

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

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 Backer) – 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 1мм² 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 ± 8 мкм, а у пораженного – 57 ± 6 мкм). Отмечено, что при деградации хлоренхимы первыми разрушаются хлоропласты верхнего слоя палисадной ткани.

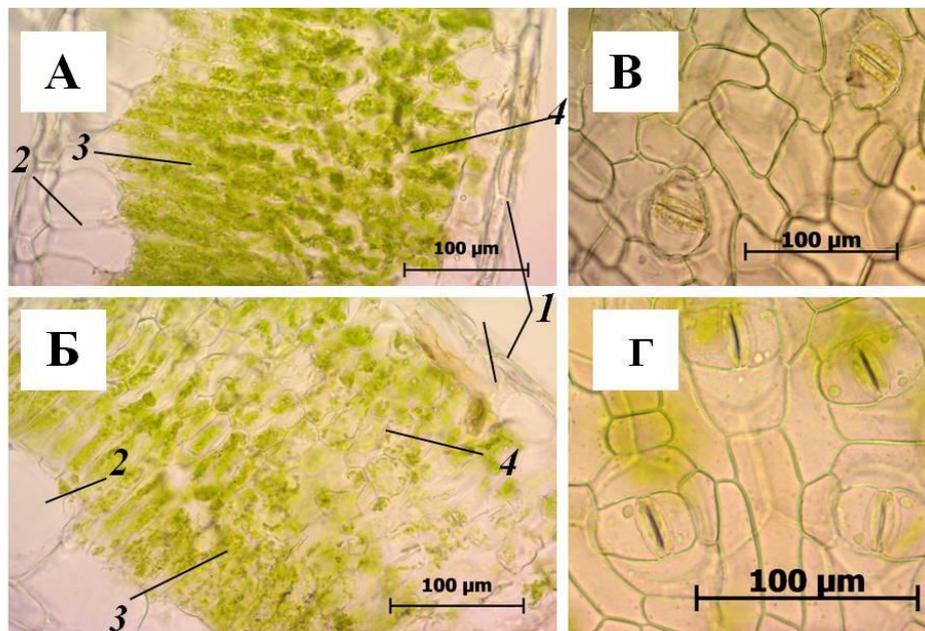


Рис. 2 Структура листовых пластин *Canna × hybrida hort. ex Backer* сорт Президент в условиях закрытого грунта: А – поперечный срез листа без симптомов, Б – с характерными симптомами вирусных заболеваний, В – адаксиальный эпидермис, Г – абаксиальный эпидермис, 1 – покровные ткани, 2 – аэренхима, 3 – 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 40×36 и 44×28 мкм до значений 48×37 и 59×31 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 варибельной

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.

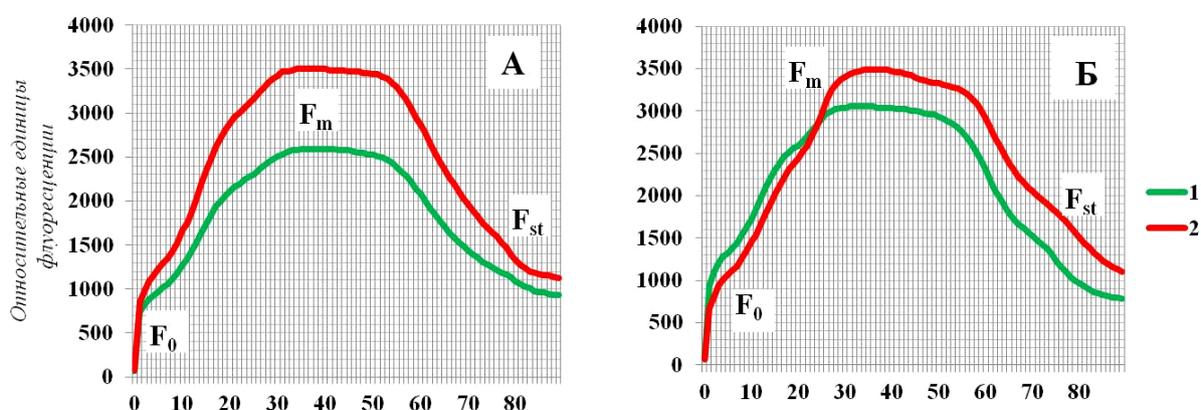


Рис. 3 Кривые индукции флуоресценции хлорофилла листьев *Canna × hybrida hort. ex Backer* в условиях закрытого грунта: А – сорт Президент; Б – сорт Суевия.

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 ₂ /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. Запрометов 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. *Pухтер 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. – В: 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