генотипом определяются пределы изменчивости регенерационной способности эксплантов и количество формирующихся растений *in vitro*.

Таблица 1

**Коэффициент размножения рододендронов *in vitro* в зависимости от емкости почек**

Вид	Емкость почки	Коэффициент размножения (Кр)	Коэффициент корреляции (Кг)
<i>Rh. brachycarpum</i> D.Don	6,7	1,9	0,81**
<i>Rh. catawbiense</i> Michx.	7,3	4,0	0,90**
<i>Rh. ledebourii</i> Pojark.	10,0	12,0	0,87**
<i>Rh. japonicum</i> (A.Gray) Valck.Sur.	9,0	9,5	0,95**
<i>Rh. roseum</i> (Loisel) Rehd.	9,6	11,8	0,82**

Примечание

Критическое значение Кг при различных уровнях значимости: 0,63 – 95% уровень значимости (\*); 0,77 – 99% уровень значимости (\*\*)

В процессе исследований изучено влияние типа экспланта, сроков его изоляции и физиологического состояния интактных растений на регенерационную способность модельных видов. Для большинства изученных растений оптимальным сроком изоляции эксплантов является фаза начала активного роста (апрель-май). Выход жизнеспособных эксплантов при этом составляет 85% [8].

Одним из важных факторов, который оказывает влияние на процессы морфогенеза органов и тканей растений *in vitro* является состав питательной среды [6, 9, 10]. В наших исследованиях для большинства изученных таксонов положительные результаты получены на питательной среде *Quoirin-Lepoivre* [14]. Питательная среда *Quoirin-Lepoivre* успешно применялась для культивирования большинства плодово-ягодных культур [9].

При культивировании *in vitro* чаще всего в качестве источника углеводного питания используют сахарозу в концентрации 20-40 г/л. В наших исследованиях при культивировании представителей родов *Actinidia*, *Clematis*, *Rosa*, *Rubus* положительный эффект получен при использовании глюкозы. У всех изученных сортов выявлена тенденция увеличения коэффициента размножения и длины микропобегов при культивировании на питательной среде, содержащей глюкозу (рис. 2, 3).

Тканевая принадлежность или эпигенетические характеристики экспланта, использованные при получении культуры тканей различных культур, в значительной степени определяют морфогенетический потенциал формирующихся регенерантов. На модельных представителях семейства Ericaceae показано, что в качестве первичных эксплантов наиболее эффективно использовать верхушки стерильных проростков и терминальные почки побегов текущего года [9].

Одним из эффективных способов сохранения генофонда растений является культивирование регенерантов в условиях замедленного роста. 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 значительно увеличивало как период субкультивирования, так и жизнеспособность эксплантов в процессе хранения *in vitro*. Оптимальными условиями сохранения для растений-регенерантов изученных семейств являются ½ MS + 0,3 ВАР, пониженная температура (3-7°C) и слабая освещенность (1200-2500 лк) [4, 7, 8].

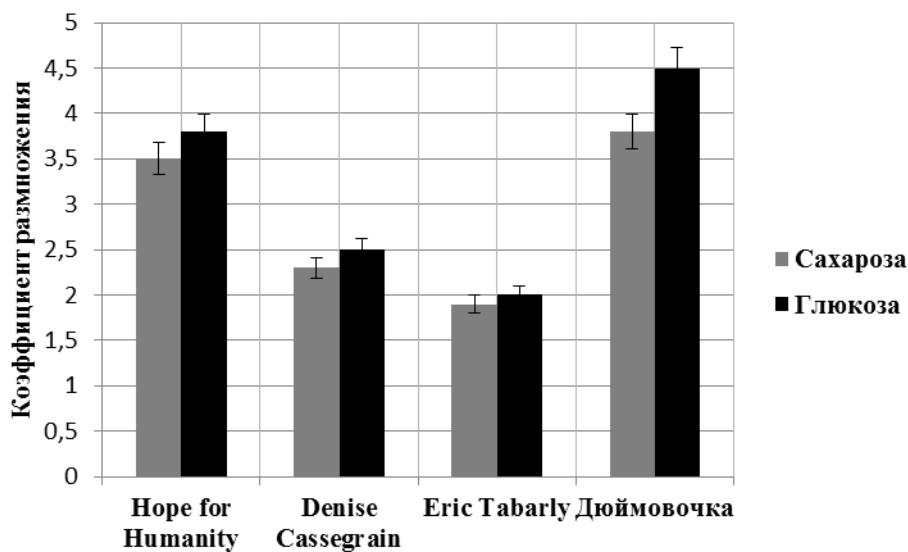


Рис. 2 Влияние типа углевода на коэффициент размножения сортов роз

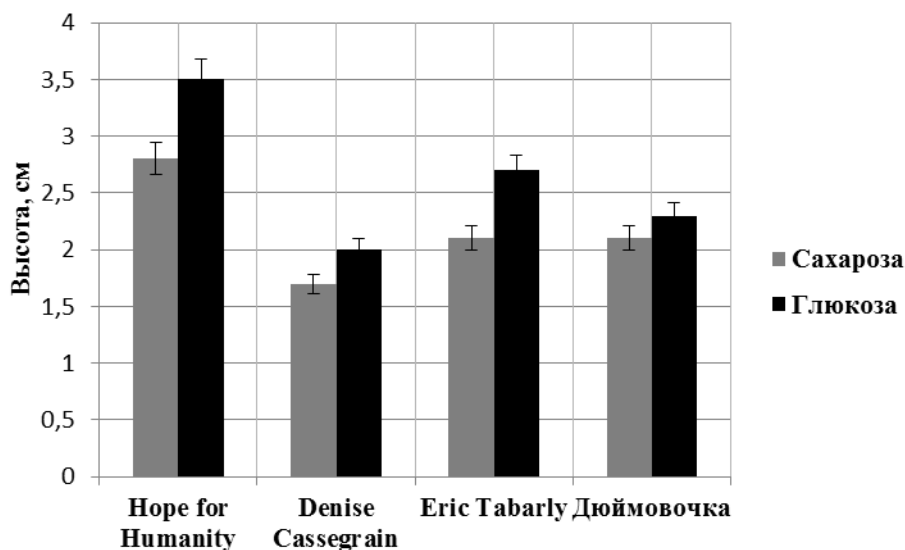


Рис. 3 Влияние типа углевода на высоту микропобегов сортов роз

Для растений разных жизненных форм на основе комплекса показателей (частота регенерации, органогенетический индекс, эффективность микроразмножения) определены оптимальные типы эксплантов для длительного сохранения в условиях *in vitro*. Для древесных и полудревесных растений – это фрагменты побегов, содержащие один - два метамера, для наземных трав – почки возобновления. Для луковичных растений, представителей семейств Alliaceae, Amarilidaceae, Hyacinthaceae, Liliaceae – микролуковички или их сегменты, для представителей семейства Orchidaceae – протокормы (рис. 4).

На наш взгляд, необходимо рассматривать сохранение коллекций *in vitro* как важнейший дополнительный метод в комплексе мер сохранения растений *ex situ*. Особое внимание должно быть уделено генетической репрезентативности и сохранению генетической чистоты таксонов, сохраняемых *in vitro*.

Предполагается создать ДНК-банк ценных, редких и исчезающих видов растений, подкрепленный гербарными образцами и единую интерактивную базу данных по генетическим коллекциям в различных ботанических садах.

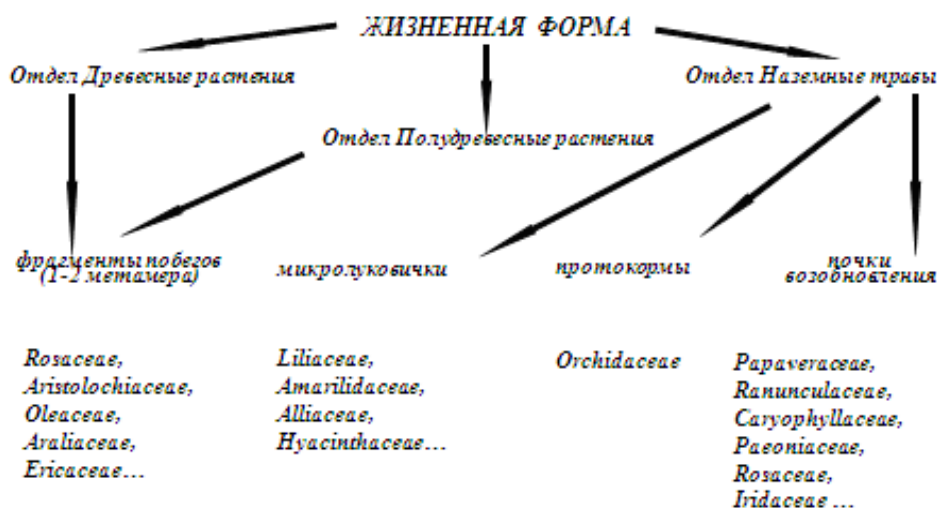


Рис. 4 Схема сохранения растений в условиях *in vitro* (оптимальный тип экспланта для депонирования)

### Выводы

При формировании коллекций *in vitro* используется наиболее важный принцип сохранения биоресурсов *ex situ* – представление вида максимально возможным количеством образцов, происходящих из различных точек ареала.

Для устойчивого воспроизводства растений определены оптимальные экспланты (апикальная меристема с листовыми примордиями). Обоснована возможность прогнозирования регенерационного потенциала в условиях *in vitro* на основе морфологического анализа вегетативных почек древесных растений

При изучении представителей семейств Oleaceae, Actinidiaceae, Rosaceae и др. прослеживается корреляция между динамикой роста при интродукции и темпами развития регенерантов в культуре *in vitro*.

У представителей родов *Actinidia*, *Clematis*, *Rosa*, *Rubus* выявлена тенденция увеличения коэффициента размножения и длины микропобегов при культивировании на питательной среде, содержащей глюкозу.

Для растений разных жизненных форм на основе комплекса показателей (частота регенерации, органогенетический индекс, эффективность микроразмножения) определены оптимальные типы эксплантов для длительного сохранения в условиях *in vitro*. Для древесных и полудревесных растений – это фрагменты побегов, содержащие один – два метамера, для наземных трав – почки возобновления. Для луковичных растений, представителей семейств Alliaceae, Amaryllidaceae, Hyacinthaceae, Liliaceae – микролуковички или их сегменты, для представителей семейства Orchidaceae – протокормы.

В дальнейшем на национальном и международном уровнях планируется создание новых и укрепление существующих генетических банков растений *in vitro* и расширение на их основе исследований в области оценки, изучения и сохранения растительных ресурсов и созданию общих баз данных по существующим коллекциям *in vitro*.

### Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

2. Васильева О.Г. Биолого-морфологические основы клонального микроразмножения некоторых представителей рода *Rhododendron* L. Автореф. канд. дисс. М., 2009. – 20 с.
3. Доспехов Б.А. Методика опытного дела. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
4. Ишмуратова М.И., Ткаченко К.Г. Семена травянистых растений: особенности латентного периода, использование в интродукции и размножении *in vitro*. – Уфа: Гилем, 2009. – 116 с.
5. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – К.: Аграрна наука, 2011. – 344 с.
6. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Браилко В.А., Лесникова-Седошенко Н.П. Биотехнологические и физиологические особенности культивирования *in vitro* ценных генотипов розы эфиромасличной // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2015, № 2 (13). – С. 38-48.
7. Молканова О.И., Чурикова О.А., Коновалова Л.Н., Окунева И.Б. Клональное микроразмножение интродуцированных сортов *Syringa vulgaris* L. // Вестник МГУ. – 2002. – № 4. – С. 8-14.
8. Молканова О.И., Васильева О.Г., Мамаева Н.А., Ветчинкина Е.М., Коновалова Т.Ю. Биотехнологические и молекулярно-генетические методы для сохранения и воспроизводства полезных и редких видов растений // История науки и техники. – 2010. – № 5. – С. 74-79.
9. Молканова О.И., Васильева О.Г., Коновалова Л.Н. Научные основы сохранения и воспроизводства генофонда ценных и редких видов растений в культуре *in vitro* // Бюл. ГБС. – 2015. – Вып. 201. – С. 78-82.
10. Муратова С.А. Соловых Н.В., Терехова В.И. Индукция морфогенеза из изолированных соматических тканей растений / С.А. Муратов. – Мичуринск: Изд-во МичГАУ, 2011. – 107 с.
11. Ростовцева З.П. Верхушечная меристема высших растений. Лекция из курса Биология развития растений. – М.: Издательство МГУ, 1963. – 59 с.
12. Cruz-Cruz C.A., Gonzalez-Arno M.T., Engelmann F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity // Resources. – 2013. – N 2. P. 73-95.
13. Fay M.F. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods // *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. – Plant. – 1992. – V. 28, N 1. – P. 1-4.
14. Quoirin M., Lepoivre P. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. // *Acta Hort.* – 1977. – V. 78. – P. 437-442.

Статья поступила в редакцию 30.08.2016 г.

**Molkanova O.I., Konovalova L.N., Stakheyeva T.S. Propagation and conservation characteristics of valuable and rare species collection *in vitro*** // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 17-23.

The application of isolated plant tissue and organs is getting more and more actual along with traditional plant *ex situ* conservation methods. The most efficient technologies of clonal micropropagation were improved for more than 150 plant species and 1150 variety and forms related to 59 families. The development of reproduction plants methods is the basis of gene pool preservation. Optimum explants were determined for sustainable reproduction of plants (apical meristem with leaf primordia). Scientific and methodological bases for creation and conservation of rare and valuable plants in gene pools *in vitro* are in the stage of development. Most of the collection angiosperm genotypes is stored under conditions of reduced growth rate (3-7°C). The most important factors effecting on storage period *in vitro* were revealed as well. Creating gene banks, scientists pay special attention at representativeness and conservation of genetic stability of plant species.

**Key words:** *biological diversity; stable reproduction; meristematic complex; organogenesis; bank in vitro.*



УДК 634:45:57.085.2

## РАЗЛИЧНЫЕ ПУТИ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ *DIOSPYROS KAKI* THUNB. СОРТА ЗЛОТИСТАЯ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Наталья Николаевна Иванова, Ирина Вячеславовна Митрофанова,  
Сергей Юрьевич Хохлов

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр  
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита  
invitro-plant@mail.ru

Изучено влияние регуляторов роста 6-бензиламинопурина (БАП) и индолил-3-масляной кислоты (ИМК) на регенерацию микропобегов из вегетативных почек хурмы восточной сорт Золотистая. Увеличение концентрации БАП значительно влияло на регенерацию микропобегов и сильнее проявлялось при добавлении ИМК в питательную среду МС с половинной концентрацией макроэлементов  $KNO_3$  и  $NH_4NO_3$ . Максимальная частота регенерации побегов (75%) была получена на среде  $\frac{1}{2}$  МС, дополненной 8,80 мкМ БАП и 0,98 мкМ ИМК через 8 недель после начала эксперимента. Данные, полученные в результате проведенных исследований показывают, что активная регенерация микропобегов хурмы в условиях *in vitro* возможна при добавлении в питательную среду БАП и ИМК. Представлены результаты первых этапов по регенерации микропобегов с использованием в качестве исходных эксплантов высечек листа. Показано, что наличие в питательной среде МС 6,0 и 9,0 мкМ тиадиазурона (ТДЗ) способствовало формированию морфогенного каллуса и дальнейшему органогенезу. Получено до 6-8 микропобегов хурмы сорта Золотистая на высечку листа.

**Ключевые слова:** хурма; экспланты; регуляторы роста; микропобег; органогенез

### Введение

Субтропические плодовые культуры являются источником наиболее важных компонентов питания человека. Климатические условия Крыма позволяют выращивать различные ценные субтропические культуры, среди которых особое место занимает субтропическое растение хурма восточная *Diospyros kaki* Thunb. Плоды хурмы богаты витаминами и полифенольными веществами, каротиноидами, лейкоантоцианами, а также органическими соединениями калия, кальция, железа и йода. Мякоть зрелых плодов содержит 13 органических кислот, включая лимонную и яблочную, красящие и дубильные вещества, макро- и микроэлементы, девять из которых необходимы организму человека. Плоды содержат до 25,9% сахаров, представленных глюкозой и фруктозой. При этом содержание сахарозы незначительное – от 0,3 до 4,7%, что позволяет использовать их как диетический продукт. Кроме того они характеризуются низкой кислотностью, что позволяет использовать плоды при лечении многих заболеваний. Сок хурмы обладает бактерицидными свойствами в отношении кишечных инфекций и золотистого стафилококка. В листьях содержатся почти все микроэлементы и витамины, поэтому они могут служить лечебным средством при анемии [2].

Начиная с конца 80-х годов проводились исследования по микроразмножению хурмы [3, 5, 7, 16]. А.И. Здруйковской-Рихтер в Никитском ботаническом саду через эмбриокультуру были получены растения сорта Россиянка [1]. Эффективная воспроизводимая методика регенерации растений является важным шагом для использования потенциала хурмы. Тем не менее, универсальный протокол для регенерации хурмы, применимый для всех сортов, до сих пор не разработан.

В начале 2000-х годов в отделе биотехнологии растений Никитского ботанического сада был разработан способ прямой регенерации из листовых эксплантов хурмы сорта Меадер [12]. Вместе с тем установлена зависимость

регенерационной способности эксплантов отдельных сортов от сроков введения первичных эксплантов, условий их стерилизации, состава питательной среды и условий культивирования [11].

Цель наших исследований – выявить особенности регенерации растений через органогенез из вегетативных почек и высечек листа у хурмы сорта Золотистая в условиях *in vitro*.

### Объекты и методы исследования

Объект исследования – хурма сорт Золотистая селекции Никитского ботанического сада. Гибрид от скрещивания сортов Триумф и Украинка. Относится к группе константных сортов. Крона полушаровидная, высота 2,5 м. Листья зеленые, яйцевидные, средней величины. Плоды округлые, массой 146-291 г. Сорт десертный. Может использоваться в качестве опылителя [2].

Исследования проводились на базе лаборатории биотехнологии и вирусологии растений Никитского ботанического сада. Для введения в культуру *in vitro* использовали спящие вегетативные почки, изолированные в феврале, а также высечки листьев микропобегов, полученных в условиях *in vitro*. Для освобождения эксплантов от экзогенной инфекции применяли ступенчатую стерилизацию, которая выполнялась в следующей последовательности: сегменты побега с вегетативной почкой погружали в 70%-ный раствор этилового спирта (1 мин), затем в 1%-ный раствор Thimerosal (Sigma, США) на 10 мин и 0,3%-ный раствор Дез ТАБ (действующие вещества: трихлоризоциануровая кислота ( $C_3O_3N_3Cl_3$ ) ТХЦК-45%, натриевая соль дихлоризоциануровой кислоты Na-соль ДХЦК-20%, Медпроминвест, Украина) на 12-15 мин с последующей 3-х кратной промывкой в стерильной дистиллированной воде. В качестве первичных эксплантов использовали сегменты побега с почкой, вегетативные почки с микроцитком, вегетативные почки с удаленными почечными чешуями.

Стерильные экспланты помещали на модифицированную МС среду [13] с половинной концентрацией макроэлементов  $KNO_3$  и  $NH_4NO_3$ , содержащую сахарозу (Россия), агар бактериологический (Panreac, Испания) и дополненную БАП и ИМК (Sigma, США). Экспланты культивировали в пробирках закрытых стерильной фольгой, каждая содержала 30 мл среды и почку, помещенную базальной частью на питательную среду. Для регулирования регенерационных процессов в культуре *in vitro* в питательную среду  $\frac{1}{2}$  МС вводили 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрации 2,20-17,80 мкМ и 0,98 мкМ индолил-3-масляной кислоты (ИМК). Контролем служила среда без БАП. Для размножения полученных микропобегов их переносили на среду  $\frac{1}{2}$  МС с 4,40 мкМ БАП.

Листья в асептических условиях отделяли от микропобегов, культивируемых *in vitro*, разрезали на квадраты с центральной жилкой и черешком листа и помещали на питательную среду МС адаксиально и абаксиально к среде. В колбе находился один лист, рассеченный на 3-4 высечки. Эксперимент состоял из 2 вариантов. Одну часть культивировали на свету, а другую – в отсутствии освещения при 25°C в термостате MIR 254 (SANYO, Япония). В экспериментах использовали цитокинин тидиазурон (ТДЗ, Sigma, США) в концентрациях 6,0; 9,0 и 12,0 мкМ. Контрольной была среда МС с 3,0 мкМ ТДЗ.

Все исследования проводили в асептических условиях в боксе биологической безопасности второго класса SC2 (фирма ESCO, Сингапур). Колбы и пробирки с эксплантами содержали в культуральной комнате с 16-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения  $25-37,5 \mu mol m^{-2}s^{-1}$  при температуре 25-26°C, а также в термостате при 25°C. Субкультивирование эксплантов осуществляли через 3-4 недели. Каждую серию опытов выполняли трижды в десятикратной повторности.

Учитывали регенерационную способность культивируемых эксплантов (частота индукции образования микропобегов и число вновь полученных микропобегов на эксплант). Всю обработку данных осуществляли с помощью программы STATISTICA for Windows, 6.0 StatSoft, Inc. 1984-2001.

### Результаты и обсуждение

Размножаемый материал генетически стабилен, если микропобеги в условиях *in vitro* формируются из апикальных и латеральных почек. Известно, что почечные чешуи некоторых видов растений содержат значительное количество абсцизовой кислоты [18], являющейся стимулятором покоя. Удаление почечных чешуй и добавление регуляторов роста в питательную среду на этапе введения в культуру оказало эффективное влияние на прерывание покоя почек и начало роста микропобегов хурмы сорта Золотистая. Вместе с тем удаление чешуй у вегетативных почек также уменьшило впоследствии количество инфицированных эксплантов.

Для индукции побегообразования нами были использованы регуляторы роста БАП и ИМК. Чаще всего для регенерации микропобегов хурмы *in vitro* применяют зеатин [6, 10, 14], зеатин в комбинации с ИУК [15], зеатин и БАП [3, 9, 11, 12], БАП и НУК [7]. Фукуи и др. [8] установили, что для сорта Nishimurawase БАП был менее эффективен чем зеатин, но только в отношении показателя длины побегов. Зеатин был необходим в качестве индуктора удлинения побегов в концентрациях от  $10^{-5}$  мол/л до  $10^{-4}$  мол/л. Тетсумура [17] рекомендовал заменять зеатин на БАП в среде для множественного побегообразования, поскольку зеатин является самым дорогим цитокинином. В этом случае микропобеги могут успешно развиваться на среде с БАП. Ряд авторов [8] также указывал, что регенерация микропобегов значительно зависит не только от используемого цитокинина, но и от генотипа исходного растения.

В ходе эксперимента нами было установлено, что оптимальными исходными эксплантами являлись вегетативные почки с удаленными почечными чешуями: до 84% эксплантов, помещенных на среду  $\frac{1}{2}$  МС, содержащую 8,90-13,20 мкМ БАП и 0,98 мкМ ИМК образовывали по одному микропобегу (рис 1).

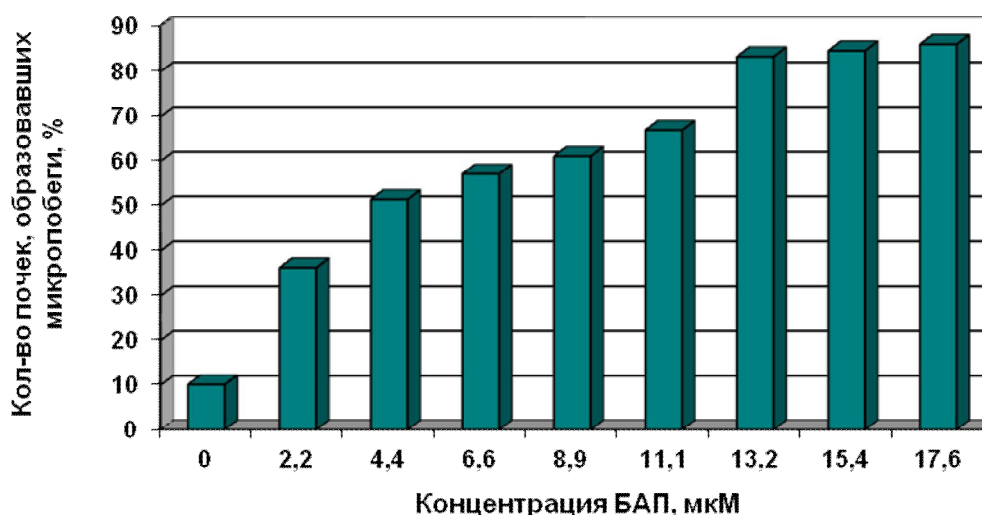


Рис. 1 Регенерационный потенциал первичных эксплантов хурмы сорта Золотистая на питательной среде  $\frac{1}{2}$  МС, дополненной 0,98 мкМ ИМК

Высокая концентрация цитокинина вместе с удалением почечных чешуй способствовала раскрытию почек через 3-4 недели культивирования (рис. 2). Более низкие концентрации БАП были не эффективны.

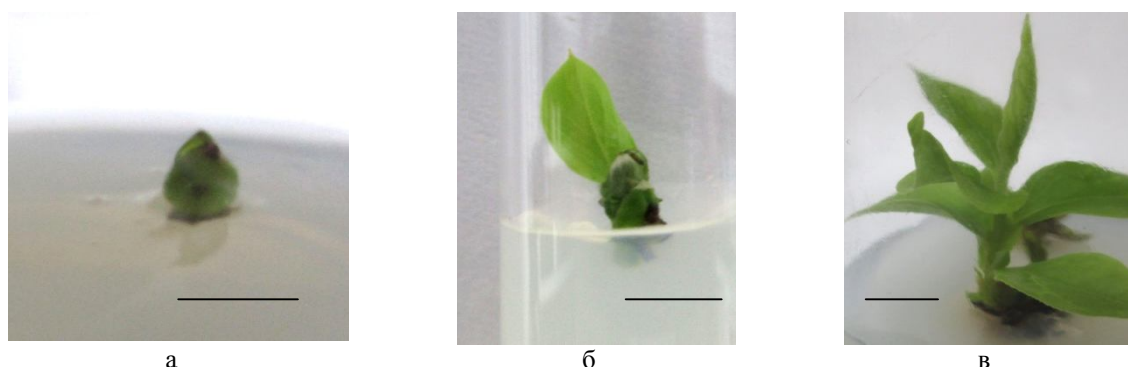


Рис. 2 Регенерация микропобегов хурмы сорта Золотистая в условиях *in vitro*: а) вегетативная почка; б) формирование розетки листьев; в) микропобег в условиях *in vitro* (масштаб 1 см)

Так при использовании 4,40 мкМ БАП наблюдали регенерацию микропобегов у 51,4% введенных вегетативных почек, при этом в присутствии 2,20 мкМ БАП в питательной среде – только у 36,3% эксплантов. Повышение концентрации БАП до 15,4-17,6 мкМ способствовало увеличению количества почек, способных к побегообразованию (84,6-86%). Однако полученные микропобеги были сильно оводненными и в дальнейшем оказались нежизнеспособными.

Микропобеги удлинялись на среде того же состава. Субкультивирование индуцировало формирование дополнительных микропобегов. Коэффициент размножения у полученных адвентивных почек через 4 недели культивирования на среде для удлинения с 4,40 мкМ БАП составлял 2,0 (табл. 1). Средняя длина микропобегов достигала  $20,0 \pm 0,8$  мм. Высокое содержание БАП (6,60-8,90 мкМ) в питательной среде стимулировало образование конгломератов адвентивных микропобегов в базальной части эксплантов. Однако такие побеги были оводненными и не удлинялись. Учитывая то, что процесс микрочеренкования в условиях *in vitro* начинался с того, что каждый побег был разрезан на 2 или 3 сегмента с почкой, можно было получить более чем 5-кратное увеличение коэффициента размножения через 6-8 недель культивирования.

Таблица 1  
Влияние БАП на адвентивное побегообразование хурмы сорта Золотистая в условиях *in vitro*

Концентрация БАП, мкМ	Среднее количество адвентивных микропобегов/эксплант	Средняя длина адвентивных микропобегов, мм
Контроль*	0	0
2,22	$0,5 \pm 0,3$	$10,0 \pm 0,6$
3,55	$1,6 \pm 0,2$	$12,0 \pm 0,7$
4,40	$2,0 \pm 0,2$	$20,0 \pm 0,8$
6,60	$2,2 \pm 0,3$	$16,0 \pm 0,6$
8,90	$2,4 \pm 0,3$	$13,0 \pm 0,4$

\*Среда без цитокинина

В ряде публикаций представлены результаты исследований по использованию высечек листа [4, 9, 10], зародышей, семядолей [12] и гипокотилей [15] для регенерации хурмы *in vitro*. Нам впервые удалось индуцировать регенерацию

микропобегов из органогенного каллуса, образовавшегося на высечках листа хурмы сорта Золотистая с использованием ТДЗ.

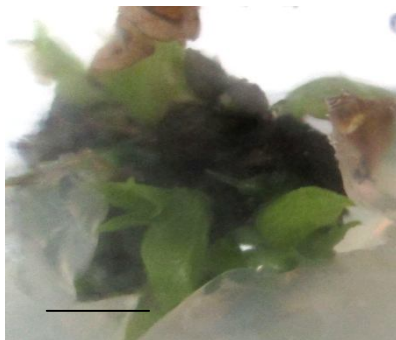
Известно, что разработка способа регенерации микропобегов из высечек листа и сегментов побегов древесных и кустарниковых растений с применением ТДЗ позволяет не только размножать растения, но и изучать процессы морфогенеза в целом. В состав ТДЗ входит фенилмочевина, являющаяся эффективным биорегулятором, который проявляет цитокининовую активность в различных растительных системах, включая и регенерацию растений через органогенез из различных эксплантов [4]. Использование ТДЗ в наших экспериментах в концентрации от 3 до 12 мкМ позволило индуцировать непрямой органогенез из листовых эксплантов хурмы в условиях *in vitro*.

В результате исследований из высечек листа получено 4 типа каллуса: зеленый шаровидный каллус; зеленый каллус с темными зонами; темно-коричневый каллус; светло-серый рыхлый каллус. Высечки листьев, культивируемые в темноте, давали типы каллуса похожие на описанные выше, при этом каллус был белый или светло-коричневый. Вместе с тем формирование каллуса начиналось активнее в темноте. Каллус образовывался в основном в основании черешка и незначительно по краю экспланта (рис. 3).

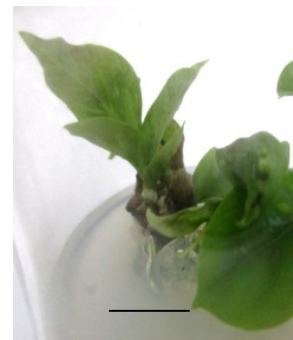
Формирование адвентивных почек наблюдали через 4-6 недель только на поверхности зеленого шаровидного, морфогенного каллуса сначала в виде мелких блестящих зеленых структур (рис. 4), которые затем дифференцировались в микропобеги (рис. 5).



**Рис. 3** Индукция каллусогенеза (через 4 недели культивирования на свету) на среде МС, дополненной 6,0 мкМ ТДЗ (масштаб 1 см)



**Рис. 4** Формирование адвентивных почек из морфогенного каллуса (через 6 недель культивирования на свету) (масштаб 1 см)



**Рис. 5** Микропобеги хурмы сорт Золотистая на среде МС, дополненной 4,40 мкМ БАП и 0,98 мкМ ИМК (масштаб 1 см)

Частота органогенеза достигала 100% из высечек листа через 6 недель культивирования на средах 6 мкМ и 9 мкМ ТДЗ. Культивирование эксплантов свыше 6 недель приводило к регенерации микропобегов из морфогенного каллуса. В результате было получено 6-8 микропобегов хурмы сорта Золотистая на эксплант. Развившиеся микропобеги отделяли от каллуса, микрочеренковали и культивировали на среде  $\frac{1}{2}$  МС, дополненной 4,40 мкМ БАП и 0,98 мкМ ИМК.

### Выводы

Полученные нами экспериментальные данные показывают, что регенерация микропобегов у хурмы сорта Золотистая возможна из вегетативных почек, отобранных в состоянии покоя *ex situ*, и высечек листа, культивируемых *in vitro* микропобегов. При использовании регуляторов роста БАП и ИМК можно получить сравнительно высокую частоту побегообразования для данного сорта. Кроме того, БАП служит заменой

зеатину и представляет интерес для массового производства данной культуры. Показана эффективность ТДЗ как индуктора непрямого органогенеза в культуре высечек листа хурмы восточной сорта Золотистая.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 14-50-00079.*

### Список литературы

1. Здруйковская-Рихтер А.И. Эмбриокультура изолированных зародышей, генеративных структур и получение новых форм растений. – Симферополь: Крым-Фарм-Трейдинг, 2003. – С.290-292.
2. Казас А.Н., Литвинова Т.В., Мязина Л.Ф. Синько Л.Т., Хохлов С.Ю., Чернобай И.Г., Шишкина Е.Г. и др. Субтропические плодовые и орехоплодные культуры: научно-справочное издание. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2012. – С. 172-191.
3. Митрофанова И.В., Казас А.Н., Хохлов С.Ю. Особенности клонального микроразмножения хурмы // Бюлл. Гос. Никит. ботан. сада. – 1998. – Вып. 80. – С. 153-158.
4. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – К: Аграрна наука, 2011. – 344 с.
5. Bellini E., Giordani E. Germoplasm conservation and evaluation of *Diospyros kaki* L. within the European project «minor fruit tree species conservation» // Acta Hort. – 1997. – Vol. 436. – P. 69-76.
6. Cooper P.A., Cohen D. Micropropagation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki*) // Plant Prop Soc. – 1985. – Vol. 34. – P. 118-124.
7. Fukui H., Nishimoto K., Murase I., Nacamura M. Somatic embryogenesis from the leaf tissues continuously subcultured shoots Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) // J Jpn Soc Hort Sci. – 1988. – Vol. 38. – P. 465-469.
8. Fukui H., Sugiama M., Nakamura M. Shoot tip culture of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) // J Jpn Soc Hort Sci. – 1989. – Vol. 58. – P.43-47.
9. Kochanova Z., Onus N., Brindsa J. Adventitious shoot regeneration from dormant buds of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cv. Hachiya // Journal of Agrobiology. – 2011. – Vol. 28 (2). – P. 113-118.
10. Liu Y., Ma J., Tang X., Song C. Study on the adventitious shoot regeneration of persimmon leaves // Hubei Agri Sci. – 2006. – Vol. 45. – P. 618-621.
11. Mitrofanova I., Ivanova N. Biotechnological approaches of persimmon explants introduction to *in vitro* culture // Abstract Book of II. Intl. Plant Breeding Cong-ress and Eucar-pia – Oil and Protein Crops Section Conf. (November 1-5, 2015, Antalya, Turkey). Antalya, 2015. – P. 119.
12. Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V. Development of recipient system of woody subtropical plants *in vitro* // Acta Univ. Latviensis Biol. – 2004. – Vol. 676. – P. 189-196.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol.15, N 3. – P. 473-497.
14. Naval M.M., Llacer G., Badenes M.L., Giordani E. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of the persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cv. «Rojo Brillante» // Acta Hort. – 2009. – Vol. 833. – P.183-186.
15. Sun Q., Sun H., Lin Q., Shi Y. Plant regeneration from hypocotyls of persimmon // Deciduous Fruits. – 2000. – Vol. 11. – P. 4-5.
16. Tao R., Murayama H., Moriguchi K., Sugiura A. Plant regeneration from callus cultures



derived from primordial leaves // Hort Science. – 1988. – Vol. 23. – P. 1055-1056.

17. *Tetsumura T.* Effect of tupes of cytokinin used vor *in vitro* shoot proliferation of persimmon on the subsequent rooting of shoots // Acta Hort. – 1997. – Vol. 436. – P. 143-148.

18. *Wood B.W.* Axillary shoot abscission in pecan and its relationship to growth regulators // Journal of American Society of Horticultural Science. – Vol. 113. – P. 713-717.

*Статья поступила в редакцию 01.08.2016 г.*

**Ivanova N.N., Mitrofanova I.V., Khokhlov S.Yu.** Various regeneration ways of *Diospyros kaki* Thunb. cultivar “Zolotistaya” *in vitro* // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 24-30.

The article covers study analysis of such growth regulators influence as 6-benzylaminopurine (BAP) and indoline-3- butyric acid (IBA) on regeneration of microshoots from vegetative buds of *Diospyros kaki* Thunb., cultivar Zolotistaya. Increasing concentration of biologically active substances (BAS) significantly influenced on regeneration of microshoots and much more intensified if IBA was added into culture medium MS with half concentration of such macroelements as KNO<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Maximum rate of shoots regeneration (75%) was obtained in medium ½ MS, supplied with 8,80 mkM BAS and 0,98 mkM IBA in 8 weeks after experiment was launched. The findings reveal that active regeneration of *Diospyros* microshoots *in vitro* is possible if to enrich culture medium with BAS and IBA. The article presents results of primary stages of microshoots regeneration applying leaf excision as initial explants. 6,0 and 9,0 mkM of thidiazuron (TDZ) in culture medium favored further formation of morphogenic callus and organogenesis. Based on leaf excision 6-8 *Diospyros* (“Zolotistaya” cultivar) microshoots became experiment result.

**Key words:** *Diospyros*; *explants*; *growth regulators*; *microshoot*; *organogenesis*

УДК 581.165

## ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *LABURNUM ANAGYROIDES* MEDIC.

Светлана Николаевна Тимофеева<sup>1</sup>, Ольга Ивановна Юдакова<sup>2</sup>,  
Анна Игоревна Степанова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> УНЦ «Ботанический сад» Саратовского государственного университета имени  
Н.Г. Чернышевского, г. Саратов  
410010, г. Саратов, ул. Навашина, 1  
timofeevasn@mail.ru

<sup>2</sup> Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, г. Саратов  
410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83  
yudakovaoi@info.sgu.ru

Изучены особенности клонального микроразмножения *Laburnum anagyroides* Medic. (сем. Leguminosae) с использованием тканей семян на среде MS, дополненной 0,5 мг/л БАП. Проведен гистологический анализ морфогенеза. Показано, что развитие пазушных и адвентивных побегов является результатом пролиферативной активности меристем первичного экспланта. Для увеличения количества получаемого посадочного материала по разработанной методике допустимо использование как пазушных, так и адвентивных побегов.

**Ключевые слова:** бобовник анагировидный; микроразмножение; морфогенез *in vitro*.

### Введение

При озеленении городов важно учитывать не только эколого-физиологические особенности растений, но и их эстетические характеристики. Ценными декоративными показателями обладает Бобовник анагировидный или «золотой дождь» (*Laburnum*

*anagyroides* Medic.) – кустарник или небольшое дерево из сем. *Leguminosae*. Во время цветения многочисленные кисти золотисто-желтых соцветий, длиной до 30 см, буквально осыпают растение. Кроме того, во всех частях растения содержится алкалоид цитизин, широко применяемый в медицинской практике как стимулятор дыхания и кровообращения. Также цитизин входит в состав таблеток «Табекс», используемых для борьбы с курением [2].

*L. anagyroides* широко культивируется в странах Средиземноморья [4, 9], однако в России он до сих пор встречается главным образом в ботанических садах. Его интродукция часто осложняется малой эффективностью размножения традиционными способами (черенками, прививкой, семенами) [1, 7]. Решить данную проблему можно с привлечением методов клонального микроразмножения. В отделе генетики и репродуктивной биологии УНЦ «Ботанический сад» Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского была разработана методика клонального микроразмножения *L. anagyroides* с использованием вегетативных почек зрелого дерева [13]. Известно, что ювенильные ткани сеянцев в стерильной культуре обычно характеризуются более высоким регенерационным потенциалом [6]. В связи с этим, целью данного исследования было изучение возможности клонального микроразмножения *L. anagyroides* с использованием тканей сеянцев и определение путей морфогенеза побегов в стерильной культуре.

#### Объекты и методы исследования

Донором растительного материала было 12-летнее деревце *L. anagyroides*, которое растет в полевых условиях УНЦ «Ботанический сад» Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского. Для наших экспериментов семена были собраны в конце сентября, после чего их хранили в темноте при комнатной температуре.

В работе использовали общепринятые в биотехнологии методы культуры тканей [3]. Для поверхностной стерилизации сухие семена помещали в 1% р-р синтетического моющего средства «Ариэль» («Проктер энд Гембел», Новомосковск, Россия), при постоянном помешивании выдерживали 20 мин, промывали 20 мин проточной водой. Для преодоления физического покоя семена заливали горячей водой ( $\approx 90^{\circ}\text{C}$ ), выдерживали в таких условиях 20-30 мин до остывания воды. В стерильных условиях ламинар-бокса семена помещали в 0,1% раствор сулемы (Sigma-Aldrich, Германия) на 15 мин, трижды промывали стерильной дистиллированной водой, после чего семена помещали на поверхность твердой питательной среды.

Для проращивания семян использовали питательную среду Мурасиге-Скуга, MS [10], с добавлением витаминов по прописи среды, 20 г/л сахарозы (Реахим, Россия), 7 г/л агара (Panreac, Испания). В качестве индуктора морфогенеза использовали 6-бензиламинопурин (БАП) (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 0,5 мг/л. рН сред был скорректирован до 5,8 – 6,0 до автоклавирования. Среду автоклавировали 20 мин при  $120^{\circ}\text{C}$ .

После раскрытия семядольных листьев и появления первого настоящего листа корни проростков отсекали и экспланты, состоящие из части гипокотыля, пары семядольных листьев и эпикотыля, пассировали на среды для размножения.

Для множественного побегообразования использовали среды различного минерального состава: MS,  $\frac{1}{2}$  MS и WPM [10]. В качестве индукторов морфогенеза были изучены БАП (0,5; 2,0 и 4,0 мг/л) и тидиазурон (ТДЗ) (Sigma-Aldrich, Германия) (0,5; 2,0 и 4,0 мг/л). Все среды содержали витамины по прописи соответствующей среды, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара. Всего было использовано 10 вариантов сред.



Для проращивания семян использовали чашки Петри, последующие этапы размножения осуществляли в стеклянных колбах объемом 200 мл. Как в чашки Петри, так и в колбы добавляли по 25 мл питательной среды. Культуры выращивали в культуральной комнате при температуре  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  при 14 ч фотопериоде, используя Osram Fluora лампы (3 клк).

Продолжительность каждого субкультивирования составляла 8 недель. По окончании субкультивирования учитывали количество эксплантов, из которых образовывались побеги, количество и длину вновь образовавшихся побегов, наличие/отсутствие каллусной ткани. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ AGROS.

Морфогенез побегов изучали на гистологических препаратах, приготовленных по разработанной нами ускоренной методике с использованием техники просветления растительных тканей [5]. Экспланты фиксировали ацетоалкоголем (3:1) темпорально через 4, 5, 6, 7, 8 недель, 3 и 4 месяца после пассирования. Зафиксированные экспланты промывали проточной водой в течение 1 сут, затем помещали их в пробирки Эпиндорфа с глицерином, где выдерживали не менее 5 сут. После этого на предметном стекле с помощью лезвия делали вертикальные и горизонтальные срезы экспланта толщиной около 0,5 мм. Полученные срезы переносили на другое предметное стекло в каплю просветляющей жидкости Герра [8], закрывали покровным стеклом. Препарат помещали в чашку Петри и оставляли на 3 – 5 сут для просветления. Анализ препарата проводили с помощью стереомикроскопа «Discovery» (С. Zeiss, Германия). Фотографирование препарата осуществляли с использованием фотоадаптера Canon и программы визуализации изображения Zoombrauser.

### Результаты и обсуждение

Проведенное исследование показало, что через 4 недели первичного культивирования проросло  $85 \pm 5\%$  семян. Большинство проростков не имели аномалий развития. Для микроразмножения использовали только нормально развитые проростки.

После переноса на среды для размножения экспланты начинали активно расти и развиваться. Одновременно с ростом первичного и пазушных побегов в базальной части экспланта формировалась каллусная ткань. На всех изученных вариантах сред из всех инициированных эксплантов (100%) образовывались как побеги, так и каллус. Однако состав питательной среды существенно влиял на количество и длину вновь образующихся побегов (Табл.). Среднее количество вновь образующихся побегов варьировало от 3,0 до 4,7, средняя длина побегов – от 11,0 до 29,7 мм. Максимальное число побегов (4,7) было зафиксировано на среде MS с добавлением 0,5 мг/л БАП. Максимальная средняя длина побегов (29,7 мм) – на среде MS с добавлением 2,0 мг/л БАП.

Таблица  
Влияние состава питательной среды на микроразмножение побегов *L. anagyroides*

минеральный состав	Питательная среда		Количество побегов, шт.	Длина побегов, мм
	цитокинин, мг/л			
1	БАП	ТДЗ	4	5
MS	0,5		4,7 d	21,5 d
	2,0		3,1 ab	29,7 e
	4,0		3,4 ab	14,5 bc
		0,5	4,4 cd	16,7 c
		2,0	3,1 ab	15,8 bc
		4,0	3,2 ab	15,5 bc

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5
½MS	0,5		3,5 abc	16,8 с
	2,0		3,2 ab	16,9 с
WPM	0,5		4,1 bcd	11,0 а
	2,0		3,0 а	13,0 ab
F			4,5*	28,1*

Примечание: Средние значения по двум повторностям, в каждой повторности по 10 эксплантов. Данные, обозначенные разными буквами в одном столбце, достоверно различаются друг от друга при  $P \leq 0.05$  по результатам однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA, Duncan's Multiple Range Test). \* $P \leq 0.05$ .

При культивировании на среде MS как БАП, так и ТДЗ в концентрации 0,5 мг/л стимулировали развитие максимального количества побегов (4,7 и 4,4, соответственно), при этом средняя длина побегов на среде с БАП была достоверно выше (21,5 мм), чем на среде с ТДЗ (16,7 мм). Кроме того, на среде с БАП развивались нормальные побеги, тогда как на среде с ТДЗ формировались побеги с различными морфозами (недоразвитие листовых пластинок, «бутылочное» разрастание базальной части побега, сильно сближенные междоузлия). Аналогичные данные были получены в культуре семян *Cassia siamea* (Leguminosae) [12]. Следует отметить, что на средах различного минерального состава цитокинины БАП и ТДЗ в низких концентрациях (0,5 мг/л) стимулировали формирование максимального количества побегов. С увеличением концентрации цитокинина в среде количество и длина вновь образующихся побегов уменьшались, появлялись признаки витрификации тканей.

Тестирование сред различного состава показало, что среда MS, дополненная 0,5 мг/л БАП, является оптимальной как для инициации стерильной культуры, так и для собственно микроразмножения побегов. При помещении побега на вышеуказанную среду в базальной части побега через 4–5 недели культивирования появлялась каллусная ткань светло-желтого цвета, которая активно нарастала одновременно с ростом и развитием первичного и пазушных побегов. Через 6–7 недель в каллусной ткани формировались плотные округлые структуры, из которых затем прорастали адвентивные побеги (в среднем 4–5 побегов). Через 8 недель эксплант, как правило, представлял собой конгломерат побегов разного возраста и стадий развития (Рис.).

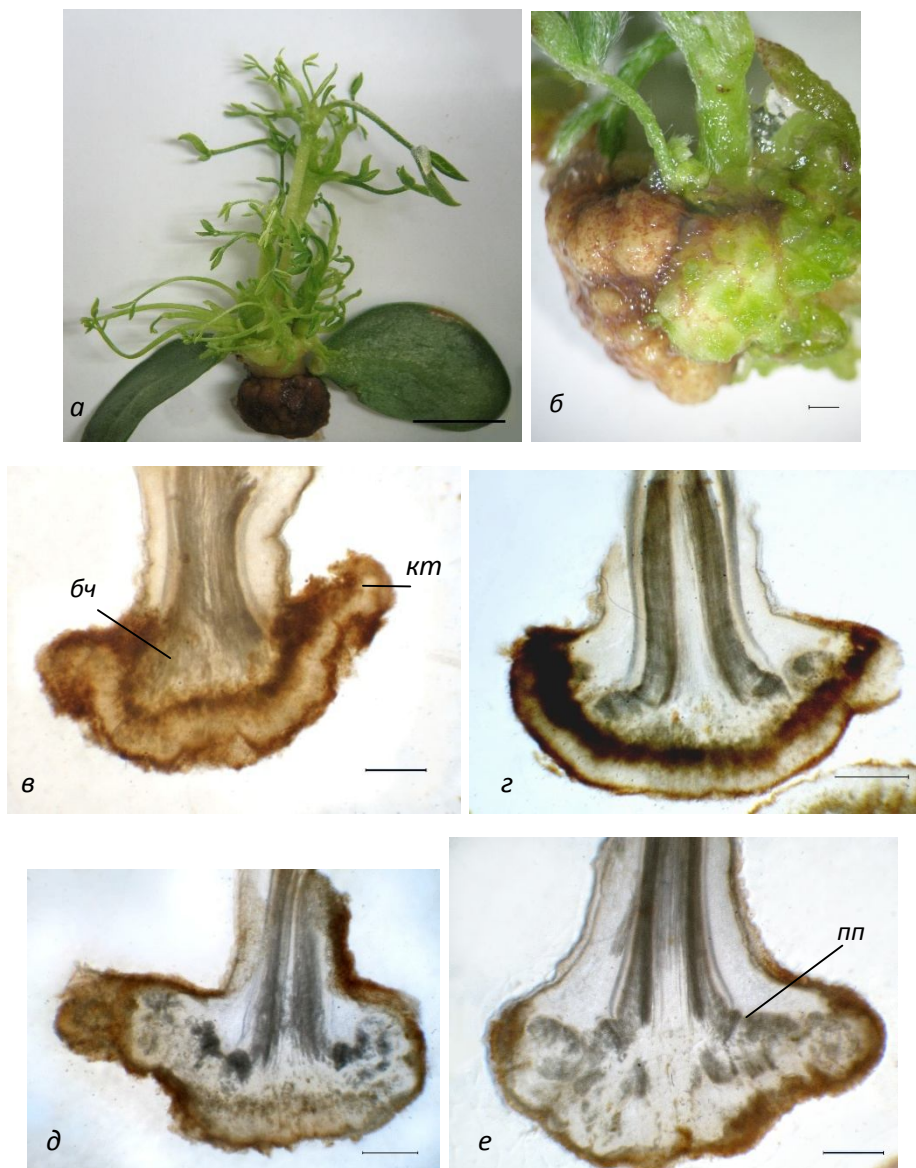
Как известно, развитие побегов в стерильной культуре может быть результатом прямого органогенеза из тканей экспланта или непрямого органогенеза из каллуса. В последнем случае существует риск соматоклональной изменчивости [6]. Для определения путей морфогенеза нами было проведено гистологическое исследование эксплантов.

Анализ продольных срезов эксплантов, зафиксированных через 4 недели культивирования на среде MS, дополненной 0,5 мг/л БАП, показал гистологическую неоднородность каллуса. Верхняя часть его состояла из недифференцированных клеток. Центральную область занимала разросшаяся в зоне среза базальная часть побега. Она состояла из паренхимных клеток сердцевин и проводящих пучков. Форма и анатомическое строение гипертрофированной части побега свидетельствуют о том, что разрастание явилось результатом пролиферативной активности как клеток камбия, так и клеток феллогена, перимедулярной зоны сердцевин и лучевой паренхимы. Нижняя часть каллуса была представлена двумя слоями клеток: темноокрашенными клетками феллемы и светлоокрашенными клетками феллодермы.

Через 6–7 недель культивирования базальная часть первичного побега продолжала разрастаться за счет увеличения объема формирующихся проводящих пучков. Через 7–8 недель на проводящих пучках образовывались глобулярные

структуры. Они представляют собой очаги повышенной пролиферативной активности, дающие начало адвентивным побегам.

Через 3 – 4 месяцев культивирования количество зон повышенной пролиферативной активности, способных дать начало адвентивным побегам, продолжало возрастать и достигало нескольких десятков, что свидетельствует о высокой регенерационной способности культуры *L. anagyroides*.



**Рис. Культура побегов *L. anagyroides*, полученная на среде MS с добавлением 0,5 мг/л БАП:**  
*a* – побеги и калусная ткань, развившиеся через 6 недели культивирования; *б* – глобулярные структуры, сформировавшиеся в калусной ткани (8 недель культивирования); *в* – калусная ткань (*кт*), сформировавшаяся в базальной части (*бч*) экспланта (4 недели культивирования); *z-e* – пролиферация базальной части первичного побега внутри каллуса и дифференциация в ней проводящих пучков (*пп*) (6, 7 и 8 недель культивирования, соответственно). Масштаб: *a* – 1 см; *б-e* – 0,1 см

### Выводы

Проведенное исследование показало, что питательная среда MS, дополненная 0,5 мг/л БАП, является оптимальной для клонального микроразмножения *L. anagyroides* в культуре семян. Результаты проведенного гистологического анализа позволяют констатировать несколько последовательных этапов морфогенеза на данной

питательной среде. Пролиферативная активность клеток феллогена, камбия, перимедулярной зоны сердцевины, клеток лучевой паренхимы приводит к формированию каллуса, нижняя часть которой подвергается опробковению за счет дифференциации клеток феллемы. В каллусе происходит инициация проводящих пучков, на которых образуются очаги с повышенной пролиферативной активностью, дающие начало адвентивным побегам. Таким образом, все вновь образующиеся побеги (как пазушные, так и адвентивные) являются результатом пролиферативной активности меристем первичного побега и могут быть использованы для массового размножения растительного материала *L. anagyroides*.

### Список литературы

1. Балабушка В.К. Результаты испытания регуляторов роста при размножении древесных интродуцентов летними черенками / В.К. Балабушка // Бюлл. ГБС. – 1990. – Вып. 156. – С. 65 – 67.
2. Волынский Б.Г., Бендер К.И., Фрейдман С.Л., Богословская С.И., Глазырина Г.А., Капрелова Т.С., Колоскова И.Г., Кузнецова С.Г., Мартынов Л.А., Хлебников А.Н., Хохлова Д.С. Растения в медицине. – Саратов: изд-во Саратов. ун-та, 1983. – 440 с.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наук. Думка, 1980. – 488 с.
4. Колесников А.И. Декоративная дендрология. – М.: Лесная промышленность, 1974. – 704 с.
5. Юдакова О.И., Гупорова О.В., Беляченко Ю.А. Методы исследования репродуктивных структур и органов растений. – Саратов: изд-во Саратов. ун-та, 2012. – 38 с.
6. George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J. Plant Propagation by Tissue Culture. – Springer, 2008. – 300 p.
7. Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T., Geneve R. Plant propagation: principles and practices. – Verlag, 2010. – 864 p.
8. Herr Jm.J.M. A new clearing-squash technique for study of ovule, development in angiosperms // Amer. J. Bot. – 1971. – Vol. 20, № 8. – P. 785 – 790.
9. Heywood V.H. Flowering plants of the world. – Batsford: BT Londres, 1993. – 336 p.
10. Lloyd G., McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // Comb Proc Intl Plant Prop Soc. – 1980. – Vol. 30. – P. 421 – 427.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473 – 497.
12. Parveen S., Shahzad A., Saema S. In vitro plant regeneration system for *Cassia siamea* Lam., a leguminous tree of economic importance // Agrofor Syst. – 2010. – Vol. 80. – P. 109 – 116.
13. Timofeyeva S.N., Elkonin L.A., Tyrnov V.S. Micropropagation of *Laburnum anagyroides* Medic. through axillary shoot regeneration // In Vitro Cell Dev Biol. Plant. – 2014. – Vol. 50. – P. 561 – 567.

Статья поступила в редакцию 09.08.2016 г.

**Timofeyeva S.N., Yudakova O.I., Stepanova A.I. Histological aspects of clonal micropropagation of *Laburnum anagyroides* Medic // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 30-35.**

The special features of clonal micropropagation of *Laburnum anagyroides* Medic. (Leguminosae) were studied, based on cultivation of seedlings explants on the MS medium supplemented with 0.5 mg/l BAP. The histological study of the explant tissue to determine morphogenesis pathways was conducted in terms of the research. It was found that axillary and adventitious shoots arise as a result of proliferation of meristematic tissues of primary explant. Axillary and adventitious shoots may be used to increase the efficiency of micropropagation.

**Keywords:** *Laburnum anagyroides*; micropropagation; morphogenesis in vitro

УДК 633.81:57.085.2

## ВЛИЯНИЕ СОРТА И ФАКТОРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* НА КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РОЗЫ ЭФИРОМАСЛИЧНОЙ

Наталья Алексеевна Егорова<sup>1,2</sup>, Ирина Викторовна Ставцева<sup>2</sup>,  
Ирина Вячеславовна Митрофанова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Никитский ботанический сад – Национальный научный центр  
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита

<sup>2</sup>ФГБУН «НИИ сельского хозяйства Крыма», 295493, РФ, г. Симферополь,  
ул. Киевская, 150  
yegorova.na@mail.ru

Исследовано развитие меристемных культур пяти сортов розы эфиромасличной (Мичуринка, Лань, Радуга, Лада, Фестивальная) на 2-м этапе микроразмножения в зависимости от состава питательной среды, генотипа и количества субкультивирований *in vitro*. Выявлена эффективность использования для размножения питательной среды МС с добавлением 1,0 мг/л БАП, 0,2 мг/л ИУК, 0,5 мг/л гибберелловой кислоты. При анализе развития меристемных культур в течение 9 субкультивирований показано, что коэффициенты размножения к 3-му субкультивированию увеличились, достигнув максимума у 'Радуги' (15,7) и 'Мичуринки' (13,2), а в дальнейшем – варьировали от 4,6 до 8,2, в зависимости от сорта и количества субкультивирований.

**Ключевые слова:** сорт: *Rosa damascena*; *R. gallica*; *R. alba*; культура меристем; субкультивирование; микроразмножение

### Введение

Роза эфиромасличная является одним из наиболее древних и популярных ароматических растений. Она возделывается преимущественно в странах Средиземноморья и Ближнего Востока, а в России – в Крыму. Продукты переработки розы (прежде всего, эфирное масло, а также конкрет, розовая вода, лепестки цветков, плоды и др.) пользуются неизменно высоким спросом на отечественном и мировом рынке и широко применяются в парфюмерно-косметической и пищевой промышленности, а также в медицине при лечении целого ряда заболеваний: сердечно-сосудистой системы, органов дыхания, пищеварения и др. [7]. Интенсификация селекции и семеноводства связана с привлечением современных биотехнологических приемов, в том числе методов клонального микроразмножения, позволяющих ускорить размножение ценных генотипов, получить оздоровленный безвирусный посадочный материал для закладки промышленных плантаций высокопродуктивных сортов [1, 5]. Такие методы являются также основой создания коллекций генетической плазмы, что актуально в связи с необходимостью сохранения и расширения генетического разнообразия как культурных, так и дикорастущих видов растений.

К настоящему времени исследований, связанных с вопросами клонального микроразмножения розы эфиромасличной, в отличие от декоративных видов и сортов розы, проведено не очень много [9-11, 13, 14]. При введении в культуру в качестве эксплантов обычно использовались пазушные или апикальные почки и меристемы [6, 8, 10, 14], верхушки побегов [9, 10], сегменты стебля с узлом [12, 17]. Имеются сведения о применении для микроразмножения *Rosa damascena* прямой индукции побегов из листовых эксплантов или черешков листа [цит. по: 13]. В ряде работ было отмечено ингибирующее действие продуктов окисления фенольных соединений на развитие эксплантов. Поэтому для снижения этого негативного явления в питательную

среду в качестве антиоксидантов авторы вводили аскорбиновую или лимонную кислоту [8, 10, 17]. Имеются данные о влиянии времени изоляции эксплантов на их развитие *in vitro*, в частности, в работе болгарских исследователей указывалось, что оптимальным сроком отбора почек был период с мая по июль [14], тогда как в условиях Южного берега Крыма лучшими сроками введения эксплантов в культуру были февраль-март [6]. Большинство исследований по эфиромасличной розе касаются вида *Rosa damascena* и они в основном посвящены оптимизации питательных сред для разных этапов микроразмножения, при этом рекомендуемые гормональные составы сред весьма разнообразны [11, 12, 13, 17]. Многие сорта розы, выращиваемые в нашей стране, представляют межвидовые гибриды, полученные при скрещивании *R. damascena*, *R. gallica*, *R. alba* [7] что, учитывая генетическую зависимость процессов морфогенеза *in vitro*, является дополнительной предпосылкой для проведения исследований по разработке биотехнологии размножения сортов розы эфиромасличной.

В задачи данной работы входило исследование морфогенеза меристемных культур пяти сортов розы эфиромасличной на 2-м этапе микроразмножения в зависимости от генотипа, состава питательной среды и количества субкультивирований *in vitro*.

### Объекты и методы исследования

В исследованиях были использованы сорта розы эфиромасличной – Мичуринка, Лань, Радуга, Лада, Фестивальная, полученные при участии видов *Rosa damascena* Mill., *R. gallica* L., *R. alba* L. [7]. В качестве первичных эксплантов использовали меристемы с 2-3 листовыми примордиями (размером 0,4-0,6 мм), выделенные из пазушных почек однолетних побегов растений, выращенных в коллекционном питомнике ФГБУН «НИИСХ Крыма» в условиях Предгорной зоны Крыма (с. Крымская Роза, Белогорский район). Сегменты побегов стерилизовали с применением 70% этанола и 50% раствора препарата «Брадофена». При введении в культуру *in vitro*, культивировании и приготовлении питательных сред использовали традиционные методы, принятые в работах по культуре тканей и органов растений [1, 4]. Экспланты культивировали на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) [4] с добавлением регуляторов роста растений – кинетина, БАП, ИУК, гибберелловой кислоты (ГК) (Sigma, США). В качестве углевода в среду вводили сахарозу или глюкозу. Продолжительность каждого субкультивирования составляла 30-35 сут.

Культивирование меристем и побегов проводили при 26°C, 70% влажности, освещённости 2-3 тыс. люкс и 16-часовом фотопериоде. В конце каждого субкультивирования определяли количество развивающихся эксплантов, число и длину побегов, количество листьев или узлов, частоту множественного побегообразования. Коэффициент размножения (КР) рассчитывали как количество микрочеренков, которое можно получить за одно субкультивирование. Для этого количество развивающихся из эксплантов побегов умножали на число эксплантов для микроразмножения. Опыты проводили в 2-3-х кратной повторности, в каждом варианте анализировали не менее 20 эксплантов. Экспериментальные данные обработаны статистически согласно общепринятым методам с использованием пакета программ Microsoft Office (Excel 2007). На графиках представлены средние значения признаков и доверительные интервалы.

### Результаты и обсуждение

Для введения в асептическую культуру меристем пяти сортов розы мы использовали ранее оптимизированную питательную среду МС, содержащую БАП, ГК



и 2% глюкозы [3]. Изоляцию эксплантов проводили в летний период, когда была отмечена максимальная частота развивающихся эксплантов (до 92-98%). Через месяц культивирования меристем наблюдали увеличение размеров эксплантов до 4-10 мм, развитие 1-5 листьев, а также формирование дополнительных почек и небольших розеток листьев (представляющих микропобеги с укороченными междоузлиями). Наиболее активно образование дополнительных почек (с частотой до 70-90%) при введении *in vitro* происходило у сортов Лань и Радуга.

Для дальнейшего размножения на 2-м этапе полученные из меристем укороченные микропобеги (имеющие вид розетки с несколькими листьями) переносили на свежую питательную среду. При культивировании почек или микропобегов наблюдали развитие не только основного побега, но также пазушных и адвентивных (у основания побега). При этом формировались побеги с укороченными междоузлиями (имеющие вид розеток с 4-7 листьями), а в более поздних пассажах – также и удлиненные побеги с 3-5 узлами и нормально развитыми междоузлиями. После первого субкультивирования развивалось в среднем от 1,7 ('Лань') до 4,0 шт. ('Радуга') побегов на эксплант (табл. 1).

Таблица 1

Влияние количества субкультивирований и генотипа на развитие эксплантов розы эфиромасличной на втором этапе микроразмножения *in vitro*

Количество субкультивирований	Сорт	Число побегов, шт.	Длина побега, мм	Число эксплантов для размножения, шт.
1	Мичуринка	3,9±0,4	12,4±0,4	1,3±0,1
	Лань	1,7±0,3	11,8±0,8	1,2±0,1
	Лада	3,1±0,5	13,2±0,5	1,4±0,1
	Радуга	4,0±0,4	12,1±0,2	1,2±0,1
	Фестивальная	2,2±0,6	9,9±0,5	1,2±0,1
3	Мичуринка	6,3±0,8	16,4±0,8	2,1±0,1
	Лань	3,2±0,5	14,1±0,5	2,1±0,1
	Лада	4,5±1,2	16,9±1,4	2,5±0,2
	Радуга	6,4±0,7	15,7±0,6	2,5±0,1
	Фестивальная	3,7±0,7	13,7±1,4	1,6±0,3
5	Мичуринка	2,2±0,2	11,7±0,6	2,4±0,2
	Лань	2,5±0,3	11,9±0,5	2,1±0,2
	Лада	2,1±0,2	12,2±0,8	2,2±0,2
	Радуга	2,2±0,2	13,0±0,8	2,9±0,3
	Фестивальная	1,5±0,3	16,0±1,2	4,4±0,5

При последующем субкультивировании наблюдали не только повышение числа побегов на эксплант (в 3-м субкультивировании в среднем до 6,4 шт. у 'Радуги'), но и увеличение их длины. Такие побеги с нормальными междоузлиями можно использовать для микрочеренкования, разделяя их на сегменты с 1 узлом длиной 5-7 мм. Анализ морфологии развивающихся побегов свидетельствует о возможности использования для размножения розы *in vitro* как микропобегов с укороченными междоузлиями (микророзеток), так и микрочеренков из нормально развитых побегов, что позволяет получить больше эксплантов для дальнейшего размножения и повысить коэффициент размножения. Поэтому на 2-м этапе микроразмножения в качестве эксплантов использовали микророзетки с 4-5 листьями, а в случае развития нормальных побегов (до 20-40 мм) с 3-5 узлами – микрочеренки (сегменты стебля с 1 узлом длиной 5-7 мм). При подсчете коэффициента размножения учитывали все экспланты для размножения, как розетки с 3-5 листьями, так и микрочеренки с 1 узлом.

Для изучения влияния количества субкультивирований и генотипа на эффективность размножения розы было проведено микрочеренкование побегов или отделение микророзеток и несколько субкультивирований меристемных культур пяти сортов (Мичуринка, Лань, Радуга, Лада, Фестивальная). Проанализированы морфометрические параметры развития эксплантов на этапе собственно микроразмножения и получены данные о влиянии сорта на эффективность размножения в течение 9-ти субкультивирований *in vitro*. Как видно из представленных данных, многие изученные параметры (см. табл. 1) и коэффициент размножения (рис. 1) к 3-му субкультивированию увеличились. Коэффициент размножения достиг максимума у сортов Радуга (15,7) и Мичуринка (13,2) в 3-м субкультивировании. В следующем, 4-м субкультивировании, у 'Радуги' и 'Лады' происходило достоверное снижение КР, у 'Мичуринки' наблюдали аналогичную тенденцию. У сорта Фестивальная в 4-м пассаже КР достиг наибольшего значения в опыте. В течение дальнейших 5-9 субкультивирований наблюдали снижение и некоторую стабилизацию этого параметра, который варьировал от 4,6 до 8,2, в зависимости от сорта и количества субкультивирований. Однако, следует отметить, что в 8-9 субкультивировании у сорта Лада происходило достоверное увеличение КР по сравнению с 5-7 субкультивированием (см. рис. 1).

Повышение коэффициента размножения к 3-4 субкультивированию в культуре меристем ранее нами было показано для лаванды, однако у других изученных эфиромасличных растений (герани, шалфея, фенхеля) значительных изменений этого показателя в результате первых субкультивирований не наблюдали [2]. При анализе микроразмножения *R. damascena* в течение 4-х субкультивирований иранские ученые установили, что в 1-м субкультивировании уровень пролиферации был выше, чем в последующих [12]. Для *R. moschata* также сообщалось о более высокой интенсивности пролиферации в первом субкультивировании, тогда как во втором число побегов снижалось [цит. по: 13]. В то же время Кумар с соавт. показали возможность успешного размножения *R. damascena* в течение 8-12 субкультивирований, после которых побеги пролиферировали даже на безгормональной питательной среде [15].

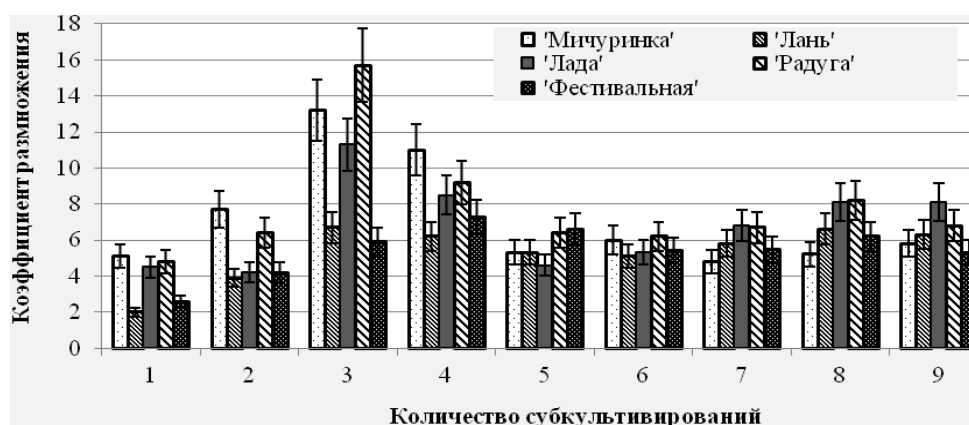


Рис. 1 Влияние количества субкультивирований и генотипа на коэффициент размножения розы эфиромасличной *in vitro*

При сравнении морфогенеза меристемных культур разных генотипов в течение длительного культивирования следует отметить, что лучшее развитие побегов и более высокие коэффициенты размножения были у сортов Радуга, Мичуринка и Лада. Преимущество этих сортов особенно хорошо проявилось в течение первых 4-х субкультивирований (см. рис. 1). Затем, в 5-9-м субкультивировании, различия между



генотипами стали не так существенны, хотя сорта Лада и Радуга проявили более высокую регенерационную активность. Значительное влияние генотипа на индукцию процесса морфогенеза и эффективность микроразмножения *in vitro* отмечалось во многих работах для сортов и видов розы эфиромасличной [6, 13, 16], а также для многих других видов растений [5].

Состав питательной среды для микроразмножения *in vitro* является одним из важнейших факторов культивирования. При оптимизации питательной среды для 2-го этапа размножения розы микропобеги с 1 узлом сортов Радуга и Мичуринка (после 5-го субкультивирования) культивировали на 15-ти модификациях питательной среды МС, различающихся по составу и содержанию регуляторов роста (БАП, кинетин, гибберелловая кислота, ИУК) и углеводов (табл. 2). В качестве контрольной была использована ранее рекомендованная среда МСР6, которая ранее использовалась нами на этапе введения в культуру [3].

Таблица 2

**Влияние состава питательной среды (ПС) на развитие эксплантов розы эфиромасличной сортов Радуга и Мичуринка на втором этапе микроразмножения *in vitro***

№ ПС	Состав ПС (регуляторы роста, мг/л)	Количество побегов, шт.		Длина побега, мм		Коэффициент размножения	
		Радуга	Мичуринка	Радуга	Мичуринка	Радуга	Мичуринка
1	2	3	4	5	6	7	8
МСР6	БАП (1,0); ГК (0,1); глюкоза 2%	2,5±0,2	2,6±0,2	12,7±0,6	10,7±0,4	6,3±0,4	5,5±0,4
МС490	Кинетин (1,0); ГК (0,1); глюкоза 2%	1,1±0,1	1,0	9,8±0,4	7,8±0,6	2,1±0,2	1,2±0,1
МС491	БАП (0,5); сахароза 2%	1,5±0,2	1,6±0,2	8,8±0,4	13,2±1,5	2,4±0,2	4,0±0,3
МС492	БАП (1,0); сахароза 2%	1,2±0,1	2,0±0,1	8,3±0,3	8,4±1,3	1,7±0,1	2,8±0,2
МС493	БАП (2,0); сахароза 2%	1,5±0,1	1,0	9,0±0,3	11,1±1,9	2,3±0,2	1,7±0,2
МС510	БАП (3,0); сахароза 2%	1,6±0,2	1,8±0,4	9,7±0,5	10,6±0,5	2,6±0,2	3,2±0,2
МС494	БАП (1,0); глюкоза 2%	2,2±0,3	1,6±0,2	10,7±0,9	9,6±0,5	4,8±0,5	2,6±0,3
МС495	БАП (1,0); ИУК (0,5); сахароза 2%	1,3±0,1	1,4±0,2	10,2±0,8	10,2±0,5	2,7±0,3	2,5±0,3
МС496	БАП (1,0); ИУК (0,5); ГК (0,5); сахароза 2%	1,3±0,1	1,3±0,2	8,4±0,6	7,2±0,5	2,1±0,2	1,4±0,2
МС497	БАП (0,5); ГК (0,5); сахароза 2%	1,5±0,1	1,2±0,2	9,7±0,6	9,9±0,8	2,7±0,2	2,4±0,2
МС498	БАП (0,5); ГК (0,5); глюкоза 2%	2,9±0,3	2,4±0,3	11,6±0,3	12,6±0,7	7,5±0,6	5,5±0,4
МС511	БАП (1,0); ГК (0,5); глюкоза 2%	3,1±0,3	2,9±0,3	12,1±0,5	11,0±0,5	7,1±0,5	6,1±0,5
МС512	БАП(1,0); ГК (0,5); сахароза 2%	2,3±0,3	2,8±0,3	10,6±0,5	9,8±0,5	4,6±0,4	5,3±0,5
МС513	БАП (1,0); ИУК (0,2); ГК (0,5); глюкоза 2%	3,5±0,4	3,2±0,3	12,3±0,6	11,1±0,4	8,4±0,5	6,4±0,5
МС515	БАП (1,0); ИУК (0,2); ГК (0,5); сахароза 2%	1,4±0,2	1,2±0,1	9,8±0,6	9,7±0,7	2,4±0,2	1,9±0,2

Как видно из представленных данных, замена БАП на кинетин (МС490), использование в составе питательной среды в качестве углевода сахарозы и разных концентраций БАП (МС 491, МС492, МС493, МС510) было неэффективным для обоих сортов – коэффициенты размножения на этих средах были ниже, чем на контрольной среде (от 1,2 до 3,2). Не способствовало повышению коэффициента размножения использование и ряда других модификаций питательной среды с БАП, ИУК, ГК и сахарозой (МС495, МС496, МС497, МС515). Максимальные коэффициенты размножения в данном опыте (8,4 для ‘Радуги’ и 6,4 для ‘Мичуринки’) были получены при добавлении в состав среды БАП (1,0 мг/л), ИУК (0,2 мг/л), гибберелловой кислоты (0,5 мг/л) и 2% глюкозы (см. табл. 2). На этой среде МС513 у обоих сортов было наиболее высокое число побегов на эксплант (3,2-3,5 шт.). Следует отметить сортовые отличия при культивировании эксплантов на разных питательных средах. У ‘Радуги’ было выявлено достоверное повышение КР на среде МС513 по сравнению с контрольной, тогда как у ‘Мичуринки’ отмечена лишь тенденция к увеличению данного параметра. Тем не менее, данную среду можно рекомендовать для выращивания меристемных культур изученных сортов на 2-м этапе микроразмножения розы эфиромасличной.

Имеющиеся литературные данные по составу питательных сред для микроразмножения розы эфиромасличной достаточно разнообразны. Большинство авторов в качестве цитокинина рекомендуют введение в состав питательной среды БАП [6, 12, 14, 16, 17]. При этом иранские ученые использовали относительно высокие концентрации этого регулятора роста – до 3,0 мг/л [12] и 4,0 мг/л [17]. Вместе с тем была показана эффективность применения кинетина [8], тидиазурона [13, 15] или совместного использования цитокинина, ГК и ауксина (НУК, ИУК) [11, 13, 16]. Нудез с соавт. установили, что увеличение содержания  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{FeSO}_4$  в питательной среде способствовало увеличению в 5-10 раз числа побегов у *R. damascene* [17]. В то же время другим исследователем [18] для этого вида розы была выявлена эффективность введения в состав среды не только БАП и НУК, но и флороглюцина. Для изученных нами сортов розы эфиромасличной, как видно из представленных данных, наиболее высокие коэффициенты размножения были отмечены при введении в состав среды МС 1,0 мг/л БАП совместно с 0,2 мг/л ИУК и 0,5 мг/л гибберелловой кислоты.

### Выводы

На основании исследования меристемных культур пяти сортов розы эфиромасличной (Мичуринка, Лань, Радуга, Лада, Фестивальная) на 2-м этапе микроразмножения показано что их развитие зависит от генотипа, состава питательной среды и количества субкультивирований *in vitro*. В результате изучения влияния 15 модификаций питательной среды Мурасиге и Скуга на морфогенез эксплантов сортов Радуга и Мичуринка выявлена эффективность использования для размножения среды МС с добавлением 1,0 мг/л БАП, 0,2 мг/л ИУК, 0,5 мг/л гибберелловой кислоты. При анализе развития меристемных культур в течение 9 субкультивирований показано, что коэффициент размножения к 3-му субкультивированию увеличился, достигнув максимума у ‘Радуги’ (15,7) и ‘Мичуринки’ (13,2), а в дальнейшем – варьировал от 4,6 до 8,2, в зависимости от сорта и количества субкультивирований.

**Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 14-50-00079.**

### Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Якимова О.В., Каменек Л.И., Кривохатко А.Г. Некоторые аспекты клонального микроразмножения и сохранения *in vitro* эфиромасличных растений // Таврический вестник аграрной науки. – 2015. – №1(3). – С.18-24.
3. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Кривохатко А.Г., Каменек Л.И., Золотилов В.А. Получение гибридов с использованием эмбриокультуры и микроразмножение розы эфиромасличной *in vitro* // Проблемы современной науки. – 2015. – Вып. 17. – С. 31-41
4. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений – Киев: Наук. думка. 1980. – 488 с.
5. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. – К.: Наукова думка, 2005. – 270 с.
6. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Брашко В.А., Лесникова-Седошенко Н.П. Биотехнологические и физиологические особенности культивирования *in vitro* ценных генотипов розы эфиромасличной // Известия Вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2015. – №2(13). – С. 37-48.
7. Назаренко Л.Г., Афонин А.В. Эфиромасличные юга Украины. – Симферополь: Таврия, 2008. – 144 с.
8. Шкопинский Е.А., Таланкова-Середа Т.Е., Грищенко Ю.Ю., Добридень А.А., Гетьман А.А. Клональное размножение розы эфиромасличной (*Rosa L.*) *in vitro* / Вестник Запорожского национального университета. – 2014. - №1. – С.31-38.
9. Baig M.M.Q., Hafiz I.A., Hussain A., Ahmad T., Abbasi N.A. An efficient protocol for *in vitro* propagation of *Rosa gruss an teplitz* and *Rosa centifolia* / African J. of Biotechnology. – 2011. – Vol.10, N22. – P. 4564-4573.
10. Canli F.A., Kazaz S. Biotechnology of Roses: progress and future prospects // Suleyman Demirel Universitesi Orman Fakultesi Dergisi. – 2009. – N1. – P.167-183.
11. Ginova A., Tsvetkov I., Kondakova V. *Rosa damascena* Mill. – an overview for evaluation of propagation methods // Bulgarian Journal of Agricultural Science. – 2012. – Vol. 18, N 4. – P. 545-556
12. Jabbarzadeh Z., Khosh-Khui M. Factors affecting tissue culture of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) // Sci. Hort. – 2005. – 105, N 4. – P. 475–482.
13. Khosh-Khui M. Biotechnology of scented Roses: a review // International Journal of Horticultural Science and Technology. – 2014. – Vol. 1, N 1. – P. 1-20.
14. Kornova K., Michailova J. Optimizing the rooting process in propagation of kanzak oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.) *in vitro* // Propagation of Ornamental Plants. – 2008. – 8, N 4. – P. 224–229.
15. Kumar A., Sood A., Palni U., Gupta A., Palni L.M. Micropropagation of *Rosa damascena* Mill. from mature bushes using thidiazuron // J. Hort. Sci. Biotechnol. – 2001. – Vol. 76, N 1. – P. 30-34.
16. Nikbakht A., Kafi M., Mirmasoumi M., Babalar M. Micropropagation of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.) cvs Azaran and Ghamsar // International Journal of Agriculture and Biology. – 2005. – Vol. 7, N 4. – P. 535-538.
17. Noodezh H.M., Moieni A., Baghizadeh A. *In vitro* propagation of the Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2012. – Vol.48, N 6. – P. 530–538.
18. Salekjalali M. Phloroglucinol, BAP and NAA enhance axillary shoot proliferation and other growth indicators *in vitro* culture of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) // American-Eurasian J. Agric. And Environ. Sci. – 2012. – Vol.12, N 7. – P.960-966.

Статья поступила в редакцию 08.08.2016 г.

Yegorova N.A., Stavtseva I.V., Mitrofanova I.V. Influence of cultivar and cultivation factors *in vitro* on the essential oil rose clonal micropropagation // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 36-43.

The development of meristem cultures of five essential oil rose cultivars (Lany, Raduga, Lada, Michurinka, Festivalnaya) was investigated on the second stage of micropropagation, depending on the composition of the culture medium, genotype and number of subcultures *in vitro* were studied as well. The efficiency of MS used for medium propagation, supplemented with 1,0 mg/l BAP, 0,2 mg/l IAA, 0,5 mg/l gibberellic acid was revealed in terms of the research. . When analyzing the development of meristem cultures during 9 subcultivations it was shown that the reproduction coefficient increased by the third subcultivation, reaching maximum for 'Raduga'(15.7) and 'Michurinka' (13.2), and subsequently – ranged from 4,6 to 8,2, depending on cultivar and a number of subcultivations.

**Keywords:** *cultivar; Rosa damascena; R. gallica; R. alba; meristem culture; subcultivation; micropropagation*

## БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 58.08:543.05

### БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ ЗАПАДНОГО КАВКАЗА

Виктор Николаевич Бехтерев<sup>1,2</sup>, Татьяна Михайловна Коломиец<sup>1</sup>,  
Валентина Ивановна Маляровская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур»,  
Россия, Сочи  
malyarovskaya@yandex.ru

<sup>2</sup>Сочинский государственный университет, Россия, Сочи  
vic-bekhterev@yandex.ru

Показано, что применение метода экстракционного вымораживания позволяет существенно повысить селективность экстракции природных органических веществ. Этот метод позволил уже на начальной стадии экстракции органических веществ из корней иглицы понтийской *Ruscus ponticus* Wogonow отделить углеводы от стероидных сапонинов. Установлено, что углеводный состав органической и водной фазы экстракта иглицы существенно отличается. Применение экстракционного вымораживания на этапе извлечения целевых компонентов позволяет отделять углеводы от остальных фракций БАВ, оставляя сахара преимущественно в водной фазе, при этом суммарная концентрация фруктозы, глюкозы и сахарозы в водной части ( $\approx 0,9\%$ ), что выше, чем в ацетонитрильной фракции ( $\approx 0,3\%$ ). В этанольных экстрактах синеголовника морского *Eryngium maritimum* L. с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии идентифицирован ряд ценных БАВ, в том числе фалкаринол (относительное содержание которого,  $\approx 18\%$ ) и стигмастерол (относительное содержание  $\approx 23\%$ ).

**Ключевые слова:** *Иглица понтийская; Синеголовник морской; экстракционное вымораживание; хроматография.*

### Введение

Сохранение биологического разнообразия – одна из важнейших задач в деле охраны природы. Связано это с ограниченностью необходимых для существования человека биологических ресурсов и угрозой их истощения. На территории Западного

Кавказа сосредоточено более 65% редкого генофонда, подлежащего охране на государственном и региональном уровнях.

Интерес к изучению биохимического состава редких и исчезающих видов растений Западного Кавказа обусловлен, с одной стороны, необходимостью более глубокого понимания особенностей их физиологии, роли тех или иных природных химических соединений в повышении устойчивости к неблагоприятным условиям внешней среды с целью сохранения регионального фиторазнообразия [1]. С другой стороны, он связан также с поиском биологически активных веществ (БАВ), которые могли бы в перспективе стать прототипами разрабатываемых биологически активных синтетических аналогов и лекарственных средств.

В этой связи, актуальным является внедрение новых технологий выделения и концентрирования целевых органических соединений из растительного материала. Важнейшими критериями методов извлечения должны быть высокая эффективность, снижение термического и химического воздействия на исследуемый образец, оптимизация, сокращение временных затрат и многостадийности процедуры, как следствие, уменьшение потерь извлекаемых компонентов.

Целью настоящей работы было исследование биохимического состава иглицы понтийской *Ruscus ponticus* Woronow и синеголовника морского *Eryngium maritimum* L. редких и исчезающих видов растений флоры Западного Кавказа, а также оценка эффективности метода экстракционного вымораживания (ЭВ) [2].

Иглица понтийская (*Ruscus ponticus* Woronow) – реликтовое растение третичного периода, ареалом распространения в России которого является Крым и Кавказ. Корневище иглицы содержит стероидные сапонины – рускозиды, состоящие из агликона – рускогенина или его изомера неорускогенина и углеводной части, присоединенной к С<sub>1</sub>-гидроксилу и содержащей до 4-х молекул сахаридов (раминоза, глюкоза, арабиноза) и целый ряд других БАВ [3, 4].

Синеголовник морской (*Eryngium maritimum* L.) редкий, исчезающий вид флоры Западного Кавказа. В России он произрастает в Калининградской области, Ростовской области, а также в Краснодарском крае. Синеголовник можно встретить в Западном Закавказье: в районе береговой линии от Туапсе до Адлера (окр. г. Туапсе, от р. Шахе до р. Псоу, берег моря у пос. Аше, Кучук-Дере, г. Сочи, (мыс Константиновский, к. п. Адлер, окр. с. Веселое) [4]. В Красной книге РФ *Eryngium maritimum* имеет категорию статуса 2 (таксоны и популяции с неуклонно сокращающейся численностью, которые при дальнейшем воздействии факторов, снижающих численность, могут в короткие сроки попасть в категорию находящихся под угрозой исчезновения). Причинами сокращения ареала являются усиление хозяйственной деятельности человека в естественных местах обитания, а также использование растения в лекарственных целях.

### Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлось растительное сырье иглицы понтийской, собранной в октябре 2014г. в районе горы Благодать г.Сочи, и синеголовника морского, собранного в июле 2014г. в районе Нижнеимеретинской низменности г.Сочи.

Экстракцию свободных сапонинов из высушенного на воздухе измельченного корня Иглицы осуществляли смесью воды с ацетонитрилом в соотношении 1:1 при кипячении в стеклянной колбе с обратным холодильником в течение 2 часов. Объем экстрагента брали такой, чтобы над поверхностью пробы был его слой толщиной не менее 1 см. Полученные ацетонитрильные экстракты с целью удаления воды и углеводов, извлечения БАВ в органический растворитель подвергали экстракционному вымораживанию в условиях центрифугирования пробы (ЭВЦ) на лабораторной установке, описанной в [5, 6], в стеклянных виалах емкостью 12 мл (National Scientific)

с герметично завинчивающимися пробками. Условия концентрирования экстракта: скорость вращения ротора – 4000 об./мин (фактор разделения 1450g), температура – минус  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , время процедуры – 25 мин. В результате кристаллическая фаза льда с дисперсными твердыми частицами находилась внизу виалы, в верхней части – прозрачный светло-желтый ацетонитрильный экстракт. Получаемые ацетонитрильные экстракты объединяли и затем концентрировали с помощью вакуумно-ротационного испарителя «Rotavapor R215». Окраска концентрата – желто-коричневая.

Определение углеводов (моно- и дисахаридов) в экстрактах иглицы понтийской осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с рефрактометрическим детектированием по методике [8] на аналитическом комплексе-хроматографе «Accela-600» (Thermo Scientific, USA). В основе метода лежит обращено-фазовый вариант высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) определения углеводов, активно применяемый в настоящее время в анализе пищевых продуктов, БАД и решении научно-исследовательских задач. Нижний предел обнаружения сахаров составлял 0,5 г/кг. Условия хроматографирования:

- температура детектора  $+36^\circ\text{C}$ , температура колонки  $+35^\circ\text{C}$ ;
- элюент 20 % ацетонитрил в дистиллированной воде, скорость потока 800 мкл/мин;
- колонка с неподвижной аминопропильной фазой Restek Ultra Amino Columns (USP L8)  $3\ \mu\text{m}$  ( $100\text{\AA}$ ), длиной 100 мм, внутренним диаметром 3 мм;
- объем инжектируемой пробы 10 мкл.

Определение углеводов в экстрактах иглицы понтийской проводили методом абсолютной калибровки. Расчет содержания  $C_x$  (%) изучаемых сахаридов осуществляли по формуле, усредняя результат в серии определений:

$$c_x = \frac{m_{cm} \times S_x \times 100}{S_{cm} \times M_{np}} \quad (1)$$

где  $m_{cm}$  – масса определяемого компонента в стандартном образце, г;

$S_x$  и  $S_{cm}$  – площади хроматографического максимума определяемого компонента на хроматограммах пробы и в стандартном образце;

$M_{np}$  – масса аналитической навески взятой на исследование пробы, г.

Извлечение природных органических веществ из свежего растительного материала синеголовника (1 г) вели путем мацерации при комнатной температуре 95% этанолом (5 мл) в пенициллиновом флаконе с полиэтиленовой пробкой после измельчения. Продолжительность стадии мацерации с периодическим перемешиванием (четыре-пять раз в сутки) составляло 7 дней. Компонентный состав экстракта изучали с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии на основе электронной базы спектральных данных NIST. Использовали газовый хроматограф “Focus SSL/DSQ” Thermo Scientific (USA), детектор DSQ II с ионизацией электронным ударом 70 эВ, колонка TR-5MS  $30\text{m} \times 0.25\text{mm}$  ID=0.25мкм, режим программирования  $T_{\text{кол.}}$ :  $70^\circ\text{C}$  – 1 мин, затем  $30^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $280^\circ\text{C}$ ,  $T_{\text{инж.}}$ :  $230^\circ\text{C}$

### Результаты и обсуждение

Изучение биохимического состава получаемых экстрактов иглицы понтийской является важным этапом поиска и разработки наиболее оптимальных технологических решений получения природных БАВ из растительных объектов.

На рисунках 1 и 2 приведены хроматограммы углеводного состава ацетонитрильного экстракта корневища иглицы и водной части исходного извлечения после процедуры ЭВЦ.

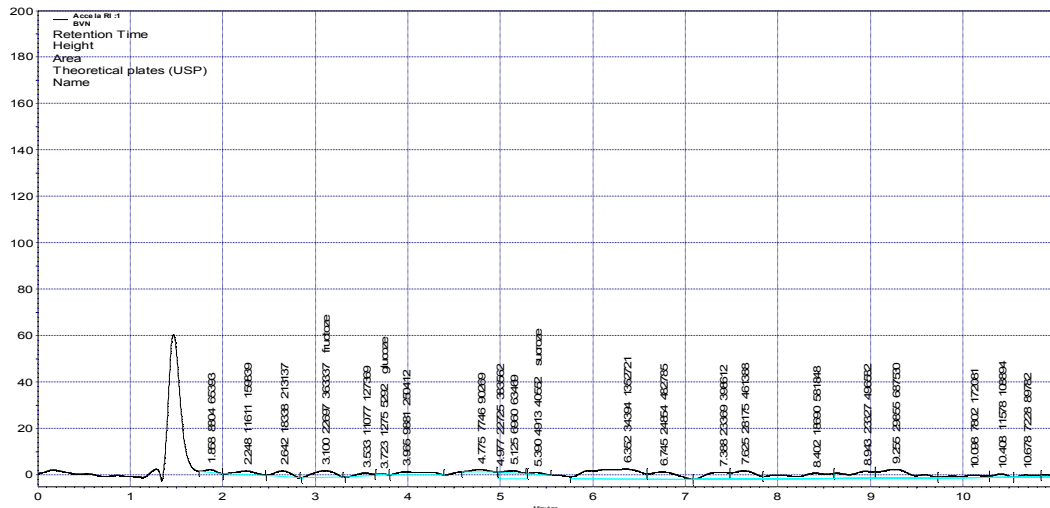


Рис. 1 ВЭЖХ исследование ацетонитрильного экстракта корня иглицы понтийской после процедуры ЭВЦ в режиме определения сахаридов

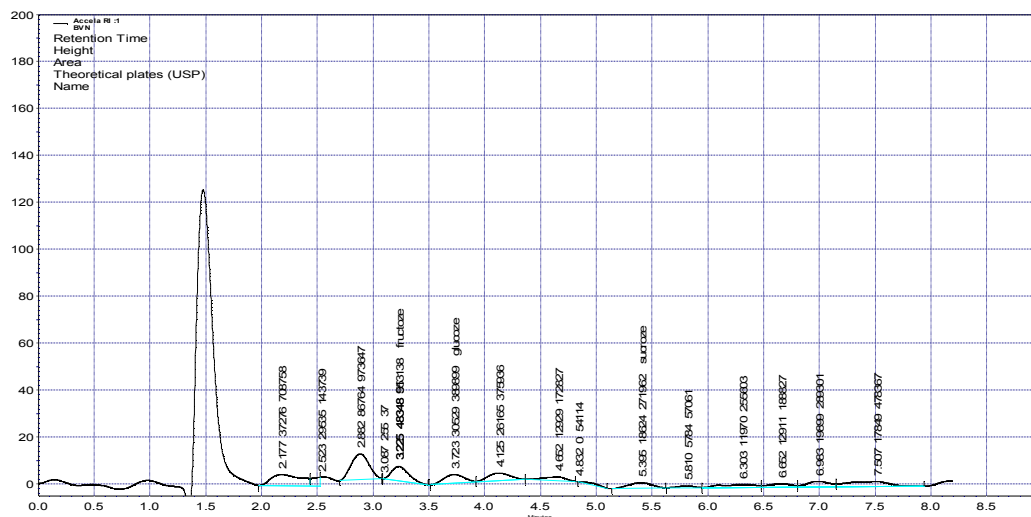


Рис. 2 ВЭЖХ исследование водной фракции экстракта корня иглицы понтийской после процедуры ЭВЦ в режиме определения сахаридов

Анализ представленных хроматограмм (рис. 1, 2) с учетом результатов количественного определения сахаридов методом ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием в полученных экстрактах иглицы (таб. 1) свидетельствует, что применение экстракционного вымораживания на этапе извлечения целевых компонентов позволяет отделять углеводы от остальных фракций БАВ, оставляя сахара преимущественно в водной фазе. Суммарная концентрация фруктозы, глюкозы и сахарозы в водной части ( $\approx 0,9\%$ ) втрое выше, чем в ацетонитрильной фракции ( $\approx 0,3\%$ ).

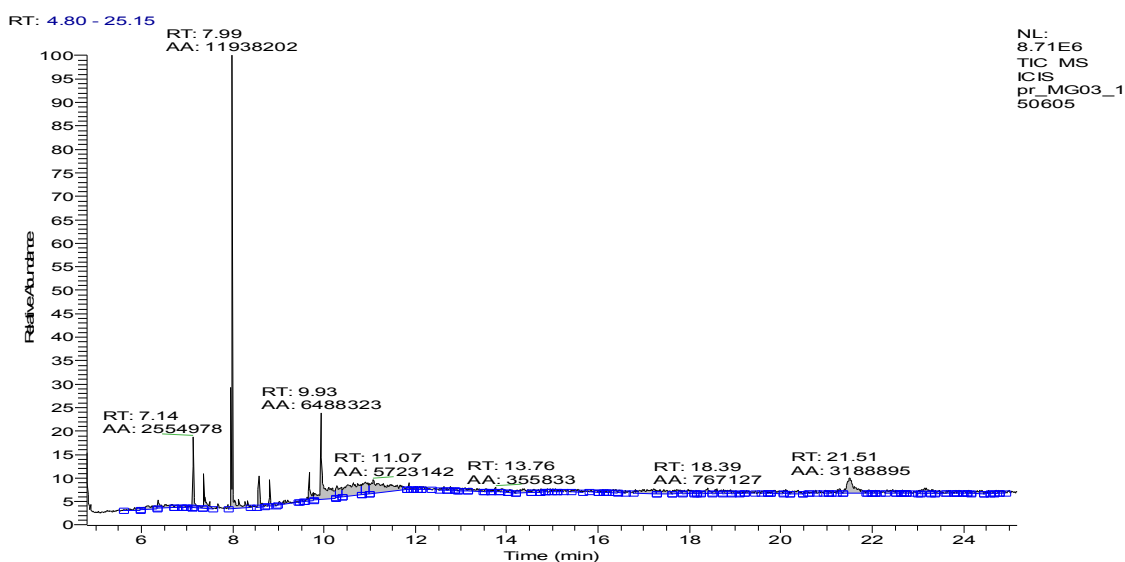
В отличие от известной технологии выделения сапонинов из корней иглицы [8], в которой в качестве экстрагента используют водно-спиртовую смесь, получаемые ацетонитрильные экстракты после ЭВЦ упариваются до сухого состояния на порядок быстрее. Объяснением, на наш взгляд, является низкое содержание углеводов, которые в результате данной процедуры концентрируются в водной части образца. Следовательно, использование метода экстракционного вымораживания позволяет повысить избирательность выделения изучаемых природных органических соединений из растительной массы (табл. 1).

Таблица 1

**Содержание сахаридов в экстрактах иглицы понтийской после выполнения ЭВЦ**

Экстракт	Содержание сахаров, %		
	фруктоза	глюкоза	сахароза
Ацетонитрильная фракция (органическая фаза)	0,04	0,17	0,13
Водная часть	0,28	0,36	0,21

При хромато-масс-спектрометрическом исследовании спиртовых экстрактов синеголовника морского был идентифицирован ряд эндогенных органических веществ и определено их относительное содержание: эндо-1,5,6,7-тетраметилбицикло[3,2]гепт-6-ен-3-ол; 2-гидрокси-4-изопропил-7-метокситропан; 3,4-гексадиеналь, 2-бутил-2-этил-5-метил; 1-(4-метоксифенил)-1-циклогексанкарбоновая кислота; эремофилен; (-)- $\alpha$ -панасинсен; 2,4,5-трихлорфенил-4-(октилокси)бензоат; 3-метил-2-бутеновой кислоты 2,6-диметилнон-1-ен-3-ин-5-иловый эфир; 3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ол; этилпальмитат; фалкаринол; фитол; этиллиноленат; стигмастерол (рис. 3).



**Рис. 3 ГХ-МС исследование этанольного экстракта синеголовника**

Из общего количества обнаруженных в этанольных вытяжках органических соединений с наибольшей степенью достоверности (до 70%) идентифицированы фалкаринол (относительное содержание  $\approx$  18%) и стигмастерол (относительное содержание  $\approx$  23%). Это ценные биологически активные вещества, которые используются в медицине. Являясь непредельными соединениями, могут быть отнесены к классу натуральных антиоксидантов. Так, к примеру, фалкаринол содержится в корнях американского женьшеня. Стигмастерол, входящий в состав структурных компонентов клеточных мембран, также является типичным представителем природных органических веществ.

### Заключение

Таким образом, методами высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии, газовой хромато-масс-спектрометрии установлена возможность повышения селективности выделения целевых природных органических соединений уже на стадии сепарации и экстракции за счет применения способа ЭВ в сочетании с центрифугированием.



В биологических пробах у эндемичного вида синеголовника морского определены и идентифицированы четырнадцать эндогенных органических веществ, среди них ряд ценных БАВ, в том числе фалкаринол и стигмастерол.

Полученные результаты перспективны и могут быть в дальнейшем использованы для разработки технологии получения ценных биологически активных веществ из биомассы иглицы понтийской и синеголовника морского.

### Список литературы

1. Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Бехтерев В.Н. Влияние света различного спектрального состава на биометрические и физиолого-биохимические показатели синеголовника морского (*Eryngium maritimum* L.) в культуре *in vitro* // Проблемы развития АПК региона 2015. - №4 - С.22-28.
2. Бехтерев В.Н. Патент РФ на изобретение № 2303476 // Способ извлечения органических веществ из водных сред экстракцией в сочетании с вымораживанием // Б.И. – 2007. – №21.
3. Simona De Marino. Novel Steroidal Components from the Underground Parts of *Ruscus aculeatus* L. // *Molecules*. – 2012. – V.17. – P. 14002-14014.
4. Красная книга Краснодарского края. Том Растения и грибы. – Краснодар: ООО «Дизайн Бюро № 1», 2007. - 640 с.
5. Бехтерев В.Н. Патент РФ на изобретение №2564999 // Способ извлечения органических веществ из водных сред экстракционным вымораживанием в поле центробежных сил // Б.И. – 2015. – №28.
6. Бехтерев В.Н. Экстракционное вымораживание карбоновых кислот из водного раствора в ацетонитрил в условиях действия поля центробежных сил // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2015. – Т.15. – Вып.5. – С. 280-289.
7. Guvenc A., Satir E., Coskun M. Determination of Ruscogenin in Turkish *Ruscus L.* Species by UPLC // *Chromatographia Supplement*. 2007. V. 66, P. 141-145.
8. Томашевская О.Ю. Фармакогностическое изучение и стандартизация иглицы шиповатой и сухого экстракта на ее основе: Автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.02 / ВИЛАР РАСХН. – М., 2009. – 24 с.

Статья поступила в редакцию 26.07.2016 г.

**Bekhterev V.N., Kolomiyets T.M., Malyarovskaya V.I. Biochemical researches of rare and endangered species within West Caucasus // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 43-48.**

In terms of the research it was found out freezing extraction makes it possible to increase selectivity of natural organic substances extraction. On the initial stage of natural organic substances extraction out of *Ruscus ponticus* Woronow roots this method permits to separate carbohydrates from steroid saponins. It was determined that carbohydrate composition of organic and aqueous phases of *Ruscus ponticus* Woronow extraction differs a lot. Extraction freezing while obtaining the target components enables to separate carbohydrates from other fractions BAS, leaving saccharides mainly in the aqueous phase; in this way total concentration of fructose, glucose and sucrose in aqueous phase makes  $\approx 0,9\%$ , what is higher than in acetonitrile fraction  $\approx 0,3\%$ . In ethanol extracts of *Eryngium maritimum* L. a number of BAS including falcarinol ( $\approx 18\%$ ) and stigmasterol ( $\approx 23\%$ ) were identified applying gas chromatography-mass spectrometry.

**Key words:** *Ruscus ponticus* Woronow; *Eryngium maritimum* L.; extraction freezing; chromatography

УДК 633.31:631.526.531

**РЕПРОДУКТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ КЛЕВЕРА  
ГОРНЫХ ФИТОЦЕНОЗОВ****Сарра Абрамовна Бекузарова, Александр Львович Комжа,  
Лидия Борисовна Соколова**Горский государственный аграрный университет, 362040  
г. Владикавказ, ул. Кирова 37, Россия  
bekos37@mail.ru

Мобилизация генетических ресурсов неразрывно связана с идентификацией каждого вида, экотипа и образца по основным хозяйственно-ценным признакам для оценки возможности его использования в селекции. Установлено, что *Trifolium* L., один из ведущих родов флоры Северной Осетии, представлен 29 видами. В течение ряда лет изучено более 300 образцов семи дикорастущих видов клевера, наиболее часто встречающихся в горной части региона (*Trifolium pratense*, *T. hybridum*, *T. ambiguum*, *T. canescens*, *T. repens*, *T. trichocephalum*, *T. alpestre*). Семенная продуктивность соцветий этих видов изучена на различных высотах (800, 1200, 1600, 1800, 2000 м над уровнем моря). Определено, что с увеличением высоты над уровнем моря изменяются морфолого-биологические особенности изученных видов.

**Ключевые слова:** клевер; семена; семенная продуктивность; репродуктивные органы; высотная поясность.

**Введение**

Среди современных проблем охраны природы и экологии, биоразнообразие занимает одно из ведущих мест. Общеизвестно, что воздействие человека на природу приобрело глобальный характер, а его масштабы и темп продолжают возрастать. В результате как прямого, так и косвенного антропогенного и зоогенного воздействия многие биологические виды, в частности ценные травы, исчезают, или их популяции находятся в критическом пределе численности, ставящем под угрозу возможность производства вида. Воздействие человека на луговые сообщества живых организмов, что они уже не в состоянии противостоять процессам антропогенной трансформации и утрачивает важнейшее свойство природных сообществ – способность к восстановлению. В связи с этим сокращается площадь ценных популяций, что приводит к распаду природной системы.

Значимость Кавказа в охране биологического разнообразия планеты общеизвестна. Определяемое стыком флоры и фауны разного происхождения и различными типами высотной зональности, биоразнообразие этого региона чрезвычайно велико и отличается высокой степенью эндемизма и большим количеством видов, занесенных в Международную и Красные книги. Следует особо отметить, что этот регион является одним из мировых центров видообразования и прародиной многих растений, введенных в культуру.

Признанием общемировой значимости биологического разнообразия Кавказа является включение его в список «200 глобальных экорегионов мира», подготовленный всемирным фондом дикой природы. В то же время современный социально-экономический кризис, перестройка существовавшей системы контроля охраны и использования природных ресурсов, наряду с чрезвычайно высокой уязвимостью горных экосистем, обуславливает необходимость принятия срочных мер по сохранению биологического разнообразия региона.

Горные регионы республики Северная Осетия-Алания являются одним из центров биологического разнообразия, который в последние годы имеет существенные изменения и постоянно подвергается разрушению и исчезновению многих ценных видов растений. Особенно подвергаются воздействию бобовые кормовые травы горных фитоценозов. Сохранившиеся же виды малопродуктивны. Восстановление деградированных пастбищ возможно известным приемом подсева трав. Однако осуществление этого метода затруднено в связи с отсутствием семян адаптивных к горным условиям видов и сортов многолетних трав

Большое значение в восстановлении биоразнообразия горных фитоценозов, улучшении сенокосов и пастбищ, воспроизводстве плодородия земель имеет интродукция дикорастущих видов, а также отбор лучших генотипов и создание на их основе новых, адаптированных к конкретным регионам сортов. На основе интродукции исследуемых видов изучаются методы подбора и переноса полезных растений из одних условий обитания в другие. При этом происходит познание закономерностей изменчивости растительных организмов с разработкой методов освоения и использования в народном хозяйстве. Мобилизация генетических ресурсов связана с идентификацией каждого вида, экотипа, образца по основным хозяйственно-ценным признакам с возможностью его использования в селекции при создании сортов сенокосно-пастбищного типа. При этом наиболее важными показателями развития растений являются их адаптация, высокая конкурентоспособность и семенная продуктивность [1, 6, 8].

Клевер (*Trifolium* L.) является одним из ведущих родов флоры Северной Осетии – он представлен 29 видами, принадлежащими восьми секциям двух подродов; 23 из них произрастают в горной части региона [7].

#### Объекты и методы исследования

В течение ряда лет изучено более 300 образцов семи дикорастущих видов клевера, наиболее часто встречающихся в горной части Северной Осетии (*Trifolium pratense* L. – Клевер луговой, *T. hybridum* L. – К. гибридный, *T. ambiguum* Vieb. – К. сходный, *T. canescens* Willd. – К. седоватый, *T. repens* L. – К. ползучий, *T. trichocephalum* Vieb. – К. волосистоголовый, *T. alpestre* L. – К. альпийский). Все виды изучали по ряду признаков в диапазоне высот 800–2000 м над ур. м. Изучено образование семян в соцветиях, с учетом экологических условий.

В течение периода вегетации проводились фенологические наблюдения за развитием растений. Учитывались хозяйственно-биологические признаки каждого изучаемого вида в течение 4–5 лет жизни. Все показатели сравнивались с районированным сортом клевера лугового Дарьял.

Для хозяйственно-биологической оценки каждый вид высаживали изолированно по блокам. Предварительно осуществляли отбор лучших генотипов в естественном фитоценозе. Растения каждого вида высаживали на делянке площадью 50×35 м.

Оценка растений в естественном фитоценозе осуществлялась по методике Всероссийского НИИ кормов им. В.Р. Вильямса РАСХН [9]. В течение периода вегетации производились фенологические наблюдения в шести пунктах горной части Северной Осетии, характеризующихся различной высотой над уровнем моря (800, 1200, 1600, 1800 и 2000 м).

Большое значение в оценке отобранных генотипов придавалось репродуктивным особенностям, так как семенное возобновление – один из показателей быстрого размножения и внедрения.

В наших исследованиях учитывалось количество генеративных стеблей, цветков и образовавшихся семян, щуплых семян цветущих головок на одном стебле.

### Результаты и обсуждение

Было установлено, что дикорастущие формы изучаемых видов обладают более высокой зимостойкостью, превышая по этому показателю районированный сорт клевера лугового Дарьял. Максимальный урожай зеленой массы на 3-й год жизни наблюдали у клеверов сходного и волосистоголового. Между тем, культурный сорт на 3-й год жизни снижает свои хозяйственно-биологические признаки, уступая по этим параметрам дикорастущим видам. В процессе изучения особенностей дикорастущих видов клевера было также выявлено, что они значительно меньше культурных поражаются болезнями. Наиболее высокой устойчивостью обладают К. сходный, К. седоватый и К. волосистоголовый, у которых балл поражения составил не более 1–3 %. Установлено также, что максимального развития дикорастущие виды достигают на 4–5-й годы жизни, тогда как культурные сорта клевера лугового к этому времени полностью выпадают. Выявлено также, что клевера седоватый и волосистоголовый в первый и второй годы жизни семян не образуют.

Репродуктивные особенности бобовых трав, в частности клевера, в естественном фитоценозе показали, что под влиянием стрессовых факторов нарушается цикл цветения, снижается масса каждого растения, увеличивается количество щуплых семян.

Как показали результаты исследований, количество образовавшихся в одной головке семян зависит от положения места произрастания в системе высотной поясности. Выявлено, что с увеличением абсолютной высоты вплоть до 2000 м возрастает количество семян в соцветии у клеверов лугового, гибридного и ползучего (табл. 1). У прочих изучаемых видов максимальное значение этого показателя отмечено на высоте 1400 м над ур. м.

**Таблица 1**

**Образование семян (%) в соцветиях видов клевера с учетом высотной поясности**

Вид клевера	Высота над уровнем моря, м					
	800	1200	1400	1600	1800	2000
К. луговой	48–50	48–50	49–55	42–45	48–53	58–65
К. гибридный	45–49	52–55	57–60	41–43	55–60	58–61
К. ползучий	60–64	61–65	58–68	43–47	47–55	64–69
К. сходный	63–64	63–68	73–81	50–54	63–68	64–69
К. альпийский	55–60	57–61	60–67	57–59	55–59	56–60
К. седоватый	56–58	60–62	62–64	56–58	52–54	50–52
К. волосистоголовый	55–60	58–62	61–68	53–59	46–54	56–61

Отмеченные различия при образовании семян у изучаемых видов свидетельствуют о зависимости этого процесса от множества факторов окружающей среды: высотной поясности, экспозиции и крутизны склона и связанных с ними почвенно-климатических условий. Установлено, что с увеличением высоты над уровнем моря изменяется форма растения, длина побегов, количество междоузлий, площадь листовой поверхности, продукция зеленой массы, поражаемость болезнями, зимостойкость. Следовательно, отбирая растения в горных фитоценозах с учетом высотной поясности, можно получить ценный исходный материал, на основе которого будут созданы сорта сенокосно-пастбищного типа.

Сравнительная оценка дикорастущих видов на разных высотах в диапазоне 800-2000 м над уровнем моря позволила установить влияние окружающей среды на образование семян (табл.1). Определено, что на одной и той же высоте, но в разных

почвенных средах образование семян в соцветиях было неодинаковым. Выявлено, что количество щуплых семян в нейтральной среде (рН 6,15–6,45) достигало 15–22 %, а на слабокислой и кислой средах (рН менее 5) превышало 50 %. Причем количество образовавшихся семян на 9,5–28 % выше на участке, где кислотность минимальная [1, 2].

В условиях гор, где климат отличается от равнинных и предгорных районов, наблюдается высокий уровень коротковолновой ультрафиолетовой радиации, повышающей жизненный тонус растений. Ее стимулирующим воздействием частично гасится негативный эффект, вызванный резкими колебаниями между дневной и ночной температурами: несмотря на эти колебания, наблюдается интенсивное цветение, плодо- и семяобразование. Поэтому для созревания семян в горных условиях требуется более высокий гидротермический коэффициент и, следовательно, меньшая сумма эффективных температур [8, 9].

Результаты исследований свидетельствуют, что с увеличением высоты над уровнем моря образуется меньше щуплых семян (табл. 2). Максимальным показателем обсеменённости обладают растения на высоте 2000 м – где наряду с отсутствием загрязнений окружающей среды, имеет место сочетание оптимальных экологических условий и наличие диких насекомых-опылителей.

Таблица 2

**Обсемененность соцветий дикорастущих растений клевера лугового в естественных фитоценозах**

Высота над уровнем моря, м	Колебания обсемененности в разные годы, %	Коэффициент вариабильности V, %	Образовалось щуплых семян, %
450	4–26,3	13,6	45,8–53,1
700	11–30,1	17,8	39,6–48,4
1200	24–43,0	18,1	32,4–35,4
1350	26–48,0	19,8	38,6–31,4
1560	29–49,0	20,5	18,0–26,4
1800	39–57,0	17,3	14,0–21,2
2000	45–68	21,8	7,0–12,0

Изучением видов клевера на разных высотах установлено, что семенная продуктивность в полной мере зависит от условий почвенных и климатических факторов и имеет резкие колебания по годам. Достаточно высокие различия по репродуктивным особенностям отмечены у клеверов альпийского, сходного и волосистоголового (колебания по годам 18–20 %). По количеству максимального образования головок отличается клевер луговой (дикорастущий), гибридный и ползучий. Клевера альпийский и седоватый образуют генеративные органы в меньшем количестве, чем другие виды (24–32 %). У прочих изучаемых видов в отдельные благоприятные годы насчитывается в 2–3 раза больше генеративных органов. По количеству образовавшихся семян в головках клевера выделяются два вида – ползучий и сходный, что объясняется их биологической особенностью образовывать от 2 до 8 семян в одной завязи. Клевер луговой в большей степени подвергается воздействию стрессовых явлений и может служить биоиндикатором при мониторинге состояния окружающей среды.

При изучении семенной продуктивности видов клевера на третьем году жизни, установлено, что наиболее высокий коэффициент вариабельности у клеверов альпийского, сходного и волосистоголового (табл. 3).

**Таблица 3**

**Семенная продуктивность видов клевера на третьем году жизни в условиях интродукции**

Вид клевера	Количество головок, шт.	Количество цветков, шт.	Образовалось семян (min–max), %	Коэффициент вариабильности, V, %
К. луговой с. Дарьял	64	86	32–42	15,8
К. луговой (дикорастущий)	76	108	25–45	16,4
К. сходный	57	70	28–56	18,1
К. седоватый	32	62	17–26	13,2
К. гибридный	72	89	21–43	17,6
К. ползучий	68	72	45–50	12,6
К. альпийский	26	117	15–41	20,1
К. волосистоголовый	64	76	26–48	18,4

### Выводы

Учитывая биологические особенности дикорастущих видов, условия формирования генеративных органов дикорастущих видов в зависимости от окружающей среды, можно отбирать наиболее продуктивные, создавая исходный материал для сортов сенокосно-пастбищного типа, объединяя лучшие генотипы в сложно-гибридную популяцию для получения перспективных форм с высокими семенными возможностями.

Установлена зависимость образования семян в соцветиях с учетом вертикальной зональности. С увеличением горной высоты образование семян у видов клевера лугового, гибридного, ползучего выше (до 2000 м над уровнем моря), чем в более низких местах их произрастания. Максимального развития по признаку образования семян у других видов (сходного, альпийского, седоватого и волосистоголового) выявлено на высоте 1400 м над уровнем моря.

Высокий коэффициент вариабильности в зависимости от вертикальной поясности образования семян в соцветиях обнаружено на высотах 1560-2000м. При этом щуплых, невыполненных семян на максимальной высоте отмечено не более 7-12 % в одной цветущей головке, а на высоте 450 м этот показатель достигал более 50%

По количеству образовавшихся генеративных органов выделяются виды клевера: ползучего (45-50%) и лугового (32-42%). Минимальное количество семян обнаружено у клевера седоватого (17-26%). У клеверов альпийского и сходного количество образовавшихся семян варьирует в зависимости от погодных условий и в неблагоприятные годы образует не более 15-17 %.

### Список литературы

1. *Бекузарова С.А.* Влияние окружающей среды на семенную продуктивность дикорастущих форм клевера // Экологические проблемы горных территорий: тезисы докладов участников международной конференции. – Владикавказ, 1992. – С. 23–24.
2. *Бекузарова С.А.* Селекция клевера лугового. – Владикавказ, 2006. – 175 с.
3. *Вавилов Н.И.* Ботанико-географические основы селекции. – М.; Л.: Сельхозгиз, 1935. – 60 с.
4. *Жученко А.А.* Адаптивное растениеводство: эколого-генетические основы. – Кишинев: Штиница, 1990. – 432 с.
5. *Зарьянова З.А. Кирюхин С.В.* Изучение комбинационной способности сортов и селекционных номеров клевера лугового по признаку семенной продуктивности // Вестник ОрелГАУ. – 2014. – № 5. – С. 135–140.

6. Кильчевский А.В. Хотылева Л.В. Экологическая селекция растений. – Минск: Технология, 1997. – 312 с.

7. Комжа А.Л. Сосудистые растения // Растительный мир. – Владикавказ, 2000. – С. 109–187. (Природные ресурсы Республики Северная Осетия-Алания).

8. Новоселов М.Ю. Результаты и перспективы экологической селекции клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) // Кормопроизводство. – 2007. – № 9. – С. 16–18.

9. Экологическая селекция и семеноводство клевера лугового. – М., 2012. – 287 с.

Статья поступила в редакцию 01.08.2016 г.

Sarra A. Bekuzarova, Aleksandr L. Komzha, Lidia B. Sokolova. Reproductive characteristics of wild-growing *Trifolium* within mountain phytocenoses // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 49-54.

Mobilization of genetic resources is closely connected with identification of each cultivar, ecotype and specimen according to the principal economical and valuable characteristics to use them in selection. It was found out that *Trifolium* L. is one of the leading genera in North Ossetia flora and includes 29 cultivars. More than 300 specimens of seven wild-growing clover cultivars, the most spread in the mount region (*Trifolium pratense*, *T. hybridum*, *T. ambiguum*, *T. canescens*, *T. repens*, *T. trichocephalum*, *T. alpestre*) were investigated for some recent years. Seed productivity of these cultivars inflorescences was researched at different altitude (800, 1200, 1600, 2000 m above the sea level). The altitude above the sea level changes morphological and biological peculiarities of study cases.

**Key words:** clover; seeds; seed productivity; reproductive organs; altitude zones

## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 633:581.143.6+581.132

### ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩАЯ КАЛЛУСНАЯ КУЛЬТУРА РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ПШЕНИЦЫ И ЕЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ *IN VITRO*

Нина Владимировна Терлецкая<sup>1</sup>, Ажар Батырбековна Искакова<sup>1</sup>, Наталья Васильевна Зобова<sup>2</sup>, Валентина Юрьевна Ступко<sup>2</sup>, Светлана Юрьевна Луговцова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, г. Алматы 050040, Тимирязева, 45, г. Алматы, Казахстан  
teni02@mail.ru

<sup>2</sup> ФГБНУ «Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства», г. Красноярск 660041, пр. Свободный, 66, Красноярск, Россия  
zobovnat@mail.ru

Изучалась способность каллуса к морфогенезу на свету как фотоморфофизиологический процесс. Выявлено подавление развития фотосинтетического аппарата в каллусных клетках и снижение их ФА в стрессовых условиях. Показано, что работающая с нарушениями в стрессовых условиях ФСР, у отдельных форм все-таки дает возможность получения фотосинтезирующей каллусной ткани, а значит – возможность регенерации жизнеспособных растений. Виды *T. macha* Dek.et.Men. и *T. aestivum* L. (сорт Саратовская 29) демонстрировали большую стабильность фотосинтетического аппарата под воздействием стрессоров *in vitro*.

**Ключевые слова:** виды пшеницы; каллусы; морфогенез; фотосинтез; стресс

### Введение

Современная картина заключительной стадии биосинтеза хлорофилла еще весьма фрагментарна и неполна. Даже общая феноменология процесса, последовательность стадий остаются во многом неясными, в частности это касается биогенеза реакционных центров двух фотохимических систем фотосинтеза. Только предположения и не всегда достаточно обоснованные можно высказать о механизме отдельных стадий даже в отношении собственно пигментного компонента [4]. Как *in vivo*, так и *in vitro* клетки на свету, синтезируя хлорофилл, приобретают способность к фотосинтетическому усвоению углерода, то есть осуществляют характерный для интактного растения фотоавтотрофный способ питания. Поскольку имеется несколько работ по изучению физиологического состояния фотосинтезирующих культивируемых *in vitro* клеток [1, 6], исследование не только дифференцировки клеток, но и становления *in vitro* фотосинтетической функции, т.е. фотоавтотрофности, при изменении факторов культивирования, в частности, в условиях осмотического или солевого стресса, является чрезвычайно интересным с научной точки зрения. К тому же до сих пор практически не изучены особенности структуры фототрофных тканей у видов пшеницы с различным происхождением генома [8].

Поэтому целью данного исследования было получение из гетеротрофной каллусной культуры различных видов пшениц фототрофных тканей и оценка их фотосинтетической активности как в нормальных, так и в стрессовых (искусственная засуха и засоление) условиях *in vitro*.

### Объекты и методы исследования

Материалом для исследований служили виды пшениц: *T. dicoccum* Schuebl. var. *atratum* (Host) Koern (A<sup>u</sup>A<sup>u</sup>BB), *T. aethiopicum* Jakubz. (*T. abyssinicum* Vav.) (A<sup>u</sup>A<sup>u</sup>BB), *T. compactum* Host. (A<sup>u</sup>A<sup>u</sup>BBDD), *T. macha* ssp. *densiusculum* Dekapr. et. Menabde. (A<sup>u</sup>A<sup>u</sup>BBDD), *Triticum aestivum* L. (A<sup>u</sup>A<sup>u</sup>BBDD) – сорт Саратовская-29. Выбор этих видов обусловлен их различиями по уровню ploидности, геномному составу, степени их засухо- и солеустойчивости, а также адаптированностью к условиям Юго-Востока Казахстана.

Для получения каллусной культуры за основу взята методика Гапоненко и др. [2]. Зародыши изолировали на 15-18-е сутки после опыления. Культивирование зародышей будет осуществляли в темноте на питательной среде MS. Для получения активно фотосинтезирующей каллусной культуры на третий пассаж каллусы помещались на среды со сниженной до 1 мг/л концентрацией 2,4-Д при концентрации сахарозы – 20 мг/л выставлялись на свет в условия светокультуральной комнаты, обеспечивающей температуру 25°C, при 16-часовом фотопериоде с интенсивностью освещения 5-10 тыс. люкс и влажностью 75–80%. После культивирования в данных условиях в течение месяца каллусы взвешивались и подвергались цитологическому анализу. Часть каллусов продолжали культивировать в темноте. Часть – переносили на среды со стрессорами путем добавления в питательную среду полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000) или NaCl. Фотосинтетическую активность определяли на каллусах, выросших без воздействия стресса, а также в условиях искусственной засухи и засоления. Оценку ФА осуществляли на флуориметре IMAGING-RAM M-Series MAXI Version (Chlorophyll Fluorometer, “Heinz Walz GmbH”, Германия) методом насыщающих импульсов при длине волны 450 нм.

### Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ морфофизиологических характеристик каллусов, культивированных в темноте и на свету, показал, что каллусы всех изучаемых видов пшеницы, культивируемые в темноте, имели неупорядоченную рыхлую структуру, были оводненными, легко распадающимися на отдельные клетки. Отдельные



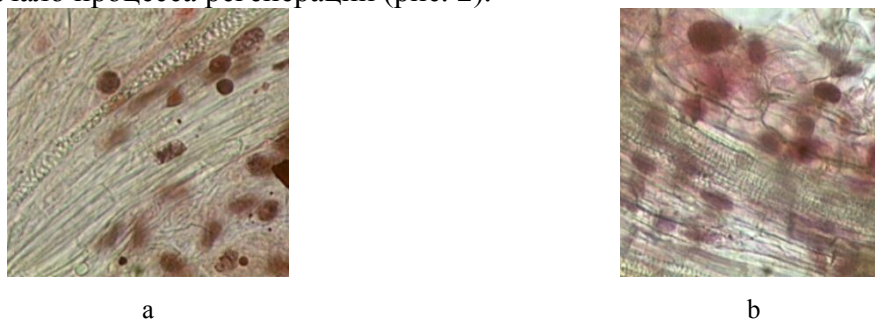
морфогенные каллусы имели участки средней плотности, с выраженными меристематическими очагами, но без зеленеющих зон (рис. 1).



**Рис. 1** Клетки каллусов пшеницы, культивируемых в темноте, где а – паренхиматозная клетка морфогенного каллуса, b – упорядоченные клетки меристематической зоны без хлорофилла, ув x 40

Как указывается в литературных данных, каллусы, культивируемые в темноте, не содержат хлорофилла и являются гетеротрофными [3]. Тем не менее, изодиаметрическая форма клеток каллусов, интенсивно окрашенная цитоплазма и плотное прилегание клеток к друг к другу дают возможность характеризовать клетки каллуса как меристематически активные [7]. Выявленные ярко выраженные зоны формирования морфогенных структур, которые в отсутствии освещения практически не содержали хлорофилла, при выставлении каллуса на свет зеленели, что свидетельствует о способности таких меристематически активных участков к фотосинтезу.

При культивировании каллусов пшеницы на свету, в зеленеющих меристематических зонах обнаружены ярко выраженные хлорофиллсодержащие области (ХСО) формирования трахеидных структур и проводящих пучков, что указывает на начало процесса регенерации (рис. 2).



**Рис. 2** Клетки каллусов пшеницы, культивируемых на свету, где а и b – хлорофиллсодержащие области формирования трахеидных структур и проводящих пучков, ув x 40

Эти процессы были характерны для каллусов всех изучаемых видов. Показано, что начало формирования хлорофилла в каллусе свидетельствует о начале морфогенеза. Анализ выполненной работы позволяет сделать положительный вывод о возможности получения штаммов фотогетеротрофной каллусной культуры из гетеротрофных каллусных различных видов пшениц при изменении световых условий и оптимальном составе питательной среды.

Чтобы рассмотреть реакцию на осмотический и солевой стрессы *in vitro*, каллусы различных видов пшеницы в течение двух недель культивировались на свету на селективных средах с добавлением стрессовых агентов, имитирующих засоление ( $\text{NaCl}$  – 0,63%) и засуху (полиэтиленгликоль – 16% вес/объем).

Без нарушения стерильности и изъятия каллусов из чашек Петри на протяжении всего периода культивирования с использованием флуориметра в режиме «насыщающих

импульсов» пропускали световой поток с длиной волны 450 нм перпендикулярно поверхности среды.

По данным замедленной флуоресценции, у тех каллусов, где она наблюдалась, в 1-12 сутки культивирования строили графики скорости транспорта электронов через фотосистему II, квантового выхода, выхода нефотохимического тушения флуоресценции и фотохимического тушения в зависимости от интенсивности возбуждающего света в диапазоне от 0 до 700 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>сек (рис. 3).

По данным динамики скорости транспорта электронов через фотосистему II (СТЭ) каллусов, культивируемых на оптимальной среде, при ФАР 20 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>с с 1 по 12 сутки культивирования построены линии тренда.

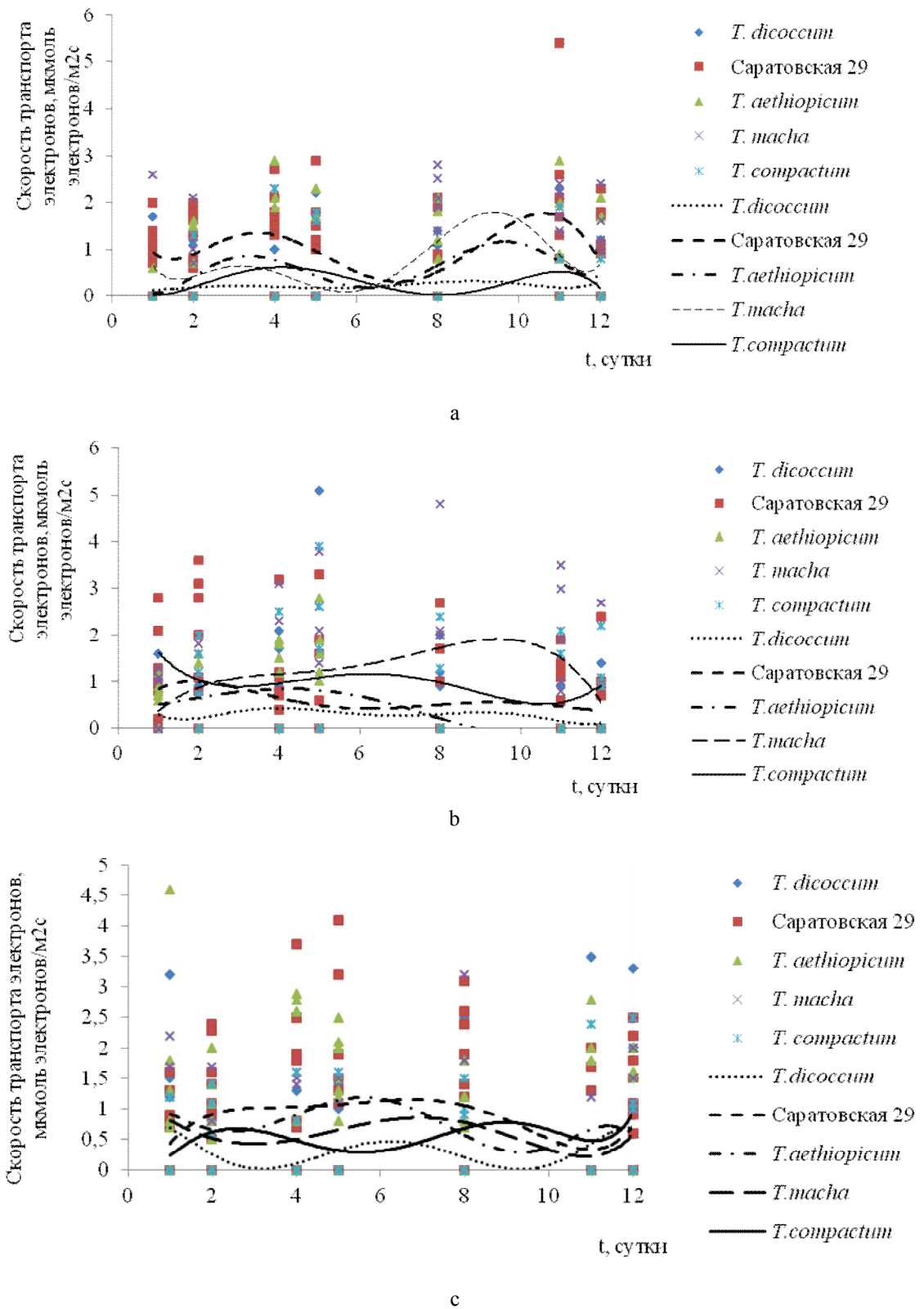
Из рисунка 3а видно, что в первые четверо суток после пассирования на свежую среду пролиферации происходит повышение ФА каллусов. Начиная с пятых суток, СТЭ снижается. Схожие данные получены В.Ю. Ступко с соавторами для генотипов яровой мягкой пшеницы [7]. Однако в настоящем исследовании зафиксированы показатели СТЭ за более продолжительный период, что позволило установить, что к 10 суткам ФА каллусов исследованных видов пшеницы вновь возрастает. То есть динамика СТЭ может быть выражена 2-вершиной кривой. Возможно, второй пик ФА связан с формированием новых хлорофиллсодержащих областей (ХСО), происходящим в первую неделю культивирования. К концу этой недели они, по всей видимости, развиваются достаточно, чтобы изменение ФА отразилось на графиках СТЭ.

На средах, содержащих соль, динамика СТЭ имела иной характер, что видно на рисунке 3б.

Заметного пика в первые четверо суток не отмечено. Наблюдалось снижение ФА с 1 по 12 сутки экспозиции. Под действием насыщающих импульсов реакционные центры ФСII закрываются тем позже, чем стабильнее ФС.

В условиях индуцированной засухи максимум СТЭ, кривая динамики которой представлена на рисунке 3с, сдвинулся в область 6-8 суток, после чего СТЭ снижалась вплоть до 12 суток.

Нарушения в формировании реакционных центров и их работе ведут к более быстрому их закрытию у каллусов неустойчивых генотипов. Этот процесс на графиках отражается в снижении до нуля максимальной скорости транспорта электронов (закрытие всех реакционных центров). Вероятно, в условиях засоления воздействие токсического компонента, вкупе с осмотическим стрессом, приводит к тому, что формирование новых хлорофиллсодержащих областей (ХСО) не происходит, а имеющиеся фотосистемы разрушаются довольно быстро. В условиях засухи, ХСО области развиваются, но медленнее, чем на оптимальной среде, а к 8 суткам воздействие стресса уже становится заметным и в условиях засухи, и СТЭ снижается вплоть до 12 суток. При сравнении исследованных образцов можно отметить, что кривая СТЭ вида *T. aestivum* L. (сорт Саратовская 29) в условиях засухи имела плато со 2-х по 8 сутки, и её снижение наблюдалось после 8 суток экспозиции, что вероятно связано с большей стабильностью ФС в исследуемых условиях. Вид *T. aestivum* L. (сорт Саратовская 29) также показал высокие результаты на среде с индуцированной засухой, в отличие от *T. macha* Dek.et.Men. который более чувствителен к засушливым условиям, чем к засолению, что следует из рисунка 39 б. Вид *T. aethiopicum* Jakubz. продемонстрировал одинаковую степень восприимчивости, как к засухе, так и к засолению. Отмечено, что в то время как *T. aestivum* L. формирует ХСО в условиях светокультуры довольно часто [5], формирование данных областей у каллусов других видов пшеницы происходит лишь у небольшого числа образцов, использованных в исследовании, однако и при этих величинах можно отметить отличия между исследуемыми видами пшеницы.

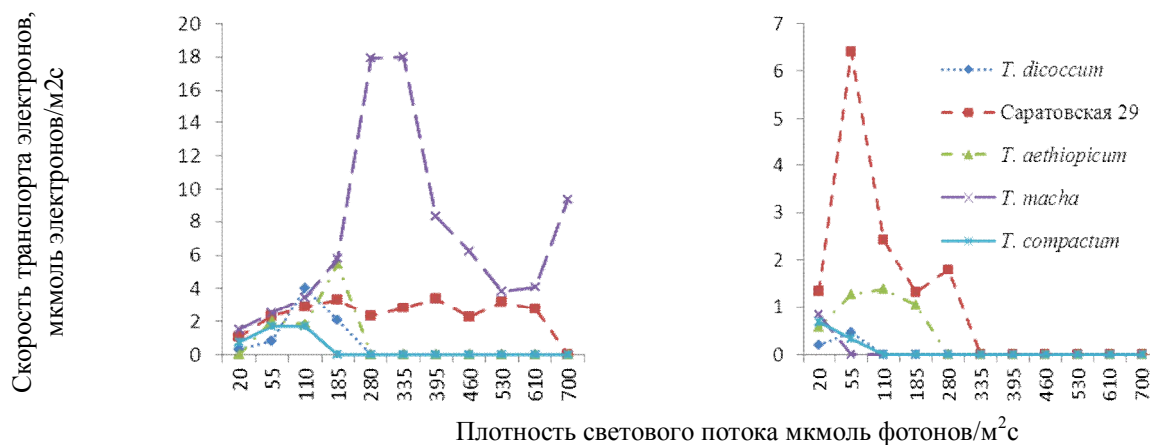


а – контроль, б – солевой стресс (NaCl 0,63%), с – засуха (ПЭГ 16% вес/объем)

**Рис. 3** Динамика СТЭ каллусов пшеницы при плотности потока поддерживающего света 20 мкмоль фотонов/м²с

Световые кривые ФС каллусов исследованных видов пшеницы, представленные на рисунке 4, позволяют говорить о том, что в условиях засоления минимальную

чувствительность к стрессу продемонстрировали виды *T. aestivum* L. и *T. macha* Dek.et.Men.



a – солевой стресс (NaCl 0,63%), b – засуха (ПЭГ 16% вес/объем)

**Рис. 4** Влияние засоления среды и индуцированной засухи на скорость транспорта электронов у каллусной ткани пшеницы в зависимости от интенсивности ФАР на 8-е сутки культивирования

У видов *T. macha* Dek.et.Men. и *T. aestivum* L. в условиях засоления нефотохимическая компонента тушения ( $Y(NPQ)$ ) флуоресценции достаточно высока. При этом из данных, представленных на рисунке 5, следует, что почти все образцы, кроме *T. compactum* Host. компенсировали переизбыток световой энергии именно через этот механизм тушения, что говорит о более стабильном функционировании ФСII у каллусов этих генотипов в присутствии засоления.

Уровень нерегулируемого рассеяния энергии ( $Y(NO)$ ) держался на одном, достаточно высоком, уровне в течение всего периода записи световой кривой. Высокий уровень  $Y(NO)$  свидетельствует о наличии повреждений в ФСII образцов. В условиях недостатка влаги образец *T. macha* Dek.et.Men. также активно включал механизмы нефотохимического тушения, снижая показатели нерегулируемой компоненты. Несмотря на то, что показатели СТЭ были невысокими, механизмы избежания серьезных повреждений ФС у данного генотипа работали наилучшим образом.

### Выводы

Таким образом, показано, что способность каллуса к морфогенезу на свету – это фотоморфофизиологический процесс, связанный с фотосинтезом.

Показано, что у каллусов воздействие стрессовых факторов (засоление, засуха) выражалось в подавлении развития фотосинтетического аппарата в каллусных клетках и снижении, как следствие, их ФА. Это говорит о том, что в стрессовых условиях *in vitro* формирование новых ХСО не происходит, а имеющиеся фотосистемы разрушаются довольно быстро.

При исследовании квантового выхода нерегулируемого и регулируемого рассеяния энергии получены данные, свидетельствующие о нарушениях в работе ФСII в условиях засоления и засухи. Показано, что работающая, пусть с нарушениями, ФСII, у отдельных форм все-таки дает возможность получения в стрессовых условиях фотосинтезирующей каллусной ткани, а значит – возможность регенерации в стрессовых условиях *in vitro* жизнеспособных растений.

Отмечено, что виды *T. macha* Dek.et.Men. и *T. aestivum* L. (сорт Саратовская 29)

демонстрировали большую стабильность фотосинтетического аппарата под воздействием стрессоров *in vitro*.

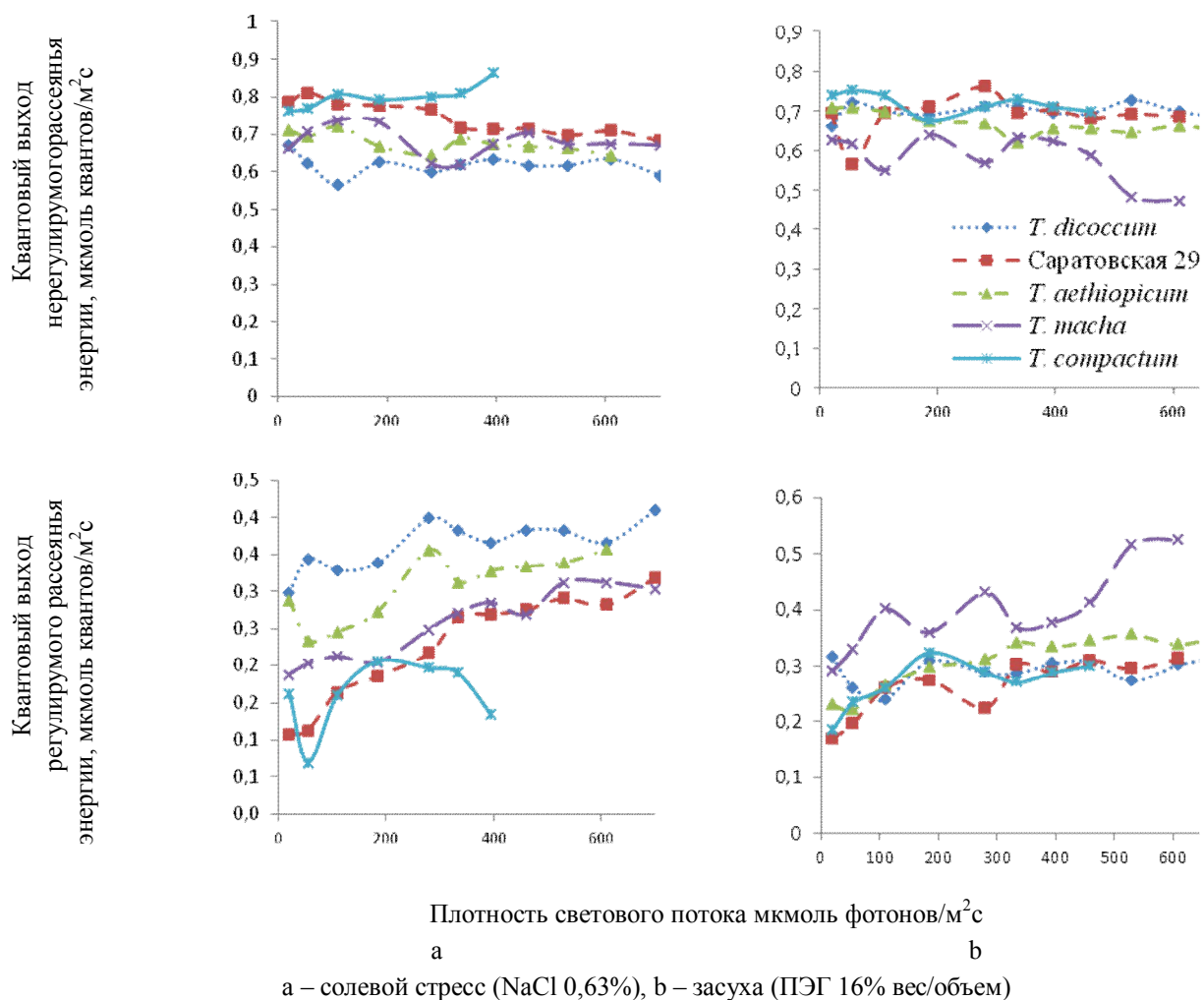


Рис. 5 Квантовый выход нерегулируемого  $Y(NP)$  и регулируемого  $Y(NPQ)$  рассеяния энергии каллусных тканей пшеницы в стрессовых условиях культивирования

### Благодарности

Работа выполнена в рамках проекта фундаментальных исследований 1104/ГФ4 «Изучение устойчивости фотосинтетического аппарата мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.) и ее диких сородичей к абиотическим стрессам *in vivo* и *in vitro*» (2015-2017), финансируемого Министерством образования и науки Республики Казахстан

### Список литературы

1. Быков О.Д., Казакова Е.А. Фотосинтез в культуре первичного каллуса картофеля. // Фотосинтез и фотобиология: тез. докл. и сообщ. международной конференции (Пушино, 16-73 июня 1991 г.). – М., 1991. – С. 106-107.
2. Гапоненко А.К., Маликова Н.И., Охрименко Г.Н., Созинов А.А. Получение соматоклональных линий у злаков (*Triticum aestivum* L. и *Hordeum vulgare* L.) // Докл. АН СССР. – 1985. – Т. 283. – С. 1471-1475.
3. Гильмаева В.Б. Абрамов С.Н., Горбунова В.Ю., Геащенков Г.А., Рожнова Н.А. Цито-гистологическая характеристика каллусогенеза *in vitro* у *Bryophyllum daigremontianum* // Изв. Самарского НЦ РАН. – 2013. – Т. 15, № 3 (5). – С. 1587-1590.

4. Кольчугина И.Б. Становление фототрофности в каллусной культуре *Ficus elastica* при изменении внешних факторов культивирования: Дисс... канд. биол. наук: 03.00.25 / Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. – Москва, 2002. – 102 с.

5. Ступко В.Ю., Зобова Н.В. Окраска каллусов как критерий регенерации пшеницы в селекции *in vitro* // Сиб. вестник с.-х. науки. – 2012. – №6. – С. 5-9.

6. Ступко В.Ю., Зобова Н.В., Гаевский Н.А. Биофизические подходы в оценке стрессоустойчивости яровой пшеницы // Сиб. вестник с.-х. науки. – 2013. – №1. – С. 18-23.

7. Ступко В.Ю., Зобова Н.В., Гаевский Н.А. Влияние стрессоров на динамику фотосинтетической активности пролиферирующих каллусных культур пшеницы // Известия Калининградского государственного технического университета. – 2015. – № 36. – С. 107-113.

8. Храмова Е.В., Киселева И.С., Любомудрова Е.А., Малкова Н.В. Оптимизация структуры мезофилла листа аллоплоидных и диплоидных видов пшеницы // Физиол. раст. – 2003. – Т. 50. – № 1. – С. 24-33.

Статья поступила в редакцию 01.08.2016 г.

Terletskaia N.V., Iskakova A.B., Zobova N.V., Stupko V.Yu., Lugovtsova S.Yu. Photosynthetic callus culture of different wheat cultivars and its photosynthetic activity being effected by abiotic stress factors *in vitro* // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 54-61.

The purpose of the research was callus capacity to light morphogenesis as photomorphophysiological process.

Development of photosynthetic apparatus in callus cells was suppressed and their photosynthetic activity (PA) decreased under stress conditions. It was shown that PSII dealing with disorders under stress conditions, some forms are possible to develop photosynthesized callus tissue, that is regeneration of viable plants. Such cultivars as *T. macha* Dek.et.Men. and *T. aestivum* L. (sort Saratovskaya 29) presented a high stability of photosynthetic apparatus being effected by stress factors *in vitro*.

**Key words:** wheat cultivars; calluses; morphogenesis; photosynthesis; stress

УДК 582.548.25:57.085

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ, ПРОИСХОДЯЩИЕ В ВЕГЕТАТИВНЫХ ОРГАНАХ *CANNA* × *HYBRIDA* HORT. EX VASCER ПРИ ПОРАЖЕНИИ ВИРУСНЫМИ ПАТОГЕНАМИ

Анфиса Евгеньевна Палий, Ирина Вячеславовна Митрофанова,  
Валентина Анатальевна Браилко, Оксана Анатальевна Гребенникова,  
Наталья Васильевна Зубкова, Светлана Викторовна Челомбит

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр  
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита  
valentina.brailko@yandex.ru

Выявлен ряд структурных особенностей в вегетативной сфере некоторых сортов канны садовой при проявлении симптомов вирусных заболеваний. Найдены различия в водном режиме. Установлено снижение уровня относительной фотосинтетической активности и увеличения уровня флуоресценции хлорофилла, что может свидетельствовать о деградации фотосинтетического аппарата. Определены биохимические изменения у пораженных вирусами растений – уменьшение содержания пролина и

аскорбиновой кислоты, увеличение концентрации фенольных соединений, снижение активности каталазы и увеличение активности супероксиддисмутазы и полифенолоксидазы.

**Ключевые слова:** канна садовая; анатомия листа; фотосинтетический аппарат; протекторные соединения; окислительно-восстановительные ферменты.

### Введение

Канна садовая (*Canna × hybrida hort.* ex Basker) – многолетнее травянистое растение семейства *Cannaceae* Juss. Благодаря ярким цветкам и соцветиям разнообразных форм и окрасок, сизо-зеленым или фиолетово-красным листьям эта культура является претендентом на лидерство при создании эффектных цветочных групп на Южном берегу Крыма. В Никитском ботаническом саду (НБС) первые растения были интродуцированы в 1815г., а в настоящее время коллекция канны включает 26 сортов селекции НБС и 23 зарубежных культивара [13].

Канна садовая устойчива к перегреву и пониженной влажности воздуха, однако существенной проблемой использования по мнению ряда исследователей [16] является ее тотальное повреждение вирусными инфекциями. На протяжении последнего десятилетия широкое распространение вирусных инфекций у канны отмечено как в странах СНГ, так и в странах Европы, в США, Израиле, Австралии, на Дальнем Востоке. В литературе имеется информация [17] о том, что канна поражается 5 видами вирусов, однако наиболее опасен вызывает *Canna yellow streak virus* (CaYSV). Помимо потери декоративных качеств: некрозных и хлорозных пятен на листьях и соцветиях, происходят нарушения и в функциональном состоянии растительного организма в целом.

В связи с этим, **целью** данной работы было определение анатомических и физиолого-биохимических изменений, которые возникают в вегетативных органах некоторых сортов *Canna × hybrida hort* в связи с проявлением симптомов вирусных заболеваний.

### Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись два сорта канны садовой зарубежной селекции – ‘Президент’ (сортотип канн Крози) и ‘Суевия’ (сортотип гигантских орхидеевидных канн). Растения произрастали в условиях закрытого грунта (в теплице) при соответствующем агротехническом уходе. Безвирусные растения были получены с применением метода хемотерапии *in vitro* и клонального микроразмножения в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений НБС [12]. Канны с проявлением вирусной инфекции были отобраны в коллекционных насаждениях НБС. Возраст культиваров – 2-3 года. Для анализов отбирали 3-4-й лист, опыты проводили в пятикратной повторности.

Анатомические исследования проводили с помощью микроскопа AxioScope A.1 (Zeiss, Germany) и программного приложения Axio Vision Rel. 4.8.2. на временных препаратах [7]. Оводненность растительных тканей оценивали весовым методом, анализ фракционного состава воды был проведен по методу Маринчика-Гусева [6]. Параметры фотосинтетической активности измеряли при помощи портативного флуориметра (“Floratest”, Украина). В ходе экспериментов регистрировали следующие показатели флуоресценции после световой адаптации: начальный уровень флуоресценции ( $F_0$ ), максимальное ( $F_m$ ) и стационарное ( $F_{st}$ ). Рассчитывали переменную флуоресценцию  $F_v$  и относительную фотосинтетическую активность  $(F_m - F_{st}) / F_m$  [18].

Биохимические показатели определяли по общепринятым методикам. Содержание пролина – по модифицированной методике Чинарда с использованием нингидринового реактива [1], суммы фенольных веществ – фотометрическим методом с использованием реактива Фолина-Чокальтеу [3], флаванолов – по методике Мурри



[10], аскорбиновой кислоты – йодометрическим титрованием [11]. Активность каталазы определяли титриметрическим методом [2], полифенолоксидазы (ПФО) – колориметрически в присутствии пирокатехина и *n*-фенилендиамина [4], супероксиддисмутазы (СОД) – по реакции окисления кверцетина [6].

Для статистической обработки полученных измерений использовали программное приложение STATISTICA for Windows, Release 6.0.

### Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что морфологические проявления симптомов вирусных заболеваний у канны садовой были выражены в межжилковом хлорозе, некротических пятнах и усыхании верхнего края листовых пластин (рис. 1).



Рис. 1 Проявление симптомов вирусных заболеваний на листьях *Canna × hybrida hort. ex Backer*: А – сорт Президент; Б – сорт Суевия

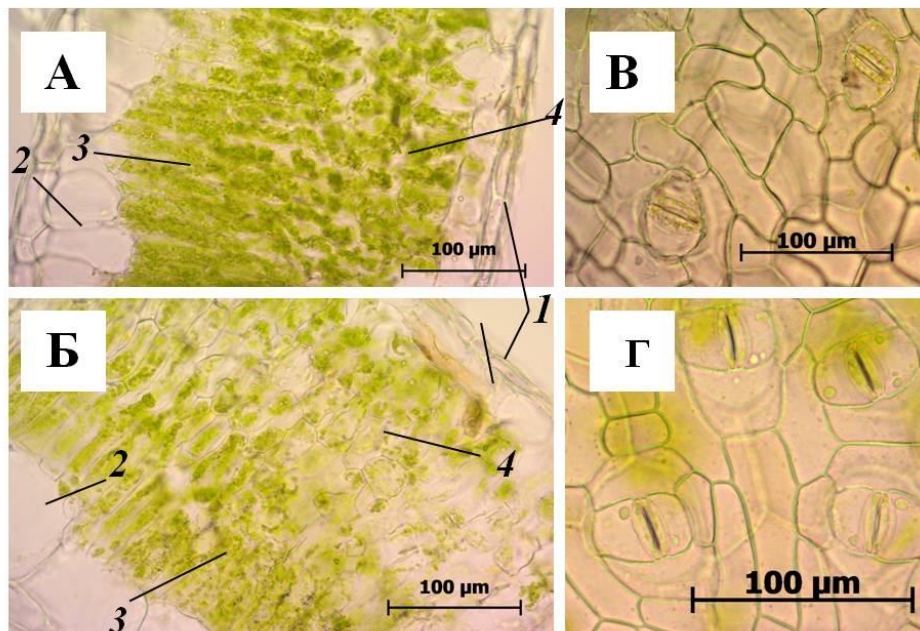
Для листьев канны характерна гидроморфная структура (Рис. 2: А, Б). листовые пластинки бифациальные, толстые (226 – 302 мкм), с относительно тонкими покровными тканями (13 – 22 мкм, при чем адаксиальная эпидерма толще абаксиальной), развитой аэренхимой и воздухоносными каналами (28 – 65 мкм), развитым мезофиллом (89 – 138 мкм). Клетки палисадной паренхимы вытянутой формы, плотно прилегают друг к другу, расположены в 1 – 2 ряда. Губчатый мезофилл 4 – 5 рядный, клетки изодиаметрические иногда – вытянутые, эта ткань занимает большую часть хлоренихмы. Коэффициент палисадности составил 31 – 40%.

Устьичные аппараты парацитного типа, располагаются на одном уровне с клетками эпидермы. Листья канны, как это типично для однодольных растений [8], расположены вертикально, и в этом случае устьица есть на обеих частях листа (Рисунок. 2: В, Г). Количество их на адаксиальной стороне меньше в 2 – 4 раза, чем на абаксиальной. Удельная плотность устьиц на площади 1мм<sup>2</sup> находится в пределах 35 – 50 устьиц на адаксиальной стороне (длина устьичной щели 32 – 38 мкм) и 78 – 82 устьиц на абаксиальной (длина устьичной щели составляла 26 – 30 мкм). Клетки покровных тканей однородные, на адаксальной стороне округло-продолговатые (длина превышает ширину в 1,5 – 1,7 раза), абаксиальной – удлинено-продолговатые (длина превышает ширину в 1,8 – 2,6 раза).

Так как определенные анатомические особенности являются сортовыми свойствами, сравнительный анализ здоровых и пораженных растений проведен по вариантам каждого из описанных сортов. Больше изменений было зафиксировано у сорта Президент. Выявлены достоверные различия по параметрам толщины аэренхимы, толщине губчатого мезофилла, размерам клеток адаксиальной эпидермы и количеству устьиц на адаксиальной стороне листовых пластин. У пораженных растений толщина



адаксиальной аэренхимы увеличилась в 1,4 – 1,8 раза (от значений 28 и 43 до 52 и 65 мкм у 'Суевия' и 'Президент' соответственно). При увеличении воздухоносных тканей заметно снижение толщины хлоренхимы в основном за счет сокращения толщины губчатого мезофилла (у сорта Суевия средняя толщина губчатого мезофилла здорового листа –  $81 \pm 8$  мкм, а у пораженного –  $57 \pm 6$  мкм). Отмечено, что при деградации хлоренхимы первыми разрушаются хлоропласты верхнего слоя палисадной ткани.



**Рис. 2** Структура листовых пластин *Canna × hybrida hort. ex Backer* сорт Президент в условиях закрытого грунта: А – поперечный срез листа без симптомов, Б – с характерными симптомами вирусных заболеваний, В – адаксиальный эпидермис, Г – абаксиальный эпидермис, 1 – покровные ткани, 2 – аэренхима, 3 – палисадный мезофилл, 4 – губчатый мезофилл.

В поддержании водного режима важная роль принадлежит количеству и размерам эпидермальных клеток и устьиц. Так, у пораженных растений обоих сортов клетки на адаксиальной стороне более крупные – от размеров  $40 \times 36$  и  $44 \times 28$  мкм до значений  $48 \times 37$  и  $59 \times 31$  мкм соответственно для сортов Суевия и Президент. У пораженных растений сорта Президент устьица на абаксиальной стороне более крупные (от 11 до 14 мкм). Обнаружены различия и в удельной плотности устьиц на адаксиальной стороне растений с выраженной симптоматикой: их количество в 1,5 раза больше, чем у здоровых растений. Указанные изменения могут повлиять на снижение способности противостоять водному стрессу в условиях сильного испарения или гидротермического стресса при культивировании в открытом грунте.

Общее содержание воды в тканях листьев находилось в пределах 84-92% воды на единицу сырого веса, за исключением пораженных растений сорта Президент (оводненность –  $73,4 \pm 6,0\%$ ). Анализ фракционного состава воды выявил увеличение доли структурно-связанной от 38% у здоровых растений до 45% у пораженных растений сорта Суевия, и снижение указанной фракции от 52 до 37% соответственно у сорта Президент.

При изучении индукции флуоресценции хлорофилла, отмечено увеличение уровня максимальной флуоресценции у растений с поражениями вирусными заболеваниями ( $F_m$ ) в 1,2 – 1,4 раза (максимальные значения у сорта Президент, рис. 3). Рост флуоресцентного сигнала от  $F_0$  до уровня  $F_m$  и отношение вариабельной

флуоресценции ( $F_v = F_m - F_o$ ) к  $F_m$  используют как индикатор фотосинтетической функции [18]. Как показали исследования,  $F_v$  у растений с проявлением симптомов значительно ниже, чем у здоровых растений (1800 – 1960 отн.ед. у пораженных, 2300 – 3000 отн.ед. – у здоровых). Это отражает наличие фотоингибирования у больных растений на уровне светособирающих комплексов. Благодаря расчетному показателю относительной фотосинтетической активности  $(F_m - F_{st})/F_m$ , снижение которого указывает на ослабление фотосинтетической функции [16], мы оценили функциональное состояние ассимилирующих тканей растений канны. У здоровых растений значения данного показателя составили 0,74 – 0,75. Пораженные вирусной инфекцией проявили снижение фотосинтетической активности: 0,63 – 0,68 (минимальное значение у растений сорта Президент). Данные изменения могут быть связаны со значительными повреждениями в работе фотосинтетического аппарата у сорта Президент, а также с нарушениями процессов метаболизма.

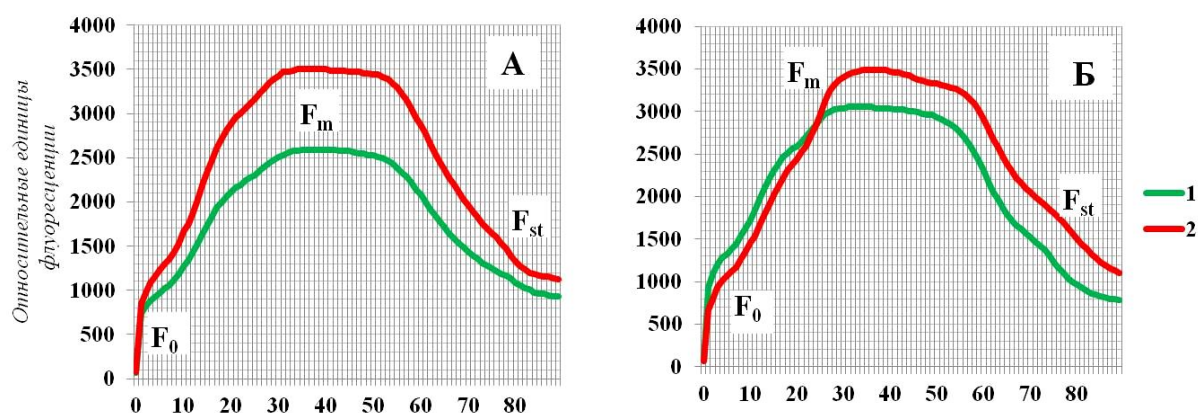


Рис. 3 Кривые индукции флуоресценции хлорофилла листьев *Canna × hybrida hort. ex Backer* в условиях закрытого грунта: А – сорт Президент; Б – сорт Суевия.

Исследование биохимических параметров показало, что содержание пролина, фенольных соединений и аскорбиновой кислоты обусловлены сортовыми различиями, тем не менее, концентрации этих соединений при поражении растений у изученных сортов изменяются аналогично (табл. 1). Содержание пролина у пораженных растений уменьшилось, причем у сорта Президент выявлены значительные изменения значения этого показателя, тогда как у сорта Суевия изменения концентрации пролина лишь превысили существенную разницу. Эти данные согласуются со значительным снижением доли связанной воды в сорте Президент, подтверждая выводы некоторых авторов об осморегулирующих свойствах пролина [15].

В концентрации аскорбиновой кислоты также выявлены достоверные различия между здоровыми и пораженными растениями. Содержание этого соединения в сорте Суевия незначительно уменьшилось, в сорте Президент отмечено более интенсивное снижение содержания аскорбиновой кислоты. Известно, что биосинтез аскорбиновой кислоты растений связан с фотосинтезом и дыханием [14], интенсивность которых ослабевает при поражении заболеваниями.

Суммарное содержание фенольных веществ при поражении растений вирусными заболеваниями увеличивается. Наиболее существенные изменения между значениями этого показателя у здоровых и пораженных растений выявлены у сорта Суевия, что свидетельствует о высокой адаптационной способности канны садовой данного сорта. В сорте Президент увеличение концентрации фенольных веществ – было выражено в меньшей степени. Эти соединения являются важными и

необходимыми компонентами клеточного метаболизма растений, осуществляя функцию защиты растения от стрессоров, а уровень их накопления зависит от многих факторов, в том числе и генетических характеристик [5]. В целом изменения в фенольном метаболизме у растений являются важным процессом, связанным с формированием устойчивости к действию стрессовых факторов.

Таблица 1

Биохимические показатели сортов *Canna x hybrida hort.*

Сорт, вариант		Содержание, мг/100 г		
		Пролин	Аскорбиновая кислота	Фенольные вещества
Президент	Без симптомов	61,6±1,5	18,5±0,9	5304±131
	С симптомами	231,8±6,9	61,6±1,8	2549±78
Суевия	Без симптомов	43,5±1,1	42,5±1,5	7664±220
	С симптомами	69,5±2,4	48,7±1,8	2924±90

Особое место в защитных реакциях растений при заражении вирусными инфекциями принадлежит антиоксидантным ферментам (СОД, ПФО, каталаза и др.), активность которых значительно изменяется под воздействием патогенов [9]. По увеличению активности данных ферментов, как следствие их накопления в растительном организме, можно судить о проявлении защитной реакции клеток к стрессовым факторам.

Установлено, что пораженные вирусными инфекциями у сортов канны наблюдалось снижение активности каталазы и увеличение активности СОД и полифенолоксидазы ПФО (табл. 2). Более выраженные изменения активности ферментов наблюдали у сорта Суевия.

Таблица 2

Активность окислительно-восстановительных ферментов сортов *Canna x hybrida hort.*

Сорт, вариант		Активность каталазы, г О <sub>2</sub> /г·мин	Активность СОД, усл. ед/ г	Активность ПФО, усл. ед/г·с
Президент	Без симптомов	1,56±0,04	10,91±0,27	0,49±0,01
	С симптомами	0,99±0,03	13,28±0,33	0,92±0,02
Суевия	Без симптомов	6,65±0,17	6,50±0,18	0,77±0,02
	С симптомами	1,842±0,05	13,59±0,26	1,848±0,05

Активность каталазы у данного сорта снижалась более чем в 3 раза, в то время как у сорта Президент она падала лишь на 36%. Аналогично активность СОД и ПФО возрастала в 2-2,5 раза, а у сорта Президент лишь на 17% и 46% соответственно. Рост активности полифенолоксидазы у пораженных вирусами растений наблюдался на фоне значительного увеличения содержания общих фенольных соединений.

Так как активизация СОД является ответной реакцией на увеличение образования супероксидных радикалов, то таким образом данный фермент осуществляет защиту клеток растения от окислительных повреждений [8]. Более эффективная работа антиоксидантных ферментов повышает стрессоустойчивость растений при воздействии неблагоприятных факторов среды. Исходя из полученных данных по ферментной активности можно предположить, что сорт Суевия является более устойчивым к поражению вирусными инфекциями, чем сорт Президент.

### Выводы

Выявлен ряд структурных особенностей в вегетативной сфере некоторых сортов канны садовой в связи с проявлением симптомов вирусных заболеваний: увеличение толщины аэренхимы и линейных размеров клеток адаксиальной эпидермы, уменьшение толщины хлоренхимы в основном за счет губчатой паренхимы, изменения в распределении устьиц. На фоне анатомических изменений отмечены различия в водном режиме изученных сортов. О деградации фотосинтетического аппарата при поражении вирусными заболеваниями может также свидетельствовать факт снижения уровня относительной фотосинтетической активности и увеличения уровня флуоресценции хлорофилла вследствие повреждений пластидных комплексов хлоренхимы.

В биохимическом составе изученных сортов канны садовой установлены различия между здоровыми и пораженными растениями: уменьшение содержания пролина и аскорбиновой кислоты и увеличение концентрации фенольных соединений, снижение активности каталазы и увеличение активности супероксиддисмутазы и полифенолоксидазы.

Изменения физиологических и биохимических параметров у растений канны сорта Президент, пораженных вирусной инфекцией были выражены сильнее, чем у сорта Суевия, что может быть связано с его сравнительно низкой степенью устойчивости к воздействию данного стрессового фактора.

**Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 14-50-00079.**

### Список литературы

1. Андрющенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм *Lycopersicon Tomum* // Изв. АН МССР. – 1981. – № 4. – С. 55 – 60.
2. Воскресенская О.Л., Алябышева Е.А., Половникова М.Г. Большой практикум по биоэкологии. – Йошкар-Ола, 2006. – 107 с.
3. Гержикова В.Г. Методы теххимического контроля в виноделии. – Симферополь: Таврида, 2002. – 259 с.
4. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений. – М.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.
5. Запретов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. – М.: Наука, 1993. – 272 с.
5. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. Химии. – 1990. – № 2. – С. 88 – 91.
6. Кушниренко М.Д., Печерская С.Н. Физиология водообмена и засухоустойчивости растений. – Кишинёв: Штиинца, 1991. – 305 с.
7. Лотова Л.И. Морфология и анатомия высших растений. – М.: Едиториал УРСС, 2001. – 528 с.
8. Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про/антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126. – С. 250-261.
9. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113. – № 4. – С. 442 – 455.
10. Минаева В.Г. Флавоноиды в онтогенезе и их практическое использование. – Новосибирск: Наука. 1978. – 270 с.

11. Рухтер А.А. Использование в селекции взаимосвязей биохимических признаков // Труды ГНБС. – 1999. – Т. 108. – С. 121 – 129.
12. Тевфик А.Ш. Регенерация растений канны садовой (*Canna × hybrida hort*) в культуре вегетативных почек *in vitro* // Труды ГНБС. – 2012. – Т. 134. – С. 426 – 435.
13. Тевфик А.Ш., Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Зубкова Н.В. Канна садовая. Современные методы размножения // Цветоводство. – 2014. – № 6. – С. 18 – 21.
14. Чупахина Г.Н., Романчук А.Ю., Платунова Е.В. Аскорбиновая кислота как антистрессовый фактор растений. – В кн.: Интродукция, акклиматизация и культивация растений. – Калининград: КГУ, 1998. – С. 88 – 94.
15. Csonka L.N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress // Microbiol. Review. – 1989. – Vol. 53. – P. 121 – 147.
16. Lichtenthaler H.K., Rindere U. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plant // CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry. – 1988. – V. 19. – Sup. 1. – P. 29 – 85.
17. Momol M.T., Lockhart B.E.L., Dankers H., Adkins S. 2004. *Canna yellow mottle virus* detected in canna in Florida. Online. Plant Health Progress. – DOI:10.1094/PHP-2004-0809-01-HN.
18. Stirbet A., Govindjee. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient, J. Photochem. // Photobiol. – B: Biol. – 2011. – P. 1 – 22.

Статья поступила в редакцию 16.08.2016 г.

**Paly A.Ye., Mitrofanova I.V., Brailko V.A., Grebennikova O.A., Zubkova N.V., Chelombit S.V. Morphological changes and metabolic process in vegetative organs of *Canna × hybrida hort. ex Backer* being affected by viral pathogens // Bull. Nikit. Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 61-68.**

A number of structural peculiarities in vegetative sphere of some canna cultivars was revealed within infected plants. Difference in water regime was determined as well. Reduction of reliable photosynthetic activity and increasing of chlorophyll fluorescence were fixed in here, what probably proves degradation of photosynthetic apparatus. Biochemical modifications of infected plants were determined as well, that is reduction of proline and ascorbic acid concentration, increasing of phenolic compounds content, decrease of catalase activity and rise of superoxide dismutase and polyphenol oxidase.

**Key words:** garden canna; leaf anatomy; photosynthetic apparatus; protective compounds; oxidation-reduction enzymes

## СЕЛЕКЦИЯ

УДК 582.572.8:632.4

### СКРИНИНГ СОРТОВ ЛИЛИИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* ПО ПРИЗНАКУ УСТОЙЧИВОСТИ К ФУЗАРИОЗУ

Екатерина Владимировна Грошева, Марина Витальевна Маслова

ФГБОУ ВО Мичуринский государственный аграрный университет,  
393760, Россия, Тамбовская область, г. Мичуринск  
ekaterina2687@mail.ru

Проведен скрининг сортов лилии Manitoba Morning и Cavalese по признаку устойчивости к фузариозу с применением специальных лабораторных приемов моделирования биотической нагрузки на растения с использованием токсических метаболитов патогена. Выявлено стимулирующее действие

низких концентраций культурального фильтрата *F. oxysporum* на микрорастения лилии и его токсическое влияние при более высоком содержании в среде. Определена дифференцирующая концентрация токсина в питательном субстрате для ранжирования сортов по степени проявления симптомов фузариоза.

**Ключевые слова:** сорта лилии; *in vitro*; скрининг; токсические метаболиты; фузариоз.

### Введение

Изменение погодных условий, неконтролируемый завоз посадочного материала из-за рубежа, появление устойчивых штаммов грибов, несовершенство защитных мероприятий привели к ухудшению фитосанитарной обстановки в цветоводстве и усилению вредоносности грибных болезней декоративных растений.

Грибные болезни цветочных культур вызываются многочисленными представителями различных классов грибов. Особую опасность для большинства луковичных культур представляют болезни, вызываемые некротрофными грибами представителями родов *Fusarium*, *Botrytis*, *Verticilum*, которые, внедряясь в живую ткань растения, очень быстро убивают ее своими токсинами и питаются уже мертвыми клетками. Вредоносность данных микроскопических грибов зависит от восприимчивости растения к заболеванию и от внешних условий, которые могут способствовать массовому развитию микроорганизмов и заражению ими растений. Они обычно бывают полифагами, в различной степени патогенны и обитают в различных типах почв [4].

Наиболее вредоносным заболеванием *Lilium* L. является фузариоз (луковичная гниль), который снижает декоративные признаки растений и нередко приводит к их гибели. Возбудителями данной болезни являются грибы рода *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Sned. et Hans, *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr.). Характерный признак поражения – побурение корней и гниль донца луковицы и, как следствие этого, пожелтение листьев, которое начинается с верхушек. Затем на листьях образуются желтовато-коричневые пятна, листья засыхают и растение увядает. Первым признаком заболевания является побурение концов корней. Развитию заболевания способствует повышение температуры воздуха и влажности почвы [1, 13].

Распространение фузариоза вызвало необходимость поиска устойчивых генотипов среди существующего сортимента лилий, перспективных для использования в озеленении. В настоящее время использование неспецифических токсинов возбудителей болезней широко применяется в селекции различных культур на устойчивость к биотическим факторам. Наряду с морфологической структурой популяций фитопатогенных грибов большой интерес представляет изучение продуктов метаболизма патогенов [2, 10].

Одним из путей, препятствующих массовому развитию болезней, является повышение устойчивости растений к болезням с помощью методов селекции. Однако селекция рода *Lilium* L. в основном направлена на получение высокодекоративных и зимостойких сортов, тогда как никаких существенных достижений в повышении устойчивости растений к болезням пока не имеется, что также способствует распространению патогенов.

Так как возбудители болезней способны образовывать в жидкой питательной среде комплекс токсических метаболитов, принимающих участие в патогенезе и влияющих на развитие растения-хозяина, весьма актуальна разработка приемов селекции без применения инфекционных фонов. Использование в качестве селекционирующего агента культурального фильтрата патогенов – это один из способов ускорения селекционного процесса на устойчивость к болезням. Данный метод позволяет разделить сорта по степени восприимчивости к метаболитам микробиоты. Этот способ широко используется исследователями, так как экспериментально установлена корреляция между восприимчивостью к поражению возбудителем болезни



и чувствительностью растений к его токсинам. Исследования действия токсичных метаболитов возбудителей дают возможность наблюдать характер действия гриба на растение-хозяина, более глубоко понять процессы их взаимодействия, отслеживать изменения в патосистеме и, в конечном счете, отбирать устойчивые к ним формы [2, 7].

Одним из наиболее экологических способов борьбы с фузариозом является создание иммунных сортов лилии с использованием культуры *in vitro* и выделение устойчивых генотипов среди существующего ассортимента.

Цель данной работы – проведение скрининга сортов лилии по признаку устойчивости с применением специальных лабораторных приемов моделирования биотической нагрузки на растительные ткани в контролируемых условиях с использованием токсических метаболитов патогенов.

### Объекты и методы исследования

Исследования проведены на базе лабораторий биофотоники и биотехнологии ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ.

Материалом для проведения скрининга исследуемых сортов по признаку устойчивости к фузариозу являлись микрорастения лилий *Manitoba Morning* и *Cavalese*.

‘*Manitoba Morning*’ – Кудреватые гибриды (*Martagon hybrids*) (REG: Lily Company B.V., 2010), страна происхождения Нидерланды. Окраска листочков околоцветника темно-пурпурно-розовая в верхней половине с темно-зеленовато-желтой полосой в основании. На внутренней стороне каждого листочка околоцветника в базальной половине имеются многочисленные пятна пурпурно-красного цвета. Нектарники темно-зеленовато-желтые, пыльца красновато-оранжевая. Диаметр цветка 6 см. На стебле бывает более 20 цветков. Высота растений 120 – 130 см. Цветет в июне [15].

‘*Cavalese*’ – ЛА гибриды (*LA hybrids*) (REG: Vletter & Den Haan Beheer B.V., 2000), страна происхождения Нидерланды. Окраска листочков околоцветника внутри пурпурно-красная, вне пурпурно-розовая. Нектарники белые с опушением, пыльца оранжевая. Диаметр цветка 21 см. Высота растений до 140 см. Цветет в конце июня – первой декаде июля [15].

В работе использовали стандартные методы изоляции микроорганизмов, культивирования их на искусственных питательных средах и изучения в условиях чистых культур [3, 9]. Выделение патогена проводили путем посева луковичных чешуй после поверхностной стерилизации на твердую питательную среду Чапека (нитрат натрия – 3,0 г, калий фосфорный однозамещенный – 1,0 г, сульфат магния семи водный – 0,5 г, калий хлористый – 0,5 г, сульфат железа (II) семиводный – 0,01 г, сахара 3,0 г, агар-агар – 15,0 г). Для накопления токсических метаболитов грибок выращивали на жидкой среде Чапека в течение месяца при температуре воздуха  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , после чего стерилизовали фильтрованием с использованием насадок на шприц «Millipore» 0,22  $\mu\text{m}$ , France.

Для культивирования растений *in vitro* использовали минеральную основу питательных сред MS [14]. В качестве регуляторов роста использовали 0,1 мг/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК). Для инициации развития адвентивных побегов в состав среды MS добавляли глюкозу или сахарозу в концентрации 45 г/л, тиамин – 0,4 мг/л, пиридоксин – 0,5 мг/л, никотиновую кислоту – 0,5 мг/л, глицин – 2 мг/л, инозитол 100 мг/л. Готовую среду стерилизовали автоклавированием при  $120^{\circ}\text{C}$  и давлении  $1,2 \pm 0,1$  атм. Субкультивирование микролуковиц осуществляли в конических колбах емкостью 250 мл с 80 мл среды. Продолжительность одного пассажа составляла 3 – 4 недели. Культивирование микрорастений лилий проводили в специально оборудованной культуральной комнате при 16-часовом световом дне с освещенностью



1800 – 2000 люкс, температуре воздуха  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  и влажности воздуха 50 – 60%. Каждые 7 дней проводили наблюдения и учёт.

Оценка влияния токсинов *F. oxysporum* на растение-хозяина проводилась с использованием в качестве селективирующего агента культурального фильтрата гриба. Для выявления дифференцирующей концентрации растворов токсических метаболитов патогена в среду добавляли различное количество фильтрата культуральной жидкости *F. oxysporum*. В опыте были использованы следующие варианты концентраций токсинов в питательной среде: 0%; 5%; 10%; 15%; 20%. Оценку степени поражения микрорастений проводили по пятибалльной шкале.

### Результаты и обсуждение

Тестирование на наличие инфекции тканей пораженных луковичных чешуй позволило выделить в чистую культуру и идентифицировать гриб *F. oxysporum*.

Грибы рода *Fusarium* причиняют значительный ущерб сельскохозяйственному производству, в связи с тем, что они способны поражать растения, относящиеся к различным систематическим группам. Метаболиты микромицета фузариума обладают широким спектром токсического действия в отношении растения-хозяина. Компоненты, содержащиеся в культуральной жидкости различных изолятов фузариума, модифицируют барьерно-транспортные характеристики плазматической мембраны растительных клеток и повышают коэффициент проницаемости плазмалеммы [12].

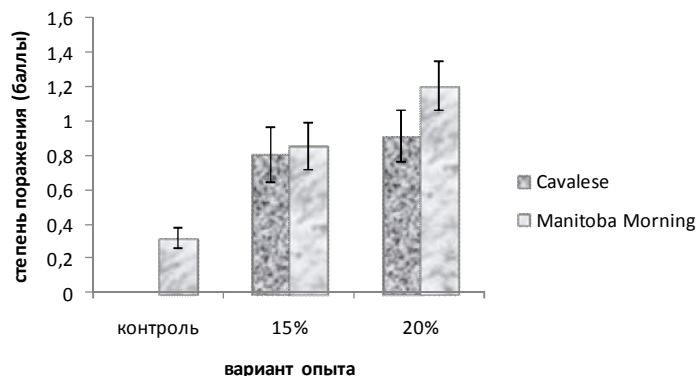
Использование в селекционной работе культурального фильтрата патогена позволило ряду исследователей выявить устойчивые к фузариозу формы овощных [8], зерновых [11], плодовых и ягодных культур [5, 6].

Проведенная оценка устойчивости микрорастений исследуемых сортов лилии *Manitoba Morning* и *Cavalese* к действию метаболитов патогена позволила выявить различную реакцию образцов на интоксикацию.

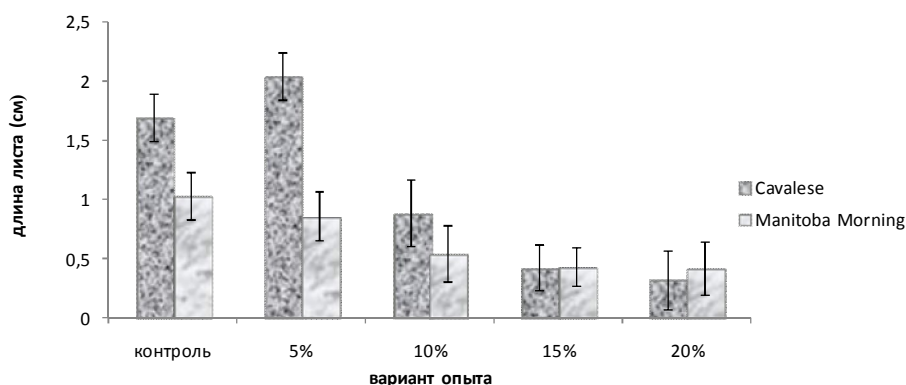
Изучение степени некротизации исследуемых растений показало, что через две недели культивирования у сорта *Manitoba Morning* 5 и 10%-ное содержание токсина в среде оказывало стимулирующее влияние на состояние растений, снижая степень проявления некрозов по сравнению с контролем (0,3 балла) до 0,2 и 0 баллов соответственно. Отмечено, что при использовании питательных сред с содержанием токсических метаболитов 15 и 20% наблюдались выраженные симптомы поражения микрорастений (некроз корней, микролуковиц, листьев) на 0,8 и 1,2 балла соответственно.

У микрорастений сорта *Cavalese* в вариантах с 5 и 10%-ным содержанием токсических метаболитов в среде, также как и в контроле, некрозов, отмечено не было. При использовании фильтрата культуральной жидкости гриба в концентрации 15 и 20% степень поражения растительных тканей составила 0,8 и 0,9 балла соответственно (рис. 1).

В результате эксперимента было установлено, что длина первого листа у сорта *Cavalese* при использовании концентрации метаболита 5% была больше на 0,4 см по сравнению с контролем и составила 2,0 см. В случаях использования 10%, 15% и 20%-ной концентрации токсина выявлено его ингибирующее действие на рост первого листа (средняя длина листа – 0,9; 0,4 и 0,3 см соответственно). У сорта *Manitoba Morning* при увеличении концентрации токсина отмечалось последовательное снижение длины листа от 1,0 в контроле до 0,4 см в варианте с 20% концентрацией (рис. 2).



**Рис. 1** Степень поражения растений лилий в культуре *in vitro* после воздействия токсических метаболитов *F. oxysporum* в различных концентрациях



**Рис. 2** Влияние токсических метаболитов *F. oxysporum* на силу роста листьев микрорастений лилий

Оценка реакции сортов на действие токсических метаболитов гриба *F. oxysporum* по количеству неразвившихся луковиц показала, что, начиная с 10% по мере повышения концентрации, происходило увеличение числа неразвившихся микролуковиц. По данному показателю наблюдались яркие сортовые отличия. При 10%-ном содержании токсина в среде исследуемые сорта имели одинаковое количество неразвившихся луковиц (25%). В варианте с 15% концентрацией у сортов Cavalese и Manitoba Morning данный показатель был равен 41,5 и 50,0%, при концентрации 20% – 41,5 и 66,7% соответственно.

Таким образом, по всем исследуемым показателям (степень некротизации микрорастений, длина первого листа, количество неразвившихся луковиц) выраженным ингибирующим действием обладали питательные среды с 15 и 20%-ным содержанием фильтрата культуральной жидкости гриба *F. oxysporum*. Наибольшее различие в реакции растений исследуемых сортов лилии отмечалось в вариантах с 20%-ной концентрацией токсина. Поэтому для дифференциации сортов в условиях *in vitro* по признаку устойчивости рекомендуется использовать питательные среды с 20%-ным содержанием метаболитов патогена.

Анализ полученных данных позволил охарактеризовать сорт Cavalese как более устойчивый к действию токсинов гриба *F. oxysporum* по сравнению с сортом Manitoba Morning, т.к. в условиях интоксикации он имел высокие показатели роста и развития растений.

### Выводы

В результате проведенных исследований выявлено, что биологически активные вещества, содержащиеся в культуральной жидкости гриба *F. oxysporum*, выделенного при тестировании пораженных растений лилии на наличие инфекции, могут оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее действие на микрорастения лилий в зависимости от концентрации токсина в среде и генотипических особенностей сорта. Внесение в питательную среду метаболитов гриба в концентрации 15 и 20% у сортов Cavalese и Manitoba Morning способствовало увеличению степени некротизации растительных тканей и возрастанию количества неразвившихся микролуковиц. Снижение длины первого листа у микрорастений лилии наблюдалось уже при 10%-ном содержании в среде. Метаболиты гриба *F. oxysporum* в слабых концентрациях (5%), как правило, оказывали стимулирующее влияние на рост и развитие растений.

Отмечена дифференциация исследуемых сортов лилии по устойчивости к метаболитам патогена. Сорт Cavalese проявил более высокий уровень устойчивости к действию токсинов гриба *F. oxysporum* по сравнению с сортом Manitoba Morning. Наиболее яркие различия в показателях состояния микрорастений у исследуемых сортов отмечались в вариантах с 20%-ным содержанием токсических метаболитов в питательной среде.

Таким образом, использование данного метода позволяет проводить скрининг сортов лилии и ранжировать их по степени устойчивости к патогенам. Для этого целесообразно использовать раствор культурального фильтрата патогена с концентрацией 20%, так как она является дифференцирующей для определения степени устойчивости растений к токсинам.

### Список литературы

1. Баранова М.В. Лилии. – Л.: Агропроиздат, 1990. – 384 с.
2. Дубровский М.Л., Маслова М.В., Кружков А.В. Действие метаболитов патогенных микроорганизмов на мужской гаметофит смородины и абрикоса // Плодоводство и ягодоводство России. – 2013. – Т. 36. № 1. – С. 148 – 153.
3. Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А., Коваль З.Э. и др. Методы экспериментальной микологии. – Киев: Наукова думка, 1982. – 551 с.
4. Журавлёв И.И. Болезни цветочных культур. – Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1973. – 80 с.
5. Козаева М.И. Влияние токсинов изолятов рода *Fusarium* на различные по устойчивости сорта земляники // European Applied Sciences: challenges and solutions 1st International Scientific Conference. – 2015. – С. 126-128.
6. Козаева М.И. Влияние токсинов некоторых изолятов рода *Fusarium* на различные по устойчивости сорта яблони // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2016. № 6-2. – С. 9-11.
7. Корня Т.М., Игнатова С.А., Бабаянц О.В. Свойства фильтрата культуральной жидкости *Fusarium graminearum* Schwabe как селективного агента в условиях *in vitro* // Біотехнологія. Наука. Освіта. Практика: тези доповідей IV міжнародної науково-практичної конференції (Дніпропетровськ, 11-13 листопада 2008). – Дніпропетровськ, 2008. – С. 163 – 164.
8. Малахова Н.В., Галиева Л.Д., Хасейн А., Калиева А.А., Тезекбаева Б. К., Мольцева Э.Р. In vitro селекция клеточных культур картофеля с культуральным фильтратом гриба *Fosarium solani* // Вестник Национальной академии наук Республики Казахстан. – 2016. – №1. – С.170-177.

9. Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений / И. Бёттхер, Т. Ветцель, Ф.В. Древе, Х. Кеглер, К. Науманн, Б. Фрайер, К. Фрауэнштайн, Э. Фукс. – М.: Агропромиздат, 1987. – 224 с.
10. Поликсенова В.Д. Индуцированная устойчивость растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам // Вестник БГУ. – Сер. 2. 2009. №1. С. 48 – 60.
11. Савицкая А.Г. Клеточная селекция зерновых растений на устойчивость к микотоксинам грибов рода *Fusarium* // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2013. – №6. – С.58-67.
12. Сидорова С.Г., Кудряшова В.А. Влияние фузариевой кислоты на липидный бислой мембраны растительной клетки // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1995. – Т. 131. – С. 332-341.
13. Сорокопудова О.А. Биологические особенности лилий в Сибири: монография. – М.: Белгородский Государственный ун-т, 2005. – 244 с.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol.Plant. – 1962. – Vol. 15, №13. – P. 473 – 497.
15. The International lily register and checklist (2007). – London SWIP2PE United Kindom. 2012. – 948 с.

*Статья поступила в редакцию 25.08.2016 г.*

**Grosheva Ye.V., Maslova M.V. Screening of lily cultivars *in vitro* according to Fusariosis-resistance** // Bull. of the State Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 68-74.

The article presents study results of lily species, Manitoba Morning and Cavalese, screening according to fusariosis-resistance. In this way special laboratorial modeling approaches of biotical load on plants with toxic pathogen metabolites were applied. Low concentrations of cultural filtrate *F. oxysporum* tended to stimulate lily microplants, at the same time its toxic influence was registered if to increase concentration in medium. Differentiative toxin concentration was identified in the nutrient substratum aimed at ranging of cultivars according to fusariosis degree.

**Key words:** *Lily L.; in vitro; screening; toxic metabolites; fusariosis*

## ВНИМАНИЮ АВТОРОВ

«Бюллетень ГНБС» (свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС77-61874 от 25 мая 2015 г. выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)) издается Никитским ботаническим садом – Национальным научным центром (НБС – ННЦ).

### ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ И ПРЕДСТАВЛЕНИЯ СТАТЕЙ

1. Для публикации принимаются статьи на русском и английском языках, **ранее не опубликованные и не поданные к публикации в других журналах и сборниках трудов** (исключение составляют тезисные доклады и материалы конференций, симпозиумов, совещаний и проч.).

2. Статьи должны содержать сжатое и ясное изложение современного состояния вопроса, описание методов исследования, изложение и обсуждение полученных автором данных. Статья должна быть озаглавлена так, чтобы название соответствовало ее содержанию. Статья должна иметь структурные части (разделы), которые отражены в шаблоне (см. ниже). В разделе **«Введение»** необходимо отразить актуальность исследования (постановка проблемы в общем виде и ее связь с важными научным и/или практическими задачами), дать анализ публикаций, на которые опирается автор, решая проблему, а также сформулировать цель исследования.

3. Статьи должны быть набраны в текстовом редакторе MS Word for Windows (\*.doc или \*.docx). Устанавливаются следующие значения параметров страницы: формат – А4, ориентация – книжная, размер всех полей – 2,5 см, шрифт – Times New Roman 12 пт (кроме аннотаций, ключевых слов, рисунков и таблиц, которые набираются шрифтом 10 пт – см. шаблоны), абзацный отступ – 1,25 см, интервал между строками основного текста – 1 (одинарный), текст без переносов, выравнивание по ширине, страницы не нумеруются. Просьба при оформлении и форматировании текста и его отдельных структурных элементов строго следовать шаблонам!

4. Объем публикации не должен превышать 8 страниц. Относительный объем иллюстраций не должен превышать 1/3 общего объема статьи. Список цитированной литературы, как правило, не должен превышать 30 источников для обзорных статей и 15 – для статей с результатами собственных исследований. Между инициалами пробел не ставится, но инициалы отделяются от фамилии пробелом. Переносить на другую строку фамилию, оставляя на предыдущей инициалы, нельзя (И.И. Иванов, Иванов И.И.).

5. В статье даются аннотации на двух языках (русском и английском). Перед разделом **«Введение»** размещается аннотация и ключевые слова на языке, на котором написана статья (шрифт 10 пт, слова **«Ключевые слова»** – жирным, сами ключевые слова – курсивом). Ключевые слова или словосочетания отделяются друг от друга точкой с запятой. После списка литературы размещается аннотация и ключевые слова на английском языке. Объем аннотаций – 500 знаков, количество ключевых слов – 5 – 7. Оформление и параметры форматирования этих элементов должны соответствовать шаблону (см. ниже).

6. Печатный вариант рукописи (в одном экземпляре) необходимо сопроводить её электронным вариантом в виде файлов в форматах \*.doc или \*.docx (можно электронной почтой на адрес редакции).

7. Рукопись подписывается всеми авторами. На отдельной странице прилагается информация об авторах статьи с указанием места работы, должности, ученой степени,

адреса учреждения, контактной информацией для обратной связи (телефон и e-mail всех авторов). К тексту статьи прилагается направление от учреждения, где выполнена работа. Статьи аспирантов и соискателей сопровождаются отзывом научного руководителя.

8. Все статьи проходят независимое анонимное рецензирование.

9. Редакция журнала оставляет за собой право сокращать тексты рукописей по согласованию с авторами.

При направлении редакцией статьи для исправления и доработки автору предоставляется месячный срок.

10. В шапке статьи должны быть указаны: фамилия, имя, отчество всех авторов полностью (на русском языке); полное название организации — место работы каждого автора в именительном падеже, страна, город (на русском языке). Если все авторы статьи работают в одном учреждении, можно не указывать место работы каждого автора отдельно; адрес электронной почты для каждого автора; корреспондентский почтовый адрес и телефон для контактов с авторами статьи (можно один на всех авторов).

### **Рукописи статей отправлять по адресу:**

Редакция научных изданий  
Никитского ботанического сада,  
пгт. Никита, г. Ялта, Республика Крым, 298648  
**Телефон: (0654) 33-56-16**  
**E-mail: redaknbg@yandex.ru**

### **ШАБЛОН ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЬИ**

УДК 635.055:504.753:712.253(477.75)

## **МНОГОВЕКОВЫЕ ДЕРЕВЬЯ АРБОРЕТУМА НИКИТСКОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА**

**Людмила Ивановна Улейская<sup>1</sup>, Анатолий Иванович Кушнир<sup>2</sup>, Екатерина  
Степановна Крайнюк<sup>1</sup>, Владимир Николаевич Герасимчук<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, г. Ялта  
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита  
E-mail: mymail@mail.ru

<sup>2</sup> Национальный университет биоресурсов и природопользования, г. Киев  
Почтовый индекс, г. Киев, ул. Садовая, 5  
E-mail: mymail@mail.ru

Впервые проведен анализ жизненного состояния и эколого-декоративных характеристик... (аннотация)...

**Ключевые слова:** *ключевые слова; ключевые слова; ключевые слова; ключевые слова; ключевые слова.*



соответствии с *Authors of plant names* (2001). Ссылки на источник (источники), в соответствии с которым (которыми) даются те или иные номенклатурные комбинации, обязательны. Латинские названия таксонов рангом выше рода курсивом не выделяются. Названия сортов растений заключаются в одинарные кавычки ('...'), если перед этим названием нет слова «сорт»; все слова в названии сорта начинаются с заглавных букв (например, персик 'Золотой Юбилей', но сорт Золотой Юбилей).

#### 5. Общие требования к цитированию следующие:

– многоточие в середине цитаты берётся в фигурные скобки <...>. Если перед опущенным текстом или за ним стоял знак препинания, то он опускается;

– если автор, используя цитату, выделяет в ней некоторые слова, то после текста, который поясняет выделенные слова, ставится точка, потом тире и указываются инициалы автора статьи (первые буквы имени и фамилии), а весь текст предостережения помещается в круглые скобки. Например: (курсив наш. – А.С.), (подчеркнуто нами. – А.С.), (разбивка наша. – А.С.).

6. Десятичные дроби набирайте через запятую: 0,1 или 1,05.

7. Тире не должно начинать строку.

8. Не допускается наличие двух и более пробелов подряд.

9. Не разделяются пробелом сокращения типа „и т.д., и т.п.“, показатели степени, подстрочные индексы и математические знаки.

10. Не отделяются от предыдущего числа знак %, °.

11. Перед единицами измерения и после знаков №, §, © ставится пробел.

12. Таблицы и иллюстрации должны быть вставлены в текст после их первого упоминания. Следует избегать многостраничных таблиц, их оптимальный размер – 1 страница.

13. Перед рисунком, после него и после его названия (перед текстом статьи) делаются отступы в 1 строку. Название рисунка располагается по центру, даётся строчными жирными буквами, шрифтом размером 10 пт через 1 интервал (**Рис. 1** – точка после цифры не ставится). Рисунки и подписи к ним следует вставлять в таблицу, состоящую из одного столбца и двух строк, при этом активировав опцию «Удалить границы» для того, чтобы последние не отображались при печати (см. шаблон ниже).

14. Перед таблицей и после неё делается отступ в 1 строку. Слово «**Таблица**» с ее номером располагается справа, название таблицы – ниже по центру; всё строчными жирными буквами, шрифтом размером 10 пт через 1 интервал (**Таблица 1** – точка после цифры не ставится). Текст таблиц набирается строчными обычными буквами шрифтом размером 10 пт, через одинарный интервал. Заголовки граф таблиц должны начинаться с заглавных букв, подзаголовки – со строчных, если они составляют одно предложение с заголовком, и с заглавных, если они являются самостоятельными. Единицы измерения указываются после запятой. Оформление и параметры форматирования должны соответствовать шаблону – см. ниже.

Текст, который повторяется в столбце таблицы, можно заменить кавычками («–»). Ставить кавычки вместо повторяющихся цифр, пометок, знаков, математических и химических символов не следует.

В случае, если размер таблицы более 1 стр., все её столбцы нумеруются арабскими цифрами и на следующих страницах справа вверху отмечается ее продолжение также шрифтом 10 пт (например, «Продолжение таблицы 1»).



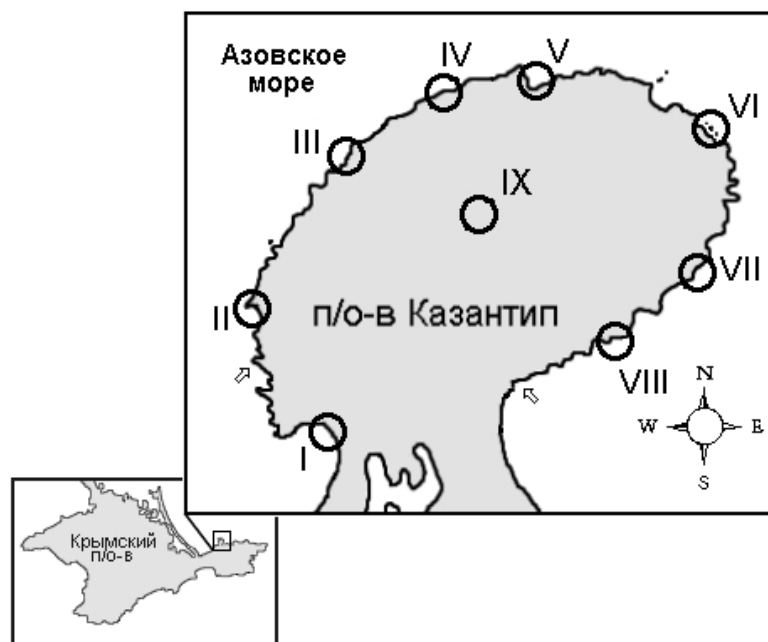
**ШАБЛОН ОФОРМЛЕНИЯ РИСУНКА**

Рис. 1 Схематическая карта обследованного района (станции I-VIII)

**ШАБЛОН ОФОРМЛЕНИЯ ТАБЛИЦЫ**

Таблица 1

Видовой состав и биомасса макрофитобентоса в морской акватории у м. Св. Троицы

Вид	Биомасса, г/м <sup>2</sup> (станции I-IV)					
	ПСЛ (±0,25 м)		СБЛ (-0,5-5 м)			
	I	II	III	IV	V	VI
<i>Ulothrix flacca</i> (Dillwyn) Thur.	М		М			
<i>Chaetomorpha aerea</i> (Dillwyn) Kutz.	М	М	15,00 ±3,92	1,67±0,72		М
Примечания Здесь и далее: ПСЛ – псевдолитораль, СБЛ – сублитораль. М – мало (менее 0,01 г в пробе). Пустые ячейки означают отсутствие вида в пробах. ...						

16. Библиографические ссылки в тексте статей приводятся в квадратных скобках, несколько источников перечисляются **через запятую, в порядке возрастания номеров.**

Список литературы оформляется в соответствии с ГОСТ Р 7.0.5-2008. Библиографическая ссылка. Общие требования и правила составления. (ссылка на ГОСТ <http://protect.gost.ru/document.aspx?control=7&id=173511>)

Список литературы составляется в алфавитном порядке, сначала перечисляют работы, написанные кириллицей, затем – латиницей. Библиографические описания работ, опубликованных на языках, использующие другие типы алфавита (например, арабском, китайском и т.п.), следует приводить в английском переводе с указанием языка оригинала (в скобках, после номеров страниц).

17. В списке литературы латинские названия видов и родов выделяются

курсивом; номера томов (Т. или Vol.) и выпусков (вып., вип., № или no) обозначаются арабскими цифрами.

18. Штриховые рисунки, карты, графики и фотографии нумеруются арабскими цифрами в порядке упоминания в тексте. Ссылки на рисунки и таблицы в тексте заключаются в круглые скобки и указываются в сокращении, с маленькой буквы (табл. 1, рис. 1), при повторном упоминании добавляется слово «см.» (см. табл. 1, см. рис. 1).

Примеры библиографических описаний в списке литературы:

**Книги:**

1. *Новосад В.В.* Флора Керченско-Таманского региона. – К.: Наукова думка, 1992. – 275 с.

2. *Останко В.М., Бойко А.В., Мосякин С.Л.* Сосудистые растения юго-востока Украины. – Донецк: Ноулидж, 2010. – 247 с.

3. Экологический атлас Азовского моря / Гл. ред. акад. Г.Г. Матишов. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2011. – 328 с.

4. Authors of plant names: A list of authors of scientific names of plants, with recommended standard forms of their names, including abbreviations / Eds. R.K. Brummitt and C.E. Powell. – Kew: Royal Botanical Gardens, 1992, reprinted 2001. – 732 p.

**Периодические и продолжающиеся издания:**

5. *Багрикова Н.А.* Анализ адвентивной фракции флоры природных заповедников Керченского полуострова (Крым) // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2011. – Вып. 4(23). – С. 3 – 9.

6. *Никифоров А.Р.* Элементарный побег и сезонное развитие растений *Silene jailensis* N.I.Rubtzov (Caryophyllaceae) – реликтового эндемика Горного Крыма // Укр. ботан. журн. – 2011. – Т. 68, № 4. – С. 552 – 559.

7. *Садогурский С.Е.* Макрофитобентос водоёмов острова Тузла и прилегающих морских акваторий (Керченский пролив) // Альгология. – 2006. – Т. 16, № 3. – С. 337 – 354.

8. *Hayden H.S., Blomster J., Maggs C.A., Silva P.C., Stanhope M.J., Waaland J.R.* Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera // European Journal of Phycology. – 2003. – Vol. 38. – P. 277 – 294.

**Автореферат диссертации:**

9. *Белич Т.В.* Распределение макрофитов псевдолиторального пояса на Южном берегу Крыма: Автореф. дисс... канд. биол. наук: 03.00.05 / Государственный Никитский ботанический сад. – Ялта, 1993. – 22 с.

10. *Єна Ан.В.* Феномен флористичного ендемізму та його прояви у Криму: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.05 / Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАНУ. – К., 2009. – 32 с.

**Тезисы докладов:**

11. *Садогурская С.А., Белич Т.В.* Альгофлора прибрежной акватории у мыса Троицы (Чёрное море) // Актуальные проблемы современной альгологии: материалы IV международной конференции (Киев, 20 – 23 апреля 2012 г.). – К., 2012. – С. 258 – 259.

12. *Bagrikova N.A.* Syntaxonomical checklist of weed communities of the Ukraine: class Stellarietea mediae // 19-th International Workshop of European Vegetation Survey Flora, vegetation, environment and land-use at large scale (Pécs, 19.04–2.05, 2010): Abstr. – Pécs, 2010. – P. 51.

**Раздел в коллективной монографии:**

13. Багрикова Н.А., Коломийчук В.П. *Astragalus reduncus* Pall. // Красная книга Приазовского региона. Сосудистые растения / Под ред. д.б.н., проф. В.М. Остапко, к.б.н., доц. В.П. Коломийчука. – К.: Альтерпрес, 2012. – С. 198–199.

14. Корженевський В.В., Руденко М.І. Садогурський С.Ю. ПЗ Кримський // Фіторизноманіття заповідників і національних природних парків України. Ч.1. Біосферні заповідники. Природні заповідники / Під ред. В.А. Онищенко і Т.Л. Андрієнко. – К.: Фітосоціоцентр, 2012. – С. 198–220.

**Многотомные издания:**

15. Гидрометеорология и гидрохимия морей СССР, Т. IV. Чёрное море. Вып. 1. Гидрометеорологические условия / Под ред. А.И. Симонова, Э.Н. Альтмана. – СПб: Гидрометеоздат, 1991. – 426 с.

16. Algae of Ukraine: Diversity, Nomenclature, Taxonomy, Ecology and Geography. Vol. 1. Cyanoprocarota – Rhodophyta / Eds. Petro M. Tsarenko, Solomon P. Wasser, Eviator Nevo. – Ruggell: A.R.A.Gantner Verlag K.G., 2006. – 713 p.

**Интернет-ресурсы:**

17. Guiry M.D., Guiry G.M. 2013. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. – <http://www.algaebase.org>. – Searched on 05 August 2013.

Если литературный источник имеет четырех и более авторов, **следует указывать все фамилии.**

По требованию ВАК электронные копии опубликованных статей размещаются в базе данных Научной электронной библиотеки elibrary.ru (для присвоения Российского индекса научного цитирования). Следовательно согласие автора на публикацию статьи будет считаться согласием на размещение её электронной копии в электронной библиотеке.

Печатается по постановлению Ученого совета  
Никитского ботанического сада –  
Национального научного центра  
от 17.06.2016 г., протокол № 14

Бюллетень ГНБС

Выпуск 120

Ответственный за выпуск

Шишкин В.А.

Компьютерная верстка

Мякинникова М.Е.

<http://bult.nbgnsr.ru>

Свидетельство о регистрации ПИ № ФС77-61874 от 25.05.2015 г.

---

Формат 210 x 297. Бумага офсетная – 80 г/м<sup>2</sup>.

Печать ризографическая. Уч.-печат. л. 10. Тираж 500 экз. Заказ № 05ДА/34.

Редакция научных изданий  
Никитский ботанический сад –  
Национальный научный центр  
пгт Никита, г. Ялта, Республика Крым, РФ, 298648  
*Телефон:* (0654) 33-56-16  
*E-mail:* [redaknbg@yandex.ru](mailto:redaknbg@yandex.ru)

Отпечатано с оригинал-макета в типографии ФЛП Бражникова Д.А.,  
295034, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Оленчука, 63  
тел. (0652) 70-63-31, +7 978 717 29 01.  
*E-mail:* [braznikov@mail.ru](mailto:braznikov@mail.ru)