

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 Терлецкая¹, Ажар Батырбековна Искакова¹, Наталья Васильевна Зобова², Валентина Юрьевна Ступко², Светлана Юрьевна Луговцова²

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

² 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 ФСII, 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^uA^uBB), *T. aethiopicum* Jakubz. (*T. abyssinicum* Vav.) (A^uA^uBB), *T. compactum* Host. (A^uA^uBBDD), *T. macha* ssp. *densiusculum* Dekapr. et. Menabde. (A^uA^uBBDD), *Triticum aestivum* L. (A^uA^uBBDD) – 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 **a** – 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 **a** 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 (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/м²сек (рис. 3).

По данным динамики скорости транспорта электронов через фотосистему II (СТЭ) каллусов, культивируемых на оптимальной среде, при ФАР 20 мкмоль фотонов/м²с с 1 по 12 сутки культивирования построены линии тренда.

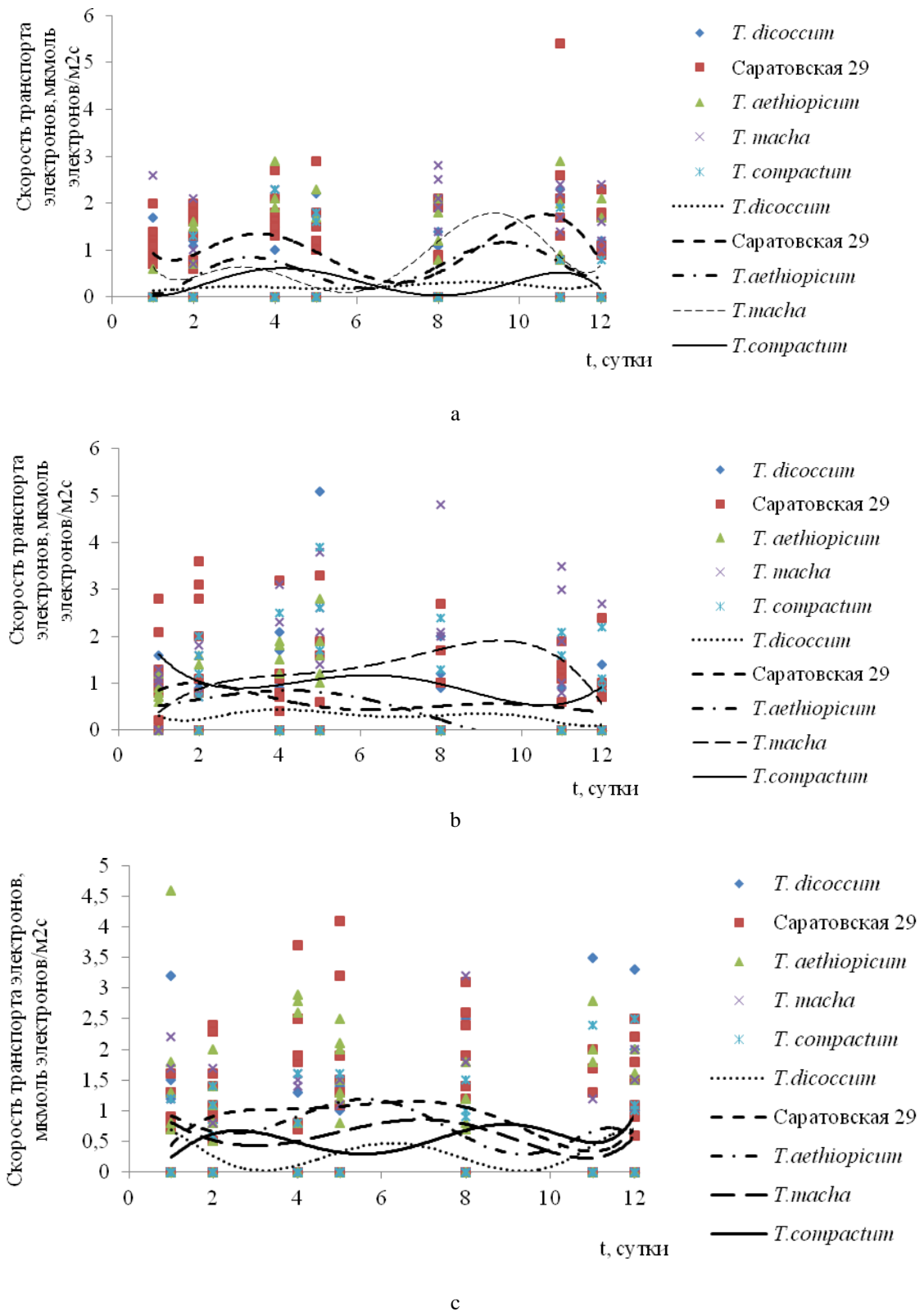
Из рисунка 3а видно, что в первые четверо суток после пассирования на свежую среду пролиферации происходит повышение ФА каллусов. Начиная с пятых суток, СТЭ снижается. Схожие данные получены В.Ю. Ступко с соавторами для генотипов яровой мягкой пшеницы [7]. Однако в настоящем исследовании зафиксированы 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, вкуче 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.

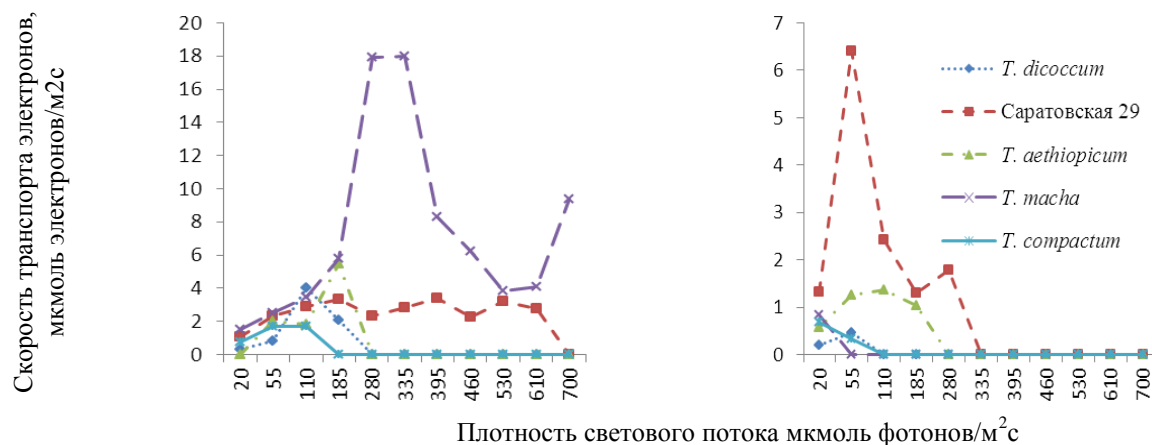


а – контроль, б – солевой стресс (NaCl 0,63%), с – засуха (ПЭГ 16% вес/объем)

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)

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* НОРТ. ЕХ ВАСКЕР 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