



БЮЛЛЕТЕНЬ ГНБС

Выпуск 121

Ялта 2016

12+

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НИКИТСКИЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД

БЮЛЛЕТЕНЬ ГНБС

Выпуск 121

Ялта 2016

Редколлегия:

Плугатарь Ю.В. – главный редактор, Багрикова Н.А, Балыкина 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 121

Yalta 2016

Editorial Board:

Plugatar Yu.V. – chief editor, Bagrikova N.A., Balykina E.B., Ilitsky 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

Вирусология

- Закубанский А.В., Чирков С.Н., Митрофанова О.В., Митрофанова И.В.
Вирусы некоторых ценных плодовых, эфиромасличных и декоративных культур
(обзор)..... 7

Репродуктивная биология

- Шевченко С.В., Кузьмина Т.Н., Митрофанова И.В.
Характеристика пыльцы пораженных вирусами и бессимптомных растений розы
эфиромасличной..... 18

Биохимия растений

- Полякова Л.В., Литвиненко В.И.
Биохимическое разнообразие полусибирского потомства деревьев дуба черешчатого
как источник отбора генотипов для микроклонирования..... 24

Физиология растений

- Палий А.Е., Гребенникова О.А., Губанова Т.Б., Палий И.Н.
Изменение физиолого-биохимических параметров у некоторых сортов *Olea
europaea L.* с различной морозоустойчивостью..... 32
- Белоус О.Г., Маляровская В.И.
Оценка адаптивности красивоцветущих растений к стресс-факторам субтропиков
России..... 39

Биотехнология растений

- Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Долгов С.В.
Особенности регенерации микропобегов некоторых сортов персика в условиях *in vitro*
Тевфик А.Ш., Митрофанова И.В.
Некоторые особенности культивирования *in vitro* и *in vivo* семян и изолированных
зародышей *Canna × hybrida Hort.* Ex Backer..... 56
- Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Никифоров А.Р., Лесникова-Седошенко
Н.П., Иванова Н.Н., Челомбит С.В., Жданова И.В.
Особенности введения в условия *in vitro* некоторых реликтовых эндемиков флоры
горного Крыма..... 62
- Ромаданова Н.В., Мишустина С.А., Карашолакова Л.Н., Аралбаева М.М.,
Рахимбаев И.Р., Кушнаренко С.В.
Создание коллекции *in vitro* дикорастущих видов *Berberis sp.*..... 69
- Правила для авторов**..... 77

CONTENTS

Virology

- Zakubansky A.V., Chirkov S.N., Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V.
Viruses of some valuable fruits, essential oil and ornamental plants (Overview)..... 7

Reproductive Biology

- Shevchenko S.V., Kuzmina T.N., Mitrofanova I.V.
Pollen characteristics of infected and asymptomatic plants of essential oil rose..... 18

Plant Biochemistry

- Polyakova L.V., Litvinenko V.I.
Biochemical diversity of half-sib progeny of *Quercus robur* trees as genotypes for microcloning..... 24

Plant Physiology

- Paliy A.Ye., Grebennikova O.A., Gubanova T.B., Paliy I.N.
Variations of physiological and biochemical parameters of some *Olea europea* L. cultivars with different frost-resistance level..... 32
- Belous O.G., Malyarovskaya V.I.
Adaptability rate of the ornamental shrubs to stress factors of Russia subtropics..... 39

Plant Biotechnology

- Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Dolgov S.V.
Feature of some peach cultivars microshoots regeneration *in vitro*..... 48
- Tevfik A.Sh., Mitrofanova I.V.
Some special features of seeds and isolated embryos cultivation *in vitro* and *in vivo* of *Canna × hybrida hort.* ex Backer..... 56
- Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Nikiforov A.R., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Ivanova N.N., Chelombit S.V., Zhdanova I.V.
Special features of *in vitro* introduction of some relict endemic species from Mountain Crimea flora..... 62
- Romadanova N.V., Mishustina S.A., Karasholakova L.N., Aralbayeva M.M., Rakhimbayev I.R., Kushnarenko S.V.
In vitro collection of wild *Berberis* species..... 69
- Rules for the authors**..... 77

УДК 634.2+633.8+635.9:578.85/86

**ВИРУСЫ НЕКОТОРЫХ ЦЕННЫХ ПЛОДОВЫХ, ЭФИРОМАСЛИЧНЫХ И
ДЕКОРАТИВНЫХ КУЛЬТУР (ОБЗОР)****Александр Владимирович Закубанский², Сергей Николаевич Чирков^{1,2},
Ольга Владимировна Митрофанова¹, Ирина Вячеславовна Митрофанова¹**

¹ Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Россия, г. Ялта, пгт Никита, ул. Никитский спуск, 52
irimitrofanova@yandex.ru

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Биологический факультет МГУ, 119234, Россия, г. Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12
s-chirkov1@yandex.ru

Коллекции Никитского ботанического сада (ФГБУН «НБС-ННЦ») насчитывают тысячи видов, сортов и гибридных форм плодовых, цветочно-декоративных и эфиромасличных культур. Отсутствие вирусных инфекций является необходимой предпосылкой для сохранения растительного генофонда в интродукционно-селекционных научных центрах и получения новых высокопродуктивных сортов и форм методами классической и молекулярной селекции, биотехнологии и биоинженерии. На персике, абрикосе, хурме, инжире, розе, лаванде, лавандине, канне, клематисе и хризантеме описано свыше сотни вирусов различных таксономических групп. Для косточковых плодовых культур наиболее патогенными являются потивирус оспы (шарки) сливы, иларвирусы и неповирусы. Основным возбудителем мозаичной болезни инжира – одного из наиболее вредоносных заболеваний этой культуры – является эмаравирус мозаики инжира из семейства *Bunyaviridae*. На хурме обнаружено пока всего четыре вируса из семейств *Rhabdoviridae*, *Partitiviridae* и *Virgaviridae*. На розе чаще других встречаются иларвирусы и неповирусы. Такие распространенные болезни розы, как мозаика, курчавость листьев, розеточность, также имеют вирусную природу. Свыше двадцати вирусов обнаружено на хризантеме. Наиболее важными считаются такие распространенные по всему миру и отличающиеся широким кругом растений-хозяев РНК-содержащие вирусы, как вирус аспермии томатов и вирус огуречной мозаики (сем. *Bromoviridae*), хризантемный карлавирус В (сем. *Betaflexiviridae*), вирус табачной мозаики (сем. *Virgaviridae*) и вирус Y картофеля (сем. *Potyviridae*). На канне повсеместно распространены вирусы желтой мозаики фасоли и желтой полосатости канны (сем. *Potyviridae*) и каулимовирус желтой крапчатости канны. Вирус огуречной мозаики и вирус мозаики люцерны описаны на лаванде и лавандине. Многообразии патогенов вирусной природы и путей распространения от растения к растению (при вегетативном размножении, механически, насекомыми-переносчиками, нередко пылью и через семена) существенно осложняют диагностику и контроль за их распространением.

Ключевые слова: вирусы растений; персик; абрикос; хурма; инжир; роза; лаванда; лавандин; канна; клематис; хризантема.

Сокращенные названия наиболее часто упоминаемых вирусов: AMV - alfalfa mosaic virus; ApMV - apple mosaic virus; CMV - cucumber mosaic virus; CVB - chrysanthemum virus B; FMV - fig mosaic virus; INSV - impatiens necrotic spot virus; PDV - prune dwarf virus; PeCV - persimmon cryptic virus; PeVA - persimmon virus A; PNRSV - prunus necrotic ringspot virus; PPV - plum pox virus; TAV - tomato aspermy virus; TBRV - tomato black ring virus; TMV - tobacco mosaic virus; TobRV - tobacco rattle virus; TSWV - tomato spotted wilt virus.

Введение

Коллекции Никитского ботанического сада (ФГБУН «НБС-ННЦ») насчитывают тысячи эндемичных и интродуцированных видов, сортов и гибридных форм плодовых, декоративных и эфиромасличных культур. Сохранение растительного генофонда ФГБУН «НБС-ННЦ», разработка способов получения высокопродуктивных сортов и форм методами классической и молекулярной селекции, биотехнологии и биоинженерии особенно актуальны для таких культур, как персик и абрикос, инжир, хурма, роза садовая и эфиромасличная, лаванда и лавандин, канна, клематис и хризантема. Вирусные инфекции наносят серьезный ущерб и могут препятствовать использованию зараженных растений в традиционном размножении, селекционной работе и в биотехнологических исследованиях. В данном обзоре кратко охарактеризованы важнейшие вирусы, обнаруженные в разные годы на упомянутых культурах и которыми, потенциально, могут быть заражены растения, произрастающие на территории ФГБУН «НБС-ННЦ».

Персик (*Prunus persica* L.) и **абрикос** (*P. armeniaca* L.), как и другие плодовые культуры рода *Prunus* (сем. Rosaceae), подвержены влиянию многочисленных вирусов. Самым вредоносным считается вирус оспы сливы (*Plum pox virus*, PPV, род *Potyvirus*, сем. *Potyviridae*), который вызывает у косточковых культур заболевание, называемое шаркой. Это заболевание приводит к значительным потерям урожая из-за преждевременного массового (до 100%) опадания плодов и ухудшения их качества. На восприимчивых сортах инфекция может угнетать годичный прирост. Ежегодный ущерб от шарки в основных регионах возделывания персика, абрикоса и сливы оценивают в сотни миллионов евро, а количество уничтоженных зараженных деревьев исчисляется миллионами. От растения к растению вирус может передаваться при вегетативном размножении и различными видами тли. На дальние расстояния PPV распространяется главным образом с зараженными растениями. Заболевание известно во всем мире, за исключением Австралии, Новой Зеландии, Южной Африки и Калифорнии [24]. PPV был обнаружен в НБС-ННЦ в насаждениях персика, нектарина, сливы и алычи [46]. Также, на персике и абрикосе повсеместно распространены иларвирусы: American plum line pattern virus, Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV), Apple mosaic virus (ApMV), Prune dwarf virus (PDV) (род *Illavirus*, сем. *Bromoviridae*) [61]. Они замедляют рост плодов и их созревание, ослабляют морозостойкость зараженных деревьев и приживаемость прививок, могут значительно (на десятки процентов) снижать урожайность. PNRSV и PDV переносятся пылью, что может способствовать их быстрому распространению в насаждениях косточковых культур. Кроме того, известно свыше тридцати РНК-содержащих вирусов, заражающих персик и абрикос, которые относятся к родам *Ampelovirus* (Plum bark necrosis and stem pitting-associated virus), *Capillovirus* (Cherry virus A), *Cheravirus* (Cherry rasp leaf virus), *Foveavirus* (Apricot latent virus, Asian prunus virus 1, 2, 3, Cherry green ring mottle virus, Cherry necrotic rusty mottle virus, Peach chlorotic mottle virus), *Nepovirus* (Tomato ringspot virus, Tomato black ring virus (TBRV), Myrobalan latent leafspot virus, Peach rosette mosaic virus, Arabis mosaic virus, Cherry leafroll virus), *Sadwavirus* (Strawberry latent ringspot virus), *Trichovirus* (Apple chlorotic leaf spot virus, Cherry mottle leaf virus, Peach mosaic virus, Apricot pseudo chlorotic leafspot virus), принадлежащих к семействам *Closteroviridae*, *Secoviridae* и *Betaflexiviridae* [40]. Они индуцируют широкий спектр симптомов на листьях, цветках и плодах зараженных растений и могут заметно снижать урожайность и качество плодов [3].

Инжир (*Ficus carica* L., сем. Moraceae) – древнейшее культурное растение, особенно широко распространенное в Средиземноморском бассейне, Закавказье, Южном берегу Крыма и на Аравийском полуострове. Одним из наиболее вредоносных

заболеваний инжира является мозаика листьев, впервые описанная в 1933 году в Калифорнии [12], а ныне обнаруженная во всех регионах его возделывания. Симптомы зависят от сорта и места произрастания растения и существенно варьируют от мозаики и кольцевой пятнистости на листьях и плодах зараженных растений до деформации листьев и раннего опадания плодов. Обнаружена прямая зависимость между степенью проявления симптомов и снижением урожайности [78, 81]. В 1955 году было высказано предположение, что это заболевание имеет вирусную этиологию в связи с возможной передачей инфекции вегетативно и галловыми клещами *Aceria ficus* [22]. Основным возбудителем мозаичной болезни является, по-видимому, вирус мозаики инжира (Fig mosaic virus, FMV) из рода *Emaravirus* (сем. *Bunyaviridae*) [15, 16, 70, 81]. Помимо FMV, известно больше десятка вирусов, заражающих инжир, которые нередко совместно инфицируют одно и то же растение. Большинство из них являются нитевидными (+)РНК-содержащими вирусами, относящимися к семействам *Betaflexiviridae* (Fig virus S, род *Carlavirus*; Fig latent virus 1, род *Trichovirus*) [25], *Closteroviridae* (Fig leaf mottle-associated viruses 1, 3; Fig mild mottle-associated virus; Arkansas fig virus 1, 2 из рода *Closterovirus*; Fig leaf mottle-associated virus 2, род *Ampelovirus*) [13, 14, 17, 78], *Potyviridae* (Fig leaf chlorosis virus, род *Potyvirus*) [78], и *Tymoviridae* (Fig fleck-associated virus, род *Maculavirus*) [18]. Кроме того, на инжире обнаружен вирус с сегментированным геномом, представленным двунитевой РНК (Fig scryptic virus, род *Deltapartitivirus*, сем. *Partitiviridae*) [19]. Широкое распространение этих вирусов на растениях инжира с симптомами мозаики в странах Старого и Нового Света свидетельствует об их возможной роли в этиологии мозаичной болезни [8]. Вариабельность симптомов мозаики может быть обусловлена синергическим взаимодействием нескольких вирусов при смешанной инфекции [78].

Хурма (род *Diospyros*, сем. *Ebenaceae*) ведет свое происхождение из восточной Азии. Изначально это растение выращивали преимущественно в Китае, Японии и Корее, где были выведены многочисленные местные сорта. В настоящее время род включает сотни видов, плодовые формы которых возделываются в странах Евразии, Америки и Австралии. Первые данные о заболеваниях хурмы восточной (*D. kaki* Thunb.), которые могли иметь вирусное происхождение, были получены в конце XX века в Японии при исследовании болезни верхушки плодов (graft-transmissible fruit apex disorder). Болезнь характеризовалась некротизацией флоэмы под кожицей плода и переносилась прививками. С помощью метатранскриптомного секвенирования в растениях с симптомами верхушечной болезни удалось выявить Persimmon virus A (PeVA, сем. *Rhabdoviridae*) и неклассифицированный Persimmon latent virus, содержащий двунитевую РНК [29]. Вскоре PeVA был обнаружен на *D. kaki* в Италии [55]. Связь между заражением хурмы упомянутыми вирусами и симптомами заболевания не установлена. В Италии же на *D. kaki* с симптомами некроза жилок методом секвенирования нового поколения был выявлен Persimmon scryptic virus (PeCV, род *Deltapartitivirus*, сем. *Partitiviridae*) [56]. Для криптических вирусов характерны передача семенами и латентное протекание инфекции. Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией PeCV был выявлен во многих бессимптомных растениях хурмы, что, возможно, свидетельствует об его широком распространении в латентной форме. В Египте на деревьях хурмы с симптомами окаймления жилок, скручивания листьев и задержки роста был обнаружен вирус погрелковости табака (Tobacco rattle virus, TobRV, род *Tobravirus*, сем. *Virgaviridae*) [86].

Хризантема (род *Chrysanthemum* L., сем. *Asteraceae*) является одним из самых популярных декоративных растений во всем мире. В настоящее время род включает десятки видов и множество сортов. Крупноцветковые формы хризантемы относятся к виду *C. morifolium* Ramat., ведущим свое происхождение из Китая или Японии. Многочисленные сорта мелкоцветковых хризантем созданы, по-видимому, с участием *C.*

indicum L. Международный рынок садовых и комнатных сортов хризантемы постоянно расширяется. Кроме того, хризантему используют в медицине и для производства инсектицидов. В результате вирусных и виroidных инфекций этой культуры теряется до трети зараженных растений [1, 87]. К настоящему времени на хризантеме идентифицировано около двадцати вирусов. Наиболее вредоносными являются такие распространенные по всему миру и отличающиеся широким кругом растений-хозяев РНК-содержащие вирусы, как Tomato aspermy virus (TAV) и Cucumber mosaic virus (CMV) из рода *Cucumovirus* (сем. *Bromoviridae*), Chrysanthemum virus B (CVB, род *Carlavirus*, сем. *Betaflexiviridae*), Tobacco mosaic virus (TMV, род *Tobamovirus*, сем. *Virgaviridae*) и Potato virus Y (PVY, род *Potyvirus*, сем. *Potyviridae*) [11, 74, 79, 87]. Кукумовирусы вызывают желтую мозаику, карликовость растений, уменьшают количество соцветий у садовой хризантемы и вызывают их деформацию [34, 64]. Симптомы заражения CVB варьируют от крапчатости листьев или посветления жилок до ярко выраженной мозаики и деформации соцветий, хотя бывают и бессимптомные инфекции. CVB распространяется различными видами тли и отличается высоким генетическим разнообразием [60, 72]. У растений хризантемы, зараженных PVY штамма Wilga, развиваются пятнистость и пожелтение листьев [37]. TMV вызывает мозаику, крапчатость и обесцвечивание лепестков [58]. Другие вирусы, обнаруженные на хризантеме, относятся к семействам *Potyviridae* (Turnip mosaic virus, Zucchini yellow mosaic virus, Chrysanthemum spot virus, Soybean mosaic virus из рода *Potyvirus*) [4, 5, 21, 44, 59] и *Bunyaviridae* (Chrysanthemum stem necrosis virus, Tomato spotted wilt virus (TSWV), Impatiens necrotic spot virus (INSV) из рода *Tospovirus*) [20, 33, 84]. Потивирусы могут переноситься тлями, а тосповирусы – трипсами. Вирусы этих двух групп отличаются широким кругом хозяев и высокой патогенностью для многих экономически значимых культур. Наличие эффективных переносчиков обуславливает высокую вероятность формирования устойчивых природных очагов и переноса этих вирусов с хризантемы на соседние сельскохозяйственные культуры и наоборот. Хризантема также восприимчива к таким вирусам, как Potato virus X (род *Potexvirus*; сем. *Alphaflexiviridae*) [11], Chrysanthemum vein chlorosis virus (род *Nucleorhabdovirus*, сем. *Rhabdoviridae*) [31]; Oat blue dwarf virus (род *Marafivirus*, сем. *Tymoviridae*) [82], и Chrysanthemum indicum yellow vein Delhi virus (род *Begomovirus*, сем. *Geminiviridae*) [43].

Роза (род *Rosa* L., сем. *Rosaceae*) является важнейшей декоративной, эфиромасличной и технической культурой. Вирусные инфекции могут существенно ослаблять растения, снижать качество бутонов, урожайность и способность черенков к укоренению [1, 27, 45]. Они снижают выход и качество розового масла и других продуктов, получаемых из лепестков эфиромасличных сортов роз [85]. Из более чем двадцати вирусов, обнаруженных на розе, большинство относится к родам *Iarvirus* (сем. *Bromoviridae*) и *Nepovirus* (сем. *Secoviridae*). Из иларвирусов наиболее распространен PNRSV [57]. ArMV был найден главным образом в Австралии, Новой Зеландии, США и Турции [63, 85]. Совместно эти иларвирусы вызывают мозаику розы – одно из наиболее распространенных вирусных заболеваний этой культуры. На листьях зараженных растений появляется светло-зеленая или желтая крапчатость, кольцевая или напоминающую по форме лист дуба или сеть пятнистость, наблюдается деформация листьев. Еще два иларвируса – Tobacco streak virus и Blackberry chlorotic ringspot virus – были обнаружены на розе в США [23, 77]. Из неповирусов чаще других встречаются Arabis mosaic virus, Strawberry latent ringspot virus, Tobacco ringspot virus и Tomato ringspot virus [69]. В Иране были выявлены вирусы из рода *Tospovirus* (сем. *Bunyaviridae*) – INSV и TSWV [71], а в Пакистане – Rose leaf curl virus (род *Begomovirus*, сем. *Geminiviridae*), который считается возбудителем курчавости листьев розы *R. chinensis* [30]. Rose yellow vein virus был идентифицирован как возбудитель пожелтения жилок роз. На основании анализа полной последовательности генома этот вирус отнесен к семейству *Caulimoviridae* [47]. Розеточную болезнь – одно из самых

тяжелых заболеваний *R. multiflora* – вызывает, по-видимому, Rose rosette virus из рода *Emaravirus* [36]. В США и Чили обнаружен Rose spring dwarf-associated virus из рода *Luteovirus* (сем. *Luteoviridae*) [67, 69]. В последние годы на различных сортах розы были выявлены и охарактеризованы Rose cryptic virus-1 (синонимы: Rose multiflora cryptic virus и Rose transient mosaic virus) из рода *Alphacryptovirus* (сем. *Partitiviridae*) [38, 41, 68]; Rose yellow mosaic virus, который предположительно является представителем нового рода семейства *Potyviridae*; *Rosa rugosa* leaf distortion virus и Rose yellow leaf virus, относящиеся, видимо, к семейству *Tombusviridae* [48-50, 52]. Вирусы розы могут передаваться вегетативно, семенами, пыльцой, механически или с помощью векторов, что серьезно осложняет контроль за вирусными инфекциями этой культуры.

Канна (род *Canna* L., сем. *Cannaceae*) – многолетнее декоративное растение родом из Центральной и Южной Америки с зелеными, бордовыми, фиолетовыми, красными или пестрыми листьями. Большинство сортов канны созданы на основе межвидовых гибридов *C. indica*, *C. flaccida*, *C. edulis*, *C. iridiflora* и *C. glauca*. Известно пять вирусов, способных заражать канну. Чаще всего на различных сортах обнаруживают Bean yellow mosaic virus и *Canna yellow streak virus* из рода *Potyvirus* (сем. *Potyviridae*), а также *Canna yellow mottle virus* (род *Badnavirus*, сем. *Caulimoviridae*). Значительно реже встречаются CMV и TAV [53, 54, 65, 83]. Эти вирусы обнаружены в насаждениях открытого грунта, питомниках и тепличных коллекциях канны в Великобритании, Италии, Индии, Нидерландах, Японии и США. Симптомами вирусных болезней являются некротизация жилок, желтая мозаика, полосатость, крапчатость и обесцвечивание листьев, что существенно ухудшает декоративные свойства этих растений. Канну размножают преимущественно делением корневищ, что, в сочетании с широким международным обменом посадочным материалом, способствует быстрому распространению вирусных заболеваний. Стоимость отдельных экземпляров канны достигает 30 €, поэтому потенциальный экономический ущерб от вирусных инфекций может быть очень высоким. Симптомы могут значительно варьировать в зависимости от сорта и маскироваться в сортах с темной окраской листьев. Кроме того, для канны обычны смешанные инфекции двумя - тремя вирусами различных таксономических групп [10, 35, 65], что также осложняет визуальную идентификацию возбудителя.

К роду **Клематис** (*Clematis* Dill. ex L., сем. *Ranunculaceae*) относятся многолетние вьющиеся растения, произрастающие в умеренном климате и являющиеся популярными цветочно-декоративными культурами. Всего на клематисе найдено около десяти различных вирусов, большинство из которых, однако, не охарактеризованы молекулярно-биологическими методами. В Великобритании на *C. afoliata* Buchanan, *C. paniculata* J.F.Gmel. и *C. flammula* L. были обнаружены TobRV, CMV и Tomato bushy stunt virus (род *Tombusvirus*, сем. *Tombusviridae*) [7]. В Новой Зеландии на дикорастущих растениях *C. paniculata* найдены CMV [28] и неидентифицированный вирус, вызывающий симптомы хлоротической и кольцевой пятнистости [76]. На территории бывшей Югославии выявлен иларвирус Tobacco streak virus, вызывающий на клематисе виноградолистном (*C. vitalba* L.) хлоротическую пятнистость и желтую сетчатость на листьях. Была показана способность этого вируса распространяться пыльцой и семенами [66]. Еще один иларвирус, ArMV, был диагностирован в бессимптомных растениях *C. vitalba* в Турции [2]. В Греции на *C. flammula* и *C. vitalba* обнаружен TSWV, по-видимому, занесенный трипсами с плантаций табака, зараженного этим вирусом [9]. Многочисленные изоляты TBRV были найдены в Литве на цветочно-декоративных культурах и растениях, используемых в пищевых целях, в том числе на клематисе [73]. На листьях зараженных растений наблюдались хлоротическая и некротическая кольцевая пятнистость, крапчатость и деформации.

Филогенетический анализ гена белка оболочки показал, что изолят из клематиса родственен изолятам TBRV, найденным на хосте и фиалке. В США на разных видах и сортах клематиса с симптомами желтой крапчатости и пожелтения жилок, хлоротической кольцевой пятнистости, линейной мозаики, деформации и обесцвечивания лепестков методами просвечивающей электронной микроскопии и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией был выявлен новый вирус хлоротической крапчатости клематиса (*Clematis chlorotic mottle virus*) [51]. На основании данных полногеномного секвенирования предполагается, что он может являться представителем нового рода семейства *Tombusviridae*.

Лаванда (род *Lavandula*, сем. *Lamiaceae*) – одна из важнейших эфиромасличных культур, возделываемых преимущественно в Средиземноморье, в Крыму, в северной и восточной Африке, в ряде регионов Азии, Австралии и США. Получаемое из нее эфирное масло широко применяется в ароматерапии, фармакологии, парфюмерии и косметологии. Кроме того, лаванда является популярным декоративным растением, выращиваемым для украшения садовых участков и ландшафтов по всему миру [75]. Наиболее распространенным заболеванием лаванды и лавандина (*L. hybrida* Rev.) является желтая мозаика, вызываемая вирусом мозаики люцерны (*Alfalfa mosaic virus*, AMV, род *Alfavirus*, сем. *Bromoviridae*). AMV был обнаружен во Франции, Италии и Хорватии на *L. hybrida* [26, 39, 80] и *L. stoechas* L. [62], в Испании на *L. officinalis* Chaix ex Vill. [42]. Для зараженных растений характерны желтая пятнистость на листьях и стеблях, желтая крапчатость, светло-желтая мозаика, скручивание листьев и укорочение междоузлий (карликовость). Вирусная инфекция, по-видимому, не влияет на количество, размер или окраску цветков, однако снижает качество лавандового масла вследствие изменения концентрации одного из его основных компонентов [6]. В Польше в декоративных насаждениях лаванды узколистной (*L. angustifolia*) на растениях с симптомами желтой крапчатости и деформированными листьями был обнаружен CMV [32]. Лаванда – многолетнее растение и может служить резервуаром AMV и CMV, которые отличаются исключительно широким кругом хозяев и способны заражать многие экономически значимые культурные растения.

Заключение

Около сотни вирусов из различных таксономических групп описано в настоящее время на косточковых плодовых культурах, инжире, хурме, розе, лаванде, клематисе, канне и хризантеме. Многие из них высоко патогенны для упомянутых культур и могут оказывать крайне негативное влияние на рост и развитие зараженных растений, урожайность, качество плодов, декоративные свойства и получение продуктов вторичного метаболизма, используемых человеком. Смешанные инфекции различными вирусами обычно усиливают вредоносность каждого из них. Практически все эти вирусы передаются от растения к растению при вегетативном размножении; большинство – насекомыми-переносчиками, а некоторые – пылью и семенами. Многие вирусы отличаются исключительно широким кругом растений-хозяев (AMV, ArMV, CMV, PNRSV, PVY, TMV, TSWV и ряд других). Заражая растения из различных семейств, они, при наличии эффективных переносчиков, способны быстро распространяться на соседние насаждения различных культур, что серьезно осложняет контроль за их распространением и может приводить к формированию устойчивых природных очагов вирусной инфекции.

Таким образом, задачи сохранения растительного генофонда ФГБУН «НБС-ННЦ» и получения высокопродуктивных сортов и форм методами биотехнологии и биоинженерии могут быть успешно решены лишь при условии постоянного мониторинга вирусных патогенов, широкого применения эффективных методов

диагностики вирусов с целью отбора безвирусных растений в условиях *in situ* и *ex situ*, и вирусологического контроля на всех последующих этапах оздоровления и регенерации в условиях *in vitro*, адаптации и развития растений *ex vitro* и *in vivo*.

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

Список литературы

1. Митрофанова О.В. Вирусные болезни промышленных цветочных культур и биотехнологические приемы оздоровления. – М., 1992. – Деп. В ВИНИТИ, № 1729-В92 от 25.05.92. – 206 с.
2. Arli Sokmen M., Kutluk Yilmaz N.D., Mennan H., Sevik M.A. Natural weed hosts of Apple mosaic virus in hazelnut orchards in Turkey // J. Plant Pathol. – 2005. – Vol. 87, N 3. – P. 239-242.
3. Barba M., Ilardi V., Pasquini G. Control of pome and stone fruit virus diseases // Adv. Virus Res. – 2015. – Vol. 91. – P. 47-83.
4. Bellardi M.G., Marani F., Bertaccini A. Detection of soybean mosaic virus (SMV) in *Chrysanthemum frutescens* // Phytopathol. Mediterr. – 1993. – Vol. 32, N 2. – P. 156-158.
5. Bertaccini A., Bellardi M.G., Marani F., Rabiti A. A potyvirus infecting *Chrysanthemum frutescens* // Acta Hort. – 1992. – N 377. – P. 107-114.
6. Bruni R., Bellardi M.G., Parrella G., Bianchi A. Impact of alfalfa mosaic virus subgroup I and II isolates on terpene secondary metabolism of *Lavandula vera* D.C., *Lavandula alardii* and eight cultivars of *L. hybrida* Rev. // Physiol. Mol. Plant Pathol. – 2006. – Vol. 68, N 4-6. – P. 189-197.
7. Brunt A.A. The production and distribution of virus-tested ornamental bulb crops in England: Principles practice and prognosis // Acta Hort. – 1985. – Vol. 164. – P. 153-162.
8. Castellano M.A., Gattoni G., Minafra A., Conti M., Martelli G.P. Fig mosaic in Mexico and South Africa // J. Plant Pathol. – 2007. – Vol. 89, N 3. – P. 441-444.
9. Chatzivassiliou E.K., Boubourakas I., Drossos E., Eleftherohorinos I., Jenser G., Peters D., Katis N.I. Weeds in greenhouses and tobacco fields are differentially infected by Tomato spotted wilt virus and infested by its vector species // Plant Dis. – 2001. – Vol. 85, N 1. – P. 40-46.
10. Chauhan R.P., Hamon H.F., Rajakaruna P., Webb M.A., Payton M., Verchot J. Reliable detection for Bean yellow mosaic virus, Canna yellow streak virus, and Canna yellow mottle virus in canna varieties with red foliage // Plant Dis. – 2015. – Vol. 99, N 2. – P. 188-194.
11. Choi H., Jo Y., Lian S., Jo K.M., Chu H., Yoon J.Y., Choi S.K., Kim K.H., Cho W.K. Comparative analysis of chrysanthemum transcriptome in response to three RNA viruses: *Cucumber mosaic virus*, *Tomato spotted wilt virus* and *Potato virus X* // Plant Mol. Biol. – 2015. – Vol. 88, N 3. – P. 233-248.
12. Condit I.J., Horne W.T. A mosaic of fig in California // Phytopathology. – 1933. – Vol. 23, N 11. – P. 887-896.
13. Elbeaino T., Digiario M., De Stradis A., Martelli G.P. Partial characterization of a closterovirus associated with achlorotic mottling on fig // J. Plant Pathol. – 2006. – Vol. 88, N 2. – P. 187-192.
14. Elbeaino T., Digiario M., De Stradi A., Martelli G.P. Identification of a second member of the family *Closteroviridae* in mosaic disease figs // J. Plant Pathol. – 2007. – Vol. 89, N 1. – P. 119-124.

15. Elbeaino T., Digiario M., Alabdullah A., De Stradis A., Minafra A., Mielke N., Castellano M.A., Martelli G.P. A multipartite single-stranded negative-sense RNA virus is the putative agent of fig mosaic disease // J. Gen. Virol. – 2009a. – Vol. 90, Pt. 5. – P. 1281-1288.
16. Elbeaino T., Digiario M., Martelli G.P. Complete nucleotide sequence of four RNA segments of fig mosaic virus // Arch. Virol. – 2009b. – Vol. 154, N 11. – P. 1719-1727.
17. Elbeaino T., Heinoun K., Digiario M., Martelli G.P. Fig mild mottle-associated virus, a novel closterovirus infecting fig // J. Plant Pathol. – 2010. – Vol. 92, N 1. – P. 165-172.
18. Elbeaino T., Abou Kubaa R., Digiario M., Minafra A., Martelli G.P. The complete nucleotide sequence and genome organization of fig cryptic virus, a novel bipartite dsRNA virus infecting fig, widely distributed in the Mediterranean basin // Virus Genes. – 2011a. – Vol. 42, N 3. – P. 415-421.
19. Elbeaino T., Digiario M., Martelli G.P. Complete sequence of Fig fleck-associated virus, a novel member of the family *Tymoviridae* // Virus Res. – 2011b. – Vol. 161, N 2. – P. 198-202.
20. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) Chrysanthemum stem necrosis tospovirus // Bull. OEPP/EPPO Bull. – 2005. – Vol. 35, N 3. – P. 409-412.
21. Farzadfar S., Ohshima K., Pourrahim R., Golnaraghi A.R., Jalali S., Ahoonmanesh A. Occurrence of Turnip mosaic virus on ornamental crops in Iran // Plant Pathol. – 2005. – Vol. 54, N 2. – P. 261.
22. Flock R.A., Wallace J.M. Transmission of fig mosaic by eriophyid mite *Aceria ficus* // Phytopathology. – 1955. – Vol. 45, N 1. – P. 52-54
23. Fulton R.W. A disease of rose caused by tobacco streak virus // Plant Dis. Rep. – 1970. – Vol. 54, N 11. – P. 949-951.
24. García J.A., Glasa M., Cambra M., Candresse T. Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease // Mol. Plant Pathol. – 2014. – Vol. 15, N 3. – P. 226-241.
25. Gattoni G., Minafra A., Castellano M.A., De Stradis A., Boscia D., Elbeaino T., Digiario M., Martelli G.P. Some properties of Fig latent virus 1, a new member of the family *Flexiviridae* // J. Plant Pathol. – 2009. – Vol. 91, N 3. – P. 543-552.
26. Giunchedi, L., de Ferrer, M.M. Un ceppo di virus del mosaico dell'erba medica isolato da *Lavandula latifolia* x *L. officinalis* // Phytopathol. Mediterr. – 1977. – Vol. 11, N 1. – P. 74-76.
27. Golino D.A., Sim S.T., Salem N., Rowhani A. Rooting success of rose cuttings reduced by infection with Apple mosaic virus and Prunus necrotic ringspot virus // Acta Horticult. – 2007. – Vol. 751. – P. 225-228.
28. Guy P.L. Detection of *Cucumber mosaic virus* on *Clematis paniculata* in lowland forest in New Zealand // Australas. Plant Dis. Notes. – 2011. – Vol. 6, N 1. – P. 20-21.
29. Ito T., Suzaki K., Nakano M. Genetic characterization of novel putative rhabdovirus and dsRNA virus from Japanese persimmon // J. Gen. Virol. – 2013. – Vol. 94, Pt. 8. – P. 1917-1921.
30. Khatri S., Nahid N., Fauquet C.M., Mubin M., Nawaz-ul-Rehman M.S. A betasatellite-dependent begomovirus infects ornamental rose: characterization of begomovirus infecting rose in Pakistan // Virus Genes. – 2014. – Vol. 49, N 1. – P. 124-131.
31. Kitajima E.W., Costa A.S. Rhabdovirus-like particles in tissues of five different plant species // Fitopatol. Bras. – 1979. – Vol. 4, N 1. – P. 55-62.
32. Kobyłko T., Dańda P., Hasiów B., Borodynko N., Pospieszny H. First report of *Cucumber mosaic virus* on *Lavandula angustifolia* in Poland // Plant Dis. – 2008. – Vol. 92, N 6. – P. 978.

33. Kondo T., Yamashita K., Sugiyama S. First report of *Impatiens necrotic spot virus* infecting chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) in Japan // J. Gen. Plant Pathol. – 2011. – Vol. 77, N 4. – P. 263-265.
34. Kumar S., Khan M.S., Raj S.K., Sharma A.K. Elimination of mixed infection of *Cucumber mosaic* and *Tomato aspermy virus* from *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Pooja by shoot meristem culture // Sci. Hortic. – 2009. – Vol. 119, N 2. – P. 108-112.
35. Kumari A., Raj R., Kumar S., Chauhan P.S., Raj S.K. Coexistence of three virus genera (*Badnavirus*, *Potyvirus* and *Cucumovirus*) in *Canna* species in India // Ann. Virol. Res. – 2016. – Vol. 2, N 1. – P. 1008.
36. Laney A.G., Keller K.E., Martin R.R., Tzanetakis I.E. A discovery 70 years in the making: characterization of the Rose rosette virus // J. Gen. Virol. – 2011. – Vol. 92, Pt. 7. – P. 1727-1732.
37. Liu X.L., Wei Q., Hong B., Zhao X.T. First report of Potato virus Y strain N-Wilga infecting Chrysanthemum in China // Plant Dis. – 2014. – Vol. 98, N 11. – P. 1589-1589.
38. Lockhart B., Zlesak D., Fetzer J. Identification and partial characterization of six new viruses of cultivated roses in the USA // Acta Hortic. – 2011. – N 901. – P. 139-147.
39. Marchoux G., Rougier J. Virus de la mosaïque de la luzerne: isolement à partir du lavandin (*Lavandula hybrida* Rev.) et de l'aubergine (*Solanum melongena* L.) // Ann. Phytopathol. – 1974. – Vol. 6, N 2. – P. 191-196.
40. Martelli G.P., Flores R., Schneider B. Classification of pome and stone fruit viruses, viroids and phytoplasmas. In: Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits / Eds. A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse, W. Jelkmann. – St. Paul, MN: APS Press, 2011. – P. 13-16.
41. Martin R.R., Tzanetakis I.E. First report of *Rosa multiflora* cryptic virus in *Rosa multiflora* in the Eastern United States // Plant Dis. – 2008. – Vol. 92, N 12. – P. 1706.
42. Martinez-Priego L., Cordoba M.G., Jorda C. First report of Aflalfa Mosaic Virus in *Lavandula officinalis* // Plant Dis. – 2004. – Vol. 88, N 8. – P. 908.
43. Marwal A., Sahu A.K., Gaur R.K. First report on the association of a begomovirus with *Chrysanthemum indicum* exhibiting yellowing of leaf vein disease characterized by molecular studies // J. Hort. Res. – 2013. – Vol. 21, N 2. – P. 17-21.
44. Mehra A., Jabeen N., Singh A.K., Hallan V., Zaidi A.A. A new chrysanthemum potyvirus: molecular evidence // Arch. Phytopath. Plant Prot. – 2009. – Vol. 42, N 5. – P. 436-441.
45. Milleza E.J.M., Ward L.I., Delmiglio C., Tang J.Z., Veerakone S., Perez-Egusquiza Z. A survey of viruses infecting *Rosa* spp. in New Zealand // Australas. Plant Pathol. – 2013. – Vol. 42, N 3. – P. 313-320.
46. Mitrofanova I., Mitrofanova O., Chirkov S., Lesnikova-Sedoshenko N., Chelombit S. Detection and identification of plum pox virus on *Prunus* species in Crimea // Agriculture and Forestry. – 2015. – Vol. 61, N 4. – P. 197-204.
47. Mollov D., Lockhart B., Zlesak D.C., Olszewski N. Complete nucleotide sequence of rose yellow vein virus, a member of the family *Caulimoviridae* having a novel genome organization // Arch. Virol. – 2013a. – Vol. 158, N 4. – P. 877-880.
48. Mollov D., Lockhart B., Zlesak D. Complete nucleotide sequence of rose yellow mosaic virus, a novel member of the family *Potyviridae* // Arch. Virol. – 2013b. – Vol. 158, N 9. – P. 1917-1923.
49. Mollov D., Lockhart B., Zlesak D.C. Complete nucleotide sequence of *Rosa rugosa* leaf distortion virus, a new member of the family *Tombusviridae* // Arch. Virol. – 2013c. – Vol. 158, N 12. – P. 2617-2620.

50. Mollov D., Lockhart B., Zlesak D.C. Complete nucleotide sequence of rose yellow leaf virus, a new member of the family *Tombusviridae* // Arch. Virol. – 2014a. – Vol. 159, N 10. – P. 2795-2798.
51. Mollov D., Lockhart B., Phibbs A., Creswell T., Ruhl G., Dorman E., Kinard G., Jordan R. Clematis chlorotic mottle virus, a novel virus occurring in clematis in the USA // Phytopathology. – 2014b. – Vol. 104, N 11. – P. 81-82.
52. Mollov D., Lockhart B., Zlesak D.C. Symptoms, Transmission, and Detection of Four New Rose Viruses // Acta Hort. – 2015. – N 1064. – P. 303-310.
53. Monger W.A., Harju V., Skelton A., Seal S.E., Mumford R.A. Canna yellow streak virus: a new potyvirus associated with severe streaking symptoms in canna // Arch. Virol. – 2007. – Vol. 152, N 8. – P. 1527-1530.
54. Monger W.A., Adams I.P., Glover R.H., Barrett B. The complete genome sequence of *Canna yellow streak virus* // Arch. Virol. – 2010. – Vol. 155, N 9. – P. 1515-1518.
55. Morelli M., Chiumenti M., La Notte P., Minafra A., Martelli G.P. First report of Persimmon virus A in Italy // J. Plant Pathol. – 2014. – Vol. 96, N 3. – P. 603-611.
56. Morelli M., Chiumenti M., De Stradis A., La Notte P., Minafra A. Discovery and molecular characterization of a new cryptovirus dsRNA genome from Japanese persimmon through conventional cloning and high-throughput sequencing // Virus Genes. – 2015. – Vol. 50, N 1. – P. 160-164.
57. Moury B., Cardin L., Onesto J.P., Candresse T., Poupet A. Survey of *Prunus necrotic ringspot virus* in rose and its variability in rose and *Prunus* spp. // Phytopathology. – 2001. – Vol. 91, N 1. – P. 84-91.
58. Nassar E.A., El-Dougdoug K.A., Osman M.E., Dawoud R.A., Kinawy A.H. Characterization and elimination of a TMV isolate infecting *Chrysanthemum* plants in Egypt // Int. J. Virol. – 2012. – Vol. 8, N 1. – P. 14-26.
59. Niu M.E., Chen M.L., Niu Y.B. First report of *Zucchini yellow mosaic virus* in chrysanthemum // Plant Dis. – 2015. – Vol. 99, N 9. – P. 1289.
60. Ohkawa A., Yamada M., Sayama H., Sugiyama N., Okuda S., Natsuaki T. Complete nucleotide sequence of a Japanese isolate of *Chrysanthemum virus B* (genus *Carlavirus*) // Arch. Virol. – 2007. – Vol. 152, N 12. – P. 2253-2258.
61. Pallas V., Aparicio F., Herranz M.C., Amari K., Sanchez-Pina M.A., Myrta A., Sanchez-Navarro J.A. Ilarviruses of *Prunus* spp.: a continued concern for fruit trees // Phytopathology. – 2012. – Vol. 102, N 12. – P. 1108-1120.
62. Parrella G., Acanfora N., Bellardi M.G. First record and complete nucleotide sequence of Alfalfa mosaic virus from *Lavandula stoechas* in Italy // Plant Dis. – 2010. – Vol. 94, N 7. – P. 924.
63. Pearson M.N., Clover G.R.G., Guy P.L., Fletcher J.D., Beever R.E. A review of the plant virus, viroid and mollicute records for New Zealand // Australas. Plant Pathol. – 2006. – Vol. 35, N 2. – P. 217-252.
64. Raj S.K., Kumar S., Choudhari S. Identification of Tomato aspermy virus as the cause of yellow mosaic and flower deformation in chrysanthemums in India // Australas. Plant Dis. Notes. – 2007. – Vol. 2, N 1. – P. 1-2.
65. Rajakaruna P., Shafiekhani M., Kim T., Payton M., Chauhan R., Verchot J. Production of discernable disease phenotypes in *Canna* by five plant viruses belonging to the genera *Potyvirus*, *Cucumovirus*, and *Badnavirus* // Plant Pathol. – 2014. – Vol. 63, N 4. – P. 821-830.
66. Rana G.L., Krajacic M., Stefanac Z., Plese N., Rubino L., Milicic D. Properties of a new strain of tobacco streak virus from *Clematis vitalba* (*Ranunculaceae*) // Ann. Appl. Biol. – 1987. – Vol. 111, N 1. – P. 153-160.

67. Rivera P.A., Engel E.A. Presence of Rose spring dwarf-associated virus in Chile; partial genome sequence and detection in roses and their colonizing aphids // *Virus Genes*. – 2010. – Vol. 41, N 2. – P. 295-297.
68. Sabanadzovic S., Ghanem-Sabanadzovic N.A. Molecular characterization and detection of a tripartite cryptic virus from rose // *J. Plant Pathol.* – 2008. – Vol. 90, N 2. – P. 287-293.
69. Salem N.M., Golino D.A., Falk B.W., Rowhani A. Identification and partial characterization of a new *Luteovirus* associated with rose spring dwarf disease // *Plant Dis.* – 2008. – Vol. 92, N 4. – P. 508-512.
70. Sallam A.A.A., Farag A.G., Elbeshe E.K., El Atta A.K., Sabik S.A. Partial nucleotide sequence of the family *Bunyaviridae* associated with a mosaic-diseased fig in North Egypt // *Int. J. Virol.* – 2015. – Vol. 11, N 2. – P. 77-86.
71. Shahraeen N. Occurrence of *Impatiens necrotic spot virus* in ornamentals in Mahallat and Tehran provinces in Iran // *Plant Dis.* – 2002. – V. 86, №6. – P. 694.1-694.1.
72. Singh L., Hallan V., Jabeen N., Singh A.K., Ram R., Martin D.P., Zaidi A.A. Coat protein gene diversity among *Chrysanthemum virus B* isolates from India // *Arch. Virol.* – Vol. 152, N 2. – P. 405-413.
73. Šneideris D., Staniulis J. Phylogenetic analysis of Lithuanian tomato black ring virus isolates // *Zemdirbyste-Agriculture.* – 2014. – Vol. 101, N 2. – P. 193-198.
74. Song A., You Y., Chen F., Li P., Jiang J., Chen S. A multiplex RT-PCR for rapid and simultaneous detection of viruses and viroids in chrysanthemum // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2012. – Vol. 56. – P. 8-13.
75. Stanković I., Vrandečić K., Čosić J., Milojević K., Bulajić A., Krstić B. The spreading of *Alfalfa mosaic virus* in lavandin in Croatia // *Pestic. Phytomed. (Belgrade).* – 2014. – Vol. 29, N 2. – P. 115-122.
76. Thomson A.D. An unidentified virus-like disease of *Clematis paniculata* // *New Zeal. J. Bot.* – 1978. – Vol. 16, N 1. – P. 167-168.
77. Tzanetakis I.E., Gergerich R.C., Martin R.R. A new *Illarvirus* found in rose // *Plant Pathol.* – 2006. – Vol. 55, N 4. – P. 568.
78. Tzanetakis I.E., Laney A.G., Keller K.E., Martin R.R. New viruses found in fig exhibiting mosaic symptoms // 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kühn-Archiv. – 2010. – N 427. – P. 79-82.
79. Verma N., Sharma A., Ram R., Hallan V., Zaidi A.A., Garg I.D. Detection, identification and incidence of *Chrysanthemum B carlavirus* in chrysanthemum in India // *Crop Prot.* – 2003. – Vol. 22, N 2. – P. 425-429.
80. Vrandečić K., Jurković D., Čosić J., Stanković I., Vučurović A., Bulajić A., Krstić B. First report of *Alfalfa mosaic virus* infecting *Lavandula x intermedia* in Croatia // *Plant Dis.* – 2013. – Vol. 97, N 7. – P. 1002.
81. Walia J.J., Salem N.M., Falk B.W. Partial sequence and survey analysis identify a multipartite, negative-sense RNA virus associated with fig mosaic // *Plant Dis.* – 2009. – Vol. 93, N 1. – P. 4-10.
82. Westdal P.H. Host range studies of oat blue dwarf virus // *Can. J. Bot.* – 1968. – Vol. 46, N 11. – P. 1431-1435.
83. Wylie S.J., Coutts B.A., Jones M.G.K., Jones R.A.C. Phylogenetic analysis of *Bean yellow mosaic virus* isolates from four continents: Relationship between the seven groups found and their hosts and origins // *Plant Dis.* – 2008. – Vol. 92, N 12. – P. 1596-1603.
84. Wu P.R., Chien W.C., Okuda M., Takeshita M., Yeh S.D., Wang Y.C., Chen T.C. Genetic and serological characterization of chrysanthemum stem necrosis virus, a member of the genus *Tospovirus* // *Arch. Virol.* – 2015. – Vol. 160, N 2. – P. 529-536.

85. *Yardimci N., Çulal H.* Occurrence and incidence of Prunus necrotic ringspot virus, Arabis mosaic virus, and Apple mosaic virus on oil rose (*Rosa damascena*) in the Lakes region of Turkey // *New Zealand J. Crop Hortic. Sci.* – 2009. – Vol. 37, N 2. – P. 95-98.

86. *Zein S.N.* Characterization of Tobacco Rattle Tobravirus from Kaki (*Diospyros kaki*) // *Egypt. J. Virol.* – 2004. – Vol. 1, N 1. – P. 187-193.

87. *Zhao X., Liu X., Ge B., Li M., Hong B.* A multiplex RT-PCR for simultaneous detection and identification of five viruses and two viroids infecting chrysanthemum // *Arch. Virol.* – 2015. – Vol. 160, N 5. – P. 1145-1152.

Статья поступила в редакцию 15.08.2016 г.

Zakubansky A.V., Chirkov S.N., Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V. Viruses of some valuable fruits, essential-oil and ornamental plants (Overview) // *Bull. of the State Nikita Botan. Gard.* – 2016. – № 121. – P. 7-18.

Collection of Nikita Botanical Gardens (FSBIS “NBG-NSC”) includes thousands of species, cultivars and hybrid forms of fruits, ornamentals and essential oil plants. If plant genefond is free of virus infections it favors its conservation in introduction and selection scientific centers and breeding new highly productive cultivars and forms applying methods of traditional and molecular selection, biotechnology and bioengineering. More than hundred of viruses referring to different taxonomic groups were recorded and described on peach, apricot, persimmon, fig, rose, lavender, lavandin, canna, clematis and chrysanthemum. Plum pox *potyvirus*, ilarviruses, nepoviruses are the most pathogenic for stone crops. The principal *calico* agents of fig, one of the most harmful diseases of this crop is fig mosaic emaravirus, family *Bunyaviridae*. For a while 4 viruses were revealed on the persimmon from *Rhabdoviridae*, *Partitiviridae* and *Virgaviridae* families. Iarviruses and nepoviruses are often found on rose plants. Such frequent rose diseases as mosaic, leaf-curl mosaic, rosette have virus origin. Over twenty viruses were registered on chrysanthemum plants. The most important and popular all over the world with a wide range of plants-hosts RNA bearing viruses are tomato aspermy virus and a cucumber mosaic virus (family *Bromoviridae*), chrysanthemum carlavirus B (family *Betaflexiviridae*), tobacco mosaic virus (family *Virgaviridae*) and potato virus Y (family *Potyviridae*). Yellow mosaic virus of bean and Canna yellow streak virus and caulimovirus of yellow canna mottle are diffused everywhere on canna plants (family *Potyviridae*). Virus of cucumber mosaic and alfalfa mosaic were discovered on lavender and lavandin and characterized. Huge diversity of viral pathogens and ways of transmission from plant to plant (during vegetative propagation, mechanically, by insects-carriers, pollen and via seeds) significantly complicate diagnostics and control.

Key words: *plant viruses, peach, apricot, persimmon, fig, rose, lavender, lavandin, canna, clematis, chrysanthemum*

РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 581.33:633.811:632.38

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЫЛЬЦЫ ПОРАЖЕННЫХ ВИРУСАМИ И БЕССИМПТОМНЫХ РАСТЕНИЙ РОЗЫ ЭФИРОМАСЛИЧНОЙ

Светлана Васильевна Шевченко, Татьяна Николаевна Кузьмина,
Ирина Вячеславовна Митрофанова

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Россия, г. Ялта, пгт Никита, ул. Никитский спуск, 52
shevchenko_nbs@mail.ru

В статье приведены результаты сравнительного анализа зрелой пыльцы 12 сортов розы эфиромасличной особей с визуальными признаками поражения вирусными патогенами и бессимптомных

растений. Показано, что инфицирование проявляется в процессах формирования элементов мужской генеративной сферы и выражается в аномалиях и дефективности пыльцевых зерен.

Ключевые слова: *инфицированные вирусами и бессимптомные растения; роза эфиромасличная; пыльца.*

Введение

При поражении растений биогенными и абиогенными стрессовыми факторами, в том числе и вирусами, происходит изменение ряда физиолого-биохимических параметров, которые вызывают нарушение биохимического равновесия и отражаются на анатомо-морфологических характеристиках. Такие изменения морфологических признаков листовых пластинок, как пятнистость, морщинистость и карликовость, используются для визуальной оценки степени зараженности растения и его жизнеспособности в целом [2, 5, 10]. Для оздоровления пораженных вирусами растений также могут быть использованы биотехнологические методы [4, 6]. Состояние мужского гаметофита, характеризующееся зрелостью и морфологической стабильностью пыльцевых зерен, является одним из наиболее доступных и результативных признаков, дающих представление о степени стрессовых воздействий различных факторов на растение и его жизнеспособность [1, 3]. Например, у *Lycopersicon esculentum* Mill. вирус табачной мозаики деформирует структуру пыльцевого зерна и оказывает влияние на количество ДНК в ядре клетки, что снижает генеративный потенциал растения [8]. **Целью** данного исследования являлось выявление морфофизиологического состояния пыльцевых зерен ряда сортов розы эфиромасличной у особей с визуальными признаками поражения вирусами и бессимптомных растений для определения влияния вирусной инфекции на состояние их генеративной сферы.

Материал и методы исследований

В качестве объектов исследований были взяты 12 сортов розы эфиромасличной. Материал был собран, на участках Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма в Крымрозе и на опытно-экспериментальных участках НБС-ННЦ. Для проведения цито-морфометрического и качественного анализа пыльцевых зерен исследуемых сортов розы эфиромасличной готовили постоянные препараты средних образцов пыльцы, которые окрашивали метилгрюнпиронином, согласно методике, предложенной С.В. Шевченко с соавторами [9]. При оценке морфологического состояния пыльцевых зерен учитывали, что морфологически нормальные пыльцевые зерна при окраске метилгрюнпиронином обладают цитоплазмой, имеющей однородную окраску розового цвета, с четко выраженными вегетативной и генеративной клетками. Цитоплазма аномальных пыльцевых зерен приобретает фиолетовый оттенок, имеет грубозернистую структуру. В случае дегенерации содержимого пыльцевого зерна, оно оценивалось как стерильное

Для выделения тотальной РНК использовали метод ее адсорбции на силикагеле с помощью наборов RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, США). Спектр полученного препарата и концентрацию РНК определяли на спектрофотометре Amersham 1100 Pro (Amersham, Великобритания). Подготовку библиотек из тотальной РНК и метагеномное секвенирование осуществляли на платформе Illumina HiSeq 2000 в фирме Genotek (www.genotek.ru).

Анализ препаратов проводили на микроскопах “Jenaval” (Zeiss), “Jenamed-2” (Zeiss) и AxioScore A.1 (Zeiss). Морфометрические измерения проводили, используя программное приложение AxioVision Rel. 4.8.2. Наблюдения проводили методом светлопольной микроскопии. Микрофотографии получены с помощью системы анализа изображения AxioCam ERc5s и цифрового фотоаппарата Canon A 550. Подсчет пыльцевых зерен проводили с помощью программного приложения ImageJ 1.48v.

Статистическая обработка данных морфометрических параметров проведена с использованием дескриптивных статистик и проверки нормальности с помощью модуля «Основные статистики и таблицы» пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для оценки разности выборочных долей при качественном анализе пыльцевых зерен безвирусных и пораженных вирусами растений использовали метод F -преобразования Фишера (F_ϕ) [7].

Результаты и обсуждение

Как уже было сказано выше, поражение растения различными стрессовыми факторами, в том числе и вирусами, оказывает влияние на его физиолого-биохимическое состояние, приводящее к изменению и анатомо-морфологических характеристик. В результате диагностики вирусных патогенов в растительном материале розы эфиромасличной выявлено, что 70% отобранного материала поражено вирусными патогенами разной этиологии. Предварительный биоинформационный анализ результатов метагеномного сегментирования на розе эфиромасличной позволил обнаружить такие вирусы, как *Tobacco mosaic virus*, *Rose streak virus*, *Rose wilt virus*, *Tomato Tobacco necrosis virus* и *Tomato ringspot virus*. Наличие вирусов в последующем будет подтверждено в результате проведения серии анализов с новыми синтезированными праймерами. Внешнее проявление вирусного заражения растений особенно заметно на листьях и цветках (рис. 1-3) в виде морщинистости, межжилкового хлороза и пятнистости различного характера, что является результатом изменений состояния их внутренних структур.

Анализ мужских генеративных структур нескольких сортов эфиромасличной розы показал, что направленность их реакции на зараженность вирусами идентична и различается только фактическими цифровыми показателями (табл. 1).



Рис. 1 Цветки розы сорта Джалита

Анализ полученных данных зрелой пыльцы у безвирусных растений и у пораженных вирусами сортов розы показал, что наиболее высокая доля морфологически нормальных пыльцевых зерен у безвирусных растений сорта Джалита (около 78%) (рис. 4).

У данного сорта показано статистически значимое различие по количеству морфологически нормальных, аномальных и стерильных пыльцевых зерен у зараженных и чистых растений. С вероятностью $\beta > 0.99$ можно считать, что морфологически нормальных пыльцевых зерен у безвирусных растений больше, чем у растений, пораженных вирусами, и меньше аномальной пыльцы (табл. 1 и 2).



Рис. 2 Цветки инфицированных особей розы сортов Мичуринка и Лань



Рис. 3 Листья инфицированных особей розы сортов Джалита (А) и Фестивальная (Б)

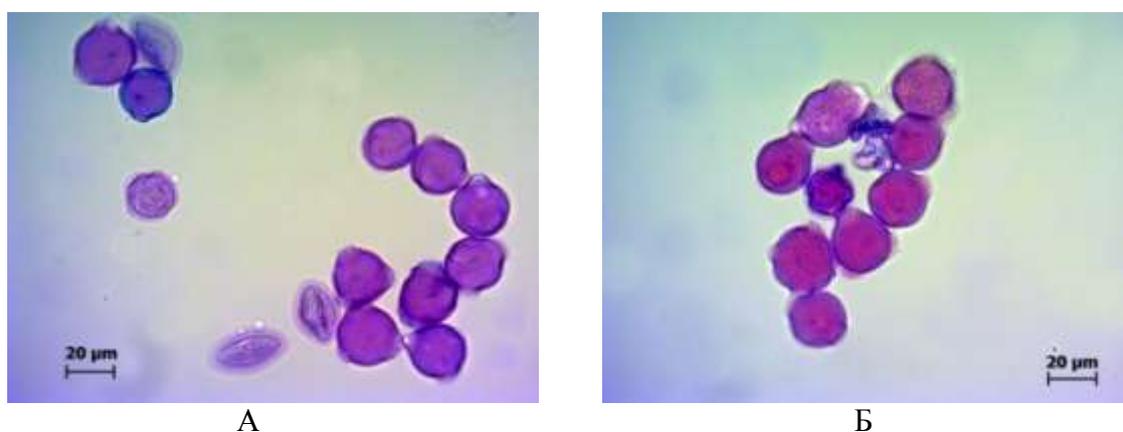
Таблица 1

Характеристика зрелой пыльцы различных сортов розы эфиромасличной

Сорт	Общее число пыльцевых зерен (ПЗ) (шт)	Морфологически нормальные ПЗ (шт)	Дефективные ПЗ (шт.)	Дефективные ПЗ (%)
Роза эфиромасличная, Крымроза, 04.06.2015, НБС – ННЦ, 05.06.2015				
1	2	3	4	5
Джалита визуально чистый	1030	730	300	29,0
зараженный	3260	1880	1380	42,3
Крымская красная (Крымроза)	1370	580	790	57,7
Радуга (Крымроза) зараженный	780	550	230	29,5
Фестивальная визуально чистый	1240	870	370	29,8
зараженный	2400	1100	1300	54,1
Лада (Крымроза) зараженный	870	550	320	36,8
Лань (Крымроза) 1. зараженный	1130	270	860	76,1
2. зараженный	1460	390	1070	73,3

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
Лань зараженный	1000	250	750	75,0
Аура зараженный	1270	340	930	73,2
Искра зараженный	2180	1510	670	30,7
Искра, (Крымроза) Визуально чистый	820	560	260	31,7
Мичуринка зараженный	2370	610	1760	74,3
Кооператорка, (Крымроза) визуально чистая	1400	1650	640	33,7
Кооператорка зараженный	2490	530	510	49,0
Таврида зараженный	2460	710	1750	71,1
Украина зараженный	1720	960	760	44,2



А

Б

Рис. 4 Пыльцевые зерна розы эфиромасличной сорт Джалита (А – бессимптомное растение; Б – растение с визуальными признаками заражения вирусами)

Таблица 2

Цитоморфологическая оценка пыльцы розы сортов Джалита и Фестивальная

Сорт	Морфологически нормальные пыльцевые зерна, %			Аномальные пыльцевые зерна, %			Стерильные пыльцевые зерна, %		
	Безвирусные растения	Растения, пораженные вирусами	F _φ	Безвирусные растения	Растения, пораженные вирусами	F _φ	Безвирусные растения	Растения, пораженные вирусами	F _φ
Джалита	77,59 ±1,46	62,73 ±2,15	47,38	5,60 ±1,01	11,75 ±0,72	22,06	16,81 ±1,20	25,47 ±2,45	20,34
Фестивальная	53,80 ±2,76	51,65 ±2,49	2,999	1,94 ±0,66	2,05 ±0,27	0,928	44,25 ±3,23	46,30 ±2,44	2,82

Примечание: М - среднее арифметическое ± m – стандартная ошибка среднего; F_φ - φ-преобразования критерия Фишера

Различие между безвирусными и зараженными растениями для сорта Джалита по количеству морфологически нормальных пыльцевых зерен составляет в среднем 16%. При этом доля стерильных пыльцевых зерен у растений, пораженных вирусами,

на 23,21% выше по сравнению с бессимптомными растениями. В то же время у растений с визуальными признаками заражения сорта Джалита характерно повышение доли аномальных пыльцевых зерен на 6,15% по сравнению с растениями, не имеющими признаков вирусного заражения.

Доля стерильных пыльцевых зерен увеличивается при заражении растения вирусами в среднем на 9%. Иными словами, у сорта Джалита действие вирусов сказывается как в повышении числа аномалий при формировании пыльцевых зерен, так и в их значительной стерильности. Следует подчеркнуть, что практически у всех изученных сортов направленность реакции мужских генеративных структур на зараженность вирусами идентична и различается только цифровыми показателями.

Например, у визуально чистых особей сорта Фестивальная аномальных пыльцевых зерен было менее 30%, у зараженных – до 60%, у сорта Кооператорка – около 30% и 50%, соответственно. Высокие показатели дефективной пыльцы отмечены также у зараженных особей сортов Таврида, Аура, Лань – более 70%.

Выводы

Таким образом, на основании проведенного сравнительного изучения состояния пыльцы у различных сортов розы эфиромасличной особей с визуальными признаками поражения вирусами и бессимптомных особей можно сделать предварительное заключение о том, что инфицированность растений приводит не только к морфологическим изменениям листьев и цветков, но и отражается на состоянии и жизнеспособности мужского гаметофита. При определяющей зависимости развития пыльцы от генотипа поражение особей вирусными патогенами особенно ярко проявляется в процессах формирования элементов генеративной сферы и выражается в аномалиях и дефективности пыльцевых зерен.

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

Список литературы

1. Бессонова В.П., Фендюр Л.М., Пересыпкина Т.Н. Влияние загрязнения окружающей среды на мужскую фертильность декоративных цветочных культур // Бот. журн. – 1997. – Т. 82, №5. – С. 38-44.
2. Грин Н., Стаут У., Тейлор Д. Биология: В 3-х томах. Т.1. – М: Мир, 1990. – 368 с.
3. Методические рекомендации по проведению цитозембриологического анализа растений для оценки загрязненности воздуха (в связи с проблемой охраны окружающей среды) / Сост. Ругузов И.А., Шевченко С.В., Молчанов Е.Ф. Ялта, 1979. – 23 с.
4. 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.
5. Митрофанова О.В., Славгородская-Курпиева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичева Л.А. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур. – Ялта: Крымпресс, 2000. – 45 с.
6. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Иванова Н.Н., Лесникова-Седошенко Н.П. Применение биотехнологических методов в оздоровлении растений и

размножении безвирусного посадочного материала перспективных цветочно-декоративных культур // Сб. Трудов Никит. ботан. сада. – 2014. – Т. 138. – С. 5-56.

7. *Плохинский Н.А.* Биометрия. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1970. – 367 с.

8. *Хохлова А.А.* Особенности влияния абиотических и биотических факторов на репродуктивную систему растений томата *Lycopersicon esculentum* Mill.: Диссертация канд. биол. наук. – Краснодар, 2014. – 21 с.

9. *Шевченко С.В., Ругузов И.А., Ефремова Л.М.* Методика окраски постоянных препаратов метиловым зеленым и пиронином // Бюл. Гос. Никит. бот. сада. – 1986. – Вып. 61. – С. 99-101.

10. *Mitrofanova I., Grebennikova O., Brailko V., Paliy A., Marko N., Lesnikova-Sedoshenko N., Mitrofanova O.* Physiological and biochemical features of some cultivars in essential oil rose (*Rosa × damascena* Mill.) growing *in situ* and *in vitro* // International Journal of PharmTech Research. – 2016. – Vol. 9, N 7. – P. 226-232.

Статья поступила в редакцию 11.08.2016 г.

Shevchenko S.V., Kuzmina T.N., Mitrofanova I.V. Pollen characteristics of infected and asymptomatic plants of essential oil rose // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2016. – № 121. – P. 18-24.

The article covers comparative analysis results of mature pollen taken from specimens of 12 essential oil rose cultivars; infected and asymptomatic plants were chosen as study cases. It was demonstrated that infection becomes apparent during formation of male generative sphere elements as pollen grain anomaly and defect.

Key words: *infected and asymptomatic plants, essential oil rose, pollen*

БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 630*160

БИОХИМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПОЛУСИБОВОГО ПОТОМСТВА ДЕРЕВЬЕВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО КАК ИСТОЧНИК ОТБОРА ГЕНОТИПОВ ДЛЯ МИКРОКЛОНИРОВАНИЯ

Людмила Владимировна Полякова¹, Василий Иванович Литвиненко²

¹УкрНИИ Лесного хозяйства и агролесомелиорации им. В.М.Высоцкого
61024 Украина, г. Харьков, ул. Пушкинская 86
polyakova_lv@mail.ru

²ГП Государственный научный центр лекарственных средств и мед.препаратов
61085 Украина, г. Харьков, ул. Астрономическая 33
litvinenkovas@rambler.ru

Изучали содержание веществ вторичного обмена в листьях сеянцев дуба черешчатого, используемых для микроклонирования. Отмечено негативное влияние на ростовые характеристики эксплантов повышенных концентраций в листьях свободного кверцетина и флавоновых гликозидов. Изучение природной и искусственной популяций полусибов показало значительную биохимическую неоднородность сеянцев, а также связь не только с ростовой активностью, но и восприимчивостью к патогенам. Биохимический анализ сеянцев позволяет оптимизировать их отбор для последующего микроклонального размножения.

Ключевые слова: *дуб черешчатый; микроклонирование; полусибовое потомство; вторичные метаболиты; патогенные инфекции*

Введение

Важное экономическое и экологическое значение дуба черешчатого, сокращение площадей которого наблюдается во многих странах, определяет большое внимание к проблеме воспроизводства наиболее ценных генотипов с применением биотехнологических методов. В связи с тем, что большинство видов рода *Quercus* практически невозможно размножить вегетативным способом вследствие особенностей старения побегов (maturation), наиболее распространенным методом во многих странах остается разработка методов микроклонирования *in vitro* ювенильного материала – семян 2-8 месяцев [7]. В последнее время применяется также метод соматического эмбриогенеза, несмотря на возможность мутаций клонированных таким образом растений [13]. Наиболее простым и продуктивным методом является прямой органогенез семян дуба, к основным недостаткам которого относят генетическую неопределенность получаемого материала, так как даже при использовании полусибового потомства лучших генотипов, речь идет о размножении материала, полученного неконтролируемым опылением. Как правило, потенциал размножаемого материала в плане будущей устойчивости к вредителям, болезням на основании каких-либо анализов не рассматривается. Эффективность создания оптимальных условий микроклонирования оценивается преимущественно по ростовой активности эксплантов и активности корнеобразования [11]. Биохимическая оценка особенностей развития клонированного материала применяется преимущественно к классическим объектам – культурам *Arabidopsis* и *Tobacco* с использованием линий, характеризующихся разным уровнем экспрессии генов синтеза флавоноидов, что часто проявляется в задержке развития почек, либо корневой системы [6,10]. Наш опыт использования для микроклонирования ювенильного материала, преимущественно семян полусибового потомства, с предварительным анализом листьев на содержание некоторых групп веществ вторичного обмена, показал возможность оптимизировать отбор материала для размножения *in vitro* за счет выявления определенных связей между ростовыми и биохимическими характеристиками, а также устойчивости к мучнистой росе [3]. Вещества вторичного обмена известны как компоненты растений, обеспечивающие защиту от разнообразных внешних факторов, включающих УФ-Б радиацию, а также вредителей и патогенов [5]. Листья дуба черешчатого синтезируют разнообразные группы вторичных веществ, включая гидролизуемые танины (ведущая в количественном отношении группа), фенилпропаноидные структуры, включающие катехины, конденсированные танины, кверцетин, гликозилированные производные флавонолов [12].

Целью работы было рассмотреть данные по микроклонированию семян дуба (полусибовые потомства) в свете влияния вторичных веществ на ростовые характеристики эксплантов. Оценивали (а) биохимическое разнообразие потомства; (б) влияние отдельных групп веществ на ростовые характеристики; (в) связь с устойчивостью к грибным инфекциям.

Объекты и методы исследования

Для микроклонирования использовали 2-7 мес. семена полусибового потомства 300- и 600-летних деревьев дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) (ПС-600, ПС-300). Желуди проращивали в лесной почве в лабораторных условиях. Микроклонирование выполняли методом органогенеза, используя нодальные и апикальные узловые сегменты стебля. Стерилизация отрезков стебля стандартная [11]. Экспланты помещали на среду Грешофф-Дой (ГД) с содержанием бензиламинопурина – 1 мг/л, 30% сахарозы. Через 1 месяц развитые экспланты переносили на 24 ч на среду ½ ГД с содержанием индолилмасляной кислоты 20 мг/л. Далее экспланты переносили в безгормональную

среду. Через 1-1.5 месяца укорененные растения переносили в почвенную смесь – торф-перлит – 1:1. Сеянцы потомства 70-летнего дерева дуба (ПС-70), собранные в условиях естественного обитания, оценивали по устойчивости к патогенам и вредителям – мучнистая роса (*Microsphaera alphithoides* Gaerth.) – **мр**; бурая пятнистость (*Gloeosporium* sp.) – **бп**; повреждение листьев пяденицей – (*Erannis defoliaria* CL.) – **пд**. В комплексе биохимических показателей определяли содержание белка, 615 нм (Б) [2], гидролизуемых танинов 750 нм (ГТ) [12], конденсированных танинов, 500 нм (КТ) [9], а также группы флавоновых гликозидов, 415 нм (ФЛ)[1] и кверцетина 374 нм (Кв). Для более точного определения содержания некоторых групп веществ использовали последовательную экстракцию листьев 96%ным (ФЛ, Кв) и 50%-ным этанолом. 1-ю фракцию (96% спирт) упаривали до 1 мл, добавляли 5 мл дист.Н₂О и обрабатывали 3 мл хлороформа. После разделения слоев в верхней (водно-спиртовой фракции) определяли содержание ФЛ, в нижней - содержание свободного Кв. В извлечении 50%-го этанола определяли содержание КТ (ванилиновый реактив) и общую сумму ФС (реактив Фолина-Дениса). Разница между содержанием в этой фракции общих ФС и КТ рассматривали как сумму ГТ.

Результаты и обсуждение

2-месячные сеянцы ПС-600 и ПС-300, выращенные в лабораторных условиях, анализировали на содержание Б, ГТ, ФЛ, Кв. Произвольно выбранные сеянцы клонировали на среде ГД. Активность развития эксплантов можно было оценить с учетом содержания основных групп веществ в исходных сеянцах. На рис.1 представлены экспланты, показавшие разную активность как развития побега, так и корнеобразования.

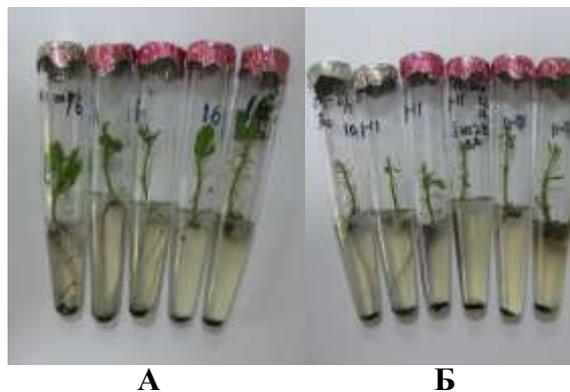


Рис. 1 2-месячные экспланты ПС-600, полученные от сеянцев с разным уровнем содержания ФЛ и Кв в листьях. А – Кв – 0,53 мг/г, ФЛ-0,78%; Б – Кв – 0,68 мг/г, ФЛ – 1,32%

Сравнение 2- мес. эксплантов (рис. 1), полученных от сеянцев, отличающихся разным содержанием Кв и ФЛ в листьях, показывает, что более активное развитие побегов и корневой системы обеспечивает сеянец с пониженным содержанием Кв и ФЛ (А). Более высокий уровень Кв и ФЛ (Б) проявляется у эксплантов менее активным развитием побегов, слабой облиственностью и задержкой развития корней.

Оценка влияния этих групп веществ на характер дальнейшего развития эксплантов была прослежена на 3-5-месячных растениях-регенерантах (рис. 2). Сравнение характера развития растений, полученных от сеянцев с разным содержанием ФЛ и Кв в листьях, показывает, что ингибирующее влияние на активность развития надземной части в большей мере зависит от уровня свободного Кв исходного сеянца, в то время как уровень содержания ФЛ достаточно четко влияет на развитие корневой системы. Максимальное содержание ФЛ (1,8%) заметно ингибирует рост корней (рис.

2, Б-2), а минимальное содержание (0,24%, 0,46%), напротив, заметно активизирует их рост (рис. 2, А-1; Б-1).

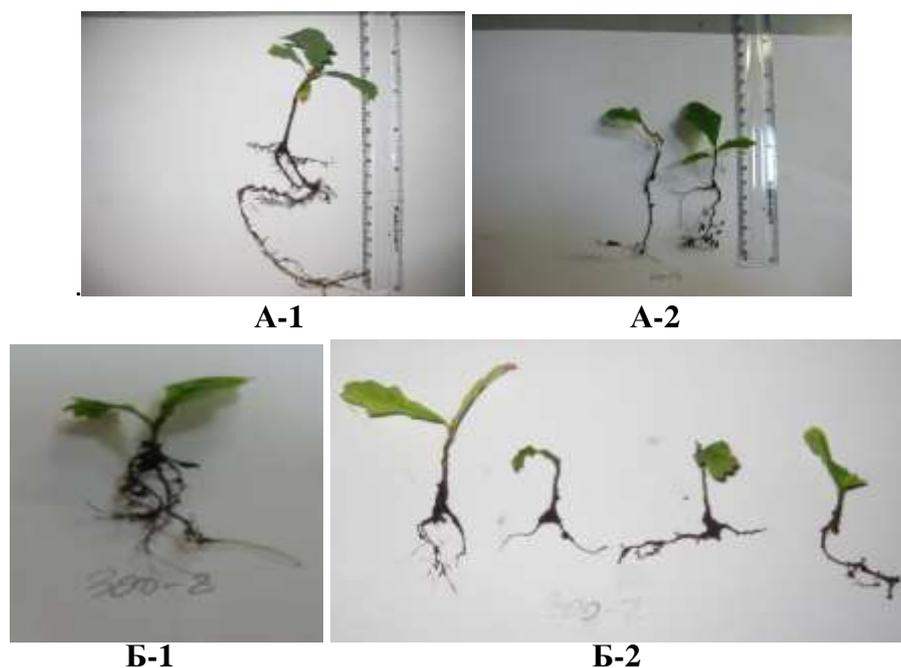


Рис. 2 А-1,2 – растения-регенеранты (ПС-600, 5 месяцев в грунте), Содержание ФЛ и Кв в листьях исходных семян составило для А-1 – ФЛ – 0,24%, Кв – 0,48 мг/г; для А-2 – ФЛ – 1,1%, Кв – 0,51 мг/г; Б-1,2 – растения-регенеранты (ПС-300, 3 месяца в грунте). Б-1 – содержание ФЛ – 0,46%, Кв – 0,36 мг/г; Б-2 – ФЛ-1,8%, Кв – 0,27 мг/г

Дополнительно влияние содержания ФЛ в листьях на развитие корневой системы было прослежено на сеянцах тех же исходных групп, но выполненное в возрасте 1,3 года. На следующий год после первого анализа листьев в возрасте 2 месяца, сеянцы были выкопаны, корневая система промыта, высушена и взвешена (табл. 1).

Таблица 1
Содержание Б и ФЛ в листьях 2-х месячных сеянцев и вес корней этих сеянцев в возрасте 1,3 года

Группа растений	Б	ФЛ	Вес корней, гр
ПС-600, 1гр (10 ос.)	9,40±0.20*	1,33±0.06**	0,32±0.02*
2гр (10 ос.)	8,80±0.17*	0,52±0.09**	0,38±0.03*
% 1гр – 2 гр	107	250	79
ПС-300, 1гр (5 ос.)	11,50±1.12	0,78±0.07**	0,45±0.08**
2гр. (9 ос.)	10,20±0.63	0,41±0.07**	0,65±0.06**
% 1гр-2гр	112,7	190,2	70,3

Примечание: ос.- особи. * ** P < 0,05-0,01

Данные таблицы 1 показывают, что повышенное содержание Б в листьях сеянцев лишь незначительно сказывается на разнице веса корней в группах. Повышенный уровень ФЛ в растениях 1-й группы снижает вес корней на 20% и 30% соответственно для ПС-600 и ПС-300. Из приведенных данных рис. 1, 2 и табл. 1 следует, что при оценке только морфометрических характеристик, оптимальным вариантом для микроклонирования могут служить сеянцы дуба с низкими уровнями в листьях как Кв, так и ФЛ. Однако, следует учитывать, что благодаря антиоксидантным свойствам, они играют важную роль в защите растений от избыточного УФ-Б, при действии повышенных и пониженных температур, при патогенных инфекциях и пр. [5]. Поэтому далее изучили 5-мес. сеянцы ПС-70 (40 особей, естественное возобновление) с целью

оценки влияния ФЛ, КТ и Кв на ростовые характеристики, а также устойчивость к вредителям и инфекциям. Сеянцы разбили на 4 группы по 10 сеянцев: 1гр – устойчивые ко всем видам поражения; 2гр – инфицированные **мр**, 3гр – инфицированные **бп**, 4гр – повреждение листьев **пд** (табл. 2).

Таблица 2

Биохимическая характеристика листьев сеянцев ПС-70 (июль 2015 г.) и ПС-600 (июль 2011 г.), (% сух.веса листьев; под чертой CV%, в скобках число растений)

Популяция	Б	ГТ	ФЛ	КТ	Кв	высота
ПС-600 (42)	<u>9.44±0.35</u> 14.3	<u>1.75±0.15</u> 34.6	<u>0.74±0.10</u> 58.2	-	<u>0.19±0.02</u> 19.8	-
ПС-70 (40)	<u>10.07±0.23*</u> 14.8	<u>5.18±0.09</u> 10.8	<u>1.00±0.03</u> 18,1	<u>0.34±0.04</u> 67.2	<u>0.17±0.005</u> 56.5	<u>7.47±0.28</u> 23.8
1гр- уст.(10)	<u>9.23±0.26</u> 8.9	<u>5.22±0.67</u> 10,7	<u>1.10±0.047*</u> 13,6	<u>0.18±0.015*</u> 27,3	<u>0.26±0.03*</u> 38,4	<u>7.40±0.58</u> 24.7
2гр- мр (10)	<u>12.2±0.38*</u> 9,8	<u>4.83±0.19</u> 12,8	<u>0.91±0.04*</u> 14,8	<u>0.41±0.05*</u> 36,5	<u>0.19±0.03*</u> 51,5	<u>7.45±0.39</u> 17.1
3гр - бп (10)	<u>9.25±0.16</u> 5,6	<u>5.13±0.11</u> 6,8	<u>0.90±0.058</u> 19,6	<u>0.54±0.08*</u> 55,5	<u>0.10±0.02*</u> 68,2	<u>8.50±0.67*</u> 24.9
4гр - пд (10)	<u>9.62±0.24</u> 7.9	<u>5.53±0.16</u> 9,4	<u>1.05±0.06*</u> 18.0	<u>0.22±0.038*</u> 55.0	<u>0.15±0.02*</u> 40.6	<u>6.7±0.49*</u> 23,2

Примечание: 1гр-уст. – листья сеянцев устойчивы ко всем видам инфекции и насекомых; 2гр – листья инфицированы **мр** – 40-80%; 3гр – листья инфицированы **бп** – 25-70%; 4гр – листья на 10-40% объединены **пд**. CV% – коэффициент вариации; * P < 0,05.

Данные табл. 1 показывают, что по содержанию Б и ГТ различия между группами разного характера повреждений (кроме сеянцев, инфицированных **мр**) находятся в пределах 10-15%. Относительно близки между собой по уровням накопления ФЛ и КТ группы устойчивых к инфекциям растений (1гр и 4гр). Более интенсивным синтезом КТ отличаются группы, инфицированные **мр** и **бп** (2гр и 3гр), так как содержание КТ более чем в 2 раза выше, чем в листьях растений, устойчивых к патогенам. Количество свободного Кв в разных группах варьировало. Уровень ФЛ на 10% выше в устойчивых к инфекциям сеянцах (1гр и 4 гр.). Значительно увеличенный синтез КТ в инфицированных сеянцах (в среднем на 230%) можно отнести к индуцированному патогенами. Биохимическое разнообразие 40 проанализированных сеянцев ПС-70 рассмотрели с помощью диаграмм, объединяющих индивидуальные растения разных групп популяции (рис. 3). Для сравнения представлена аналогичная диаграмма ПС-600 по показателям содержания ГТ и ФЛ (содержание КТ было незначительным) (рис. 4).

Рисунок 3 показывает биохимическую неоднородность природной популяции ПС-70 в зависимости от состояния индивидуальных сеянцев в плане устойчивости или восприимчивости к грибной инфекции либо повреждению листьев **пд**. Отчетливо проявляется различие в поведении, с одной стороны, таких групп веществ, как Б и ГТ и с другой стороны ФЛ и КТ. В целом варибельность Б и ГТ практически одинакова во всех группах сеянцев за исключением инфицированных **мр**. В данном случае при интенсивности инфицирования 40-80% поверхности листа, значительное варьирование и увеличение уровня Б можно отчасти объяснить присутствием на поверхности листа гифов патогена.

Диаграммы (рис. 3), отражающие содержание в листьях ФЛ и КТ, отчетливо показывают отличие в количественных пропорциях этих веществ в разных группах растений. Наиболее стабильный уровень синтеза веществ наблюдается среди сеянцев, устойчивых ко всем видам поражения (1гр). Повреждение листьев **пд** несколько

увеличивает варьирование компонентов, не меняя их пропорционального соотношения (4гр). Однако инфицирование листьев патогенами способно заметно изменить регуляцию синтеза этих веществ. Несмотря на разный источник инфекции – **мр** (2гр) и **бп** (3гр) - в листьях восприимчивых к инфекциям семян наблюдается одинаковая ответная реакция на внедрение патогена – снижение уровня ФЛ и значительный дополнительный (индуцированный элиситорами патогена) синтез КТ.

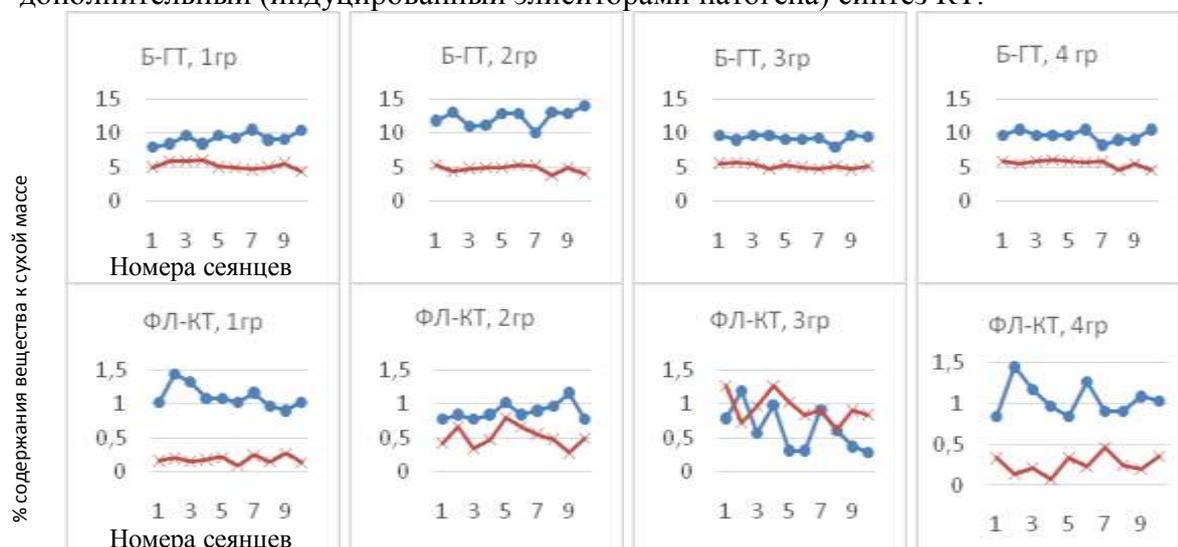


Рис. 3. Биохимические фенотипы 5-мес.сеянцев ПС-70 по сочетанию показателей Б - ГТ и ФЛ - КТ при разделении всей выборки (40 растений) на группы разной степени устойчивости к вредителям и патогенам (группы те же, что в табл.2); Б, ФЛ: —●— ; ГТ, КТ —×



Рис. 4 Биохимические фенотипы 6-мес.сеянцев ПС-600 по показателям ГТ и ФЛ в группах устойчивых к мучнистой росе (А) и восприимчивых (Б). ГТ: —●— ; ФЛ: —■—

Рисунок 4 позволяет провести сравнение биохимического разнообразия семян естественного возобновления (ПС-70, рис. 3) и выращенных в лабораторных условиях (ПС-600). Из внешних воздействий семена ПС-600 к 6-месячному возрасту испытали инфицирование **мр**. При этом из 64 особей, проанализированных в возрасте 2 месяца, после действия инфекции сохранилось 42. Тем не менее сохранившиеся 6-мес. растения, как устойчивые, так и восприимчивые к патогену, показывают значительно более высокую вариабельность вторичных метаболитов по сравнению с природной популяцией. Это подтверждают коэффициенты вариации, которые для ГТ ПС-600 составили 34.6%, а для ФЛ - 58.2% (высокий уровень), что намного выше, чем у природного потомства – 10.8% для ГТ и 18.1% для ФЛ (средний уровень) (табл.2). Вероятно, естественный отбор уже в начальный период развития семян ПС-70 в отличие от ПС-600, выращенных в контролируемых условиях лаборатории, элиминирует из состава популяции наименее приспособленные особи, одной из

характеристик которых может быть высокая вариабельность веществ вторичного обмена. При этом, несмотря на снижение амплитуды изменчивости вторичных веществ в популяции ПС-70, сохраняется биохимическое разнообразие, определяющее разную степень устойчивости и восприимчивости к вредителям и патогенам.

Для того, чтобы более детально рассмотреть влияние разных групп веществ на ростовую активность семян в связи с инфекцией, использовали корреляционный анализ компонентов, которые могут быть связаны между собой биосинтетически, а также могут влиять на ростовую активность – ГТ, ФЛ, Кв (табл. 3).

Таблица 3

Коэффициенты корреляции некоторых биохимических признаков и ростовых характеристик 6-мес. семян полусибовых потомств дуба

Группа семян	h-ГТ	h-Кв	h-ФЛ
Популяция 40 ос.	-0,354*	-0,346*	-0,183
1гр+4гр – 20 ос.	-0,307	-0,098	-0,048
2гр+3гр – 20 ос.	-0,285	-0,493*	-0,131

Примечание: Для повышения статистической значимости сравниваемых пар компонентов популяция ПС-70 разделена на две группы, проявляющие близкий характер накопления всех групп веществ; h-высота. * P =0,10-0,05.

Данные корреляционного анализа показывают, что вещества вторичного обмена, как правило, негативно связаны с высотой семян. При этом во всех случаях более значимое влияние оказывает содержание в листьях ГТ и Кв. Наиболее заметное влияние на развитие надземной части оказывает содержание Кв (2 гр+3 гр, табл. 3). Содержание ФЛ, влияние которых было отмечено ранее на характере развития корневой системы эксплантов (рис.2), на надземную часть семян природной популяции оказывает также негативное, но менее выраженное влияние. Исследования на культурах *Arabidopsis* и *Tobacco* [6, 10] убедительно показали, что ФЛ гликозиды (водорастворимые структуры) действуют в растении как ингибиторы осевого транспорта ауксинов, что и определяет их негативное влияние на корнеобразование (и в дальнейшем рост) в случае повышенного синтеза этих веществ в начальный период развития.

При общем снижении ФЛ на 10% в семенах восприимчивых к инфекциям, наблюдается повышение их ростовой активности в среднем на 7% (табл. 2). То есть снижение уровня ФЛ в листьях семян, инфицированных патогенами, способствует активизации осевого транспорта ауксинов, усиливая при этом их ростовую активность. Из этого следует, что клонирование ювенильного материала дуба без учета синтеза в листьях вторичных веществ, с учетом только улучшенных ростовых характеристик исходных семян, может сопровождаться пониженным уровнем синтеза такой важной группы, как фенилпропаноиды, и привести к активному размножению *in vitro* семян, ослабленных в плане устойчивости к внешним воздействиям, в том числе к грибным инфекциям будущих деревьев [5].

Полученные данные находятся в хорошем соответствии с рекомендациями специалиста, работающего в программе интенсивной практики дорастивания эмбрионных соматических культур до уровня семян, в плане улучшения качества семян для восстановления лесов Северной Америки [8]. Автор считает, что одним из способов улучшения качества культур может быть вариант испытания семян стрессовыми условиями, когда слабо приспособленные особи погибнут или покажут низкую ростовую активность. При этом необходимо экофизиологическое понимание особенностей роста как деревьев, так и семян.

Выводы

1. Анализ семян дуба на содержание веществ вторичного обмена показал значительное биохимическое разнообразие ювенильного материала. При этом варибельность признаков (ГТ, ФЛ) была намного выше в популяции семян, выращенных в условиях лаборатории и заметно ниже в природной популяции такого же возраста. Это может указывать на то, что семена с экстремально высокими или низкими показателями признаков, сохраняющиеся в искусственной популяции, в природных условиях элиминируются естественным отбором уже на начальных этапах развития.

2. Эксперименты показали, что повышенные уровни Кв и ФЛ могут снижать ростовую активность, а пониженные, напротив, усиливать, что позволяет контролировать потенциальную ростовую активность эксплантов в условиях *in vitro*. При этом следует учитывать, что низкие уровни ФЛ и Кв могут негативно влиять на антиоксидантную активность будущих растений.

3. Существенные отличия по содержанию ФЛ и КТ между сеянцами устойчивыми и восприимчивыми к грибным инфекциям, вызваны не разным первоначальным уровнем накопления компонентов в листьях, а нарушением регуляции их синтеза под влиянием инфекции (индуцированный синтез). Поэтому до появления признаков инфекции установить потенциальную устойчивость сеянцев, выращиваемых в контролируемых условиях, затруднительно. Вероятно, требуются дополнительные исследования.

4. Для клонирования дуба черешчатого более оптимальным может быть вариант использования семян природного возобновления в возрасте 5-6 месяцев, которые уже прошли первую стадию естественного отбора и дифференцированы как по потенциальной ростовой активности, так и по устойчивости к патогенным инфекциям.

Список литературы

1. Беликов В.В. Оценка содержания флаванолов-производных в плодах *Silybum marianum* L // Раст. рес. – 1985. – Вып. 3. – С. 350-358.
2. Бузун Г.А., Джемухадзе К.М., Милешко Л.Ф. Определение белка в растениях с помощью амидо-черного // Физиол. раст. – 1982. – Т. 29. – С.198-204.
3. Полякова Л.В., Гамаюнова С.Г., Журова П.Т., Литвиненко В.И. Биохимические особенности многовековых деревьев дуба черешчатого и молодой культуры, имеющей в составе суховершинные деревья // Лесоведение. – 2014. – № 4. – С. 8-35.
4. Полякова Л.В., Гамаюнова С.Г., Журова П.Т. Анализ взаимодействия между биохимическими параметрами и устойчивостью деревьев дуба черешчатого в культурах разного возраста // Лісівництво и Агролісомелірація. – 2014. – Вып. 124 – С. 185-195.
5. Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance // Plant Science.-2012. – V. 196. – P.67-76.
6. Brown L., Rashotte A., Murphy A., Normanly J., Tague B., Peer W., Tai Z., Mudge G. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis* // Plant Physiol. – 2001. – Vol. 126. – P. 524-535.
7. Gatti E., Sgarbi E. Micropropagation of *Quercus robur*: explant sources and cultural conditions affect *in vitro* responses differently // Acta Horticulturae. – 2015. – N 1083. – P. 303-310. doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1083.38
8. Grossnickle S. Reforestation silviculture: an ecophysiological perspective Lessons learned across 40 years // Book of Abstracts “International conference Reforestation challenges”, Belgrad (03-06 June 2015). – Belgrad: Serbia, 2015. – P. 1-2.

9. *Julkunen-Tiitto R.* Phenolic constituents in leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics // *J. Agric. Food Chem.* – 1985. – Vol. 33. – P. 213-217.
10. *Mahajan M., Kumar V., Kumar Yadav S.* Effect of flavonoid-mediated free IAA regulation on growth and development of *in vitro*-grown *Tobacco* seedlings // *J. Plant Dev. Biol.* – 2011. – Vol. 5. – P. 42-48.
11. *Ostrolucka M., Gajdosova A., Libiakova G.* Protocol for micropropagation of *Quercus* spp. // *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits.* Springer. – 2007. – P. 85-91.
12. *Salminen J., Roslin T., Karonen M., Sinkonen J., Pihlaja k., Pulkkinen P.* Seasonal variation in the content of hydrolysable. – 2004. – Vol. 30. – P. 1693-1704.
13. *San-Jose M., Corredoira E., Martinez M., Valladares S., Mallon R., Vieities A.* Shoot apex explants for induction of somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* L. trees // *Plant Cell Rep.* – 2010. – Vol. 29. – P. 661-671.

Статья поступила в редакцию 04.08.2016 г.

Polyakova L.V., Litvinenko V.I. Biochemical diversity of half-sib progeny of *Quercus robu* trees as genotypes for microcloning // *Bull. of the State Nikita Botan. Gard.* – 2016. – № 121. – P. 24-32.

Substances as a result of the repeated exchange in seedling leaves of *Quercus robur*, used for microcloning were thoroughly investigated. It was noted that heightened concentration of quercetin and flavones glycosides in leaves possess negative effect on explants growth. Research of natural and artificial half-sib populations revealed significant biochemical heterogeneity of seedlings, and correlation not only with growth activity, but susceptibility to pathogens. Biochemical analysis of seedlings optimizes their selection for further microclonal propagation.

Key words: oak; microcloning; half-sib progeny; secondary metabolites; pathogenic infections

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 574.24:634.63

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ У НЕКОТОРЫХ СОРТОВ *OLEA EUROPEA* L. С РАЗЛИЧНОЙ МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТЬЮ

**Анфиса Евгеньевна Палий, Оксана Анатольевна Гребенникова,
Татьяна Борисовна Губанова, Иван Николаевич Палий**

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Россия, г. Ялта, пгт Никита, ул. Никитский спуск, 52
onlabor@yandex.ru

Исследованы оводненность и степень повреждения тканей листа и однолетних побегов и водный дефицит листьев, определено содержание фенольных соединений, флаванолов, аскорбиновой кислоты и пролина, установлены активности каталазы и полифенолоксидазы некоторых сортов *O. europea* с различной степенью морозостойкости в условиях ЮБК. Водный дефицит листьев всех сортов находился в пределах 7-10%. Минимальной оводненностью побегов характеризуются морозостойкий сорт Никитская и среднестойкий Асколяно. Значительное обмерзание листьев и побегов зафиксировано в конце января. Полученные данные позволяют предположить участие каталазы в реализации механизмов морозостойкости сортов маслины европейской. Показана возможность использования таких параметров как концентрации флаванолов и пролина в качестве характеристики стрессового состояния сортов при неблагоприятных условиях зимнего периода.

Ключевые слова: маслина; устойчивость к низким температурам; водный дефицит; активность ферментов; фенольные соединения; аскорбиновая кислота; пролин

Введение

Маслина европейская (*Olea europaea* L.) издавна культивируется на Южном берегу Крыма (ЮБК). В Никитском ботаническом саду собрана крупнейшая коллекция сортов маслины в России. Климатические условия ЮБК позволяют получать хорошие урожаи, но в отдельные годы погодные условия зимнего периода могут вызывать значительные повреждения маслины, особенно у некоторых интродукционных сортов.

Особенность климата ЮБК в зимний период состоит в частой смене волн тепла и холода, причем резкие колебания температур нередко сопровождаются штормовыми ветрами и осадками. Анализ многолетних наблюдений показывает, что в 56% самым холодным зимним месяцем оказывается февраль, в остальных случаях – январь. Вероятность наступления морозов ниже -7°C , опасных для ряда субтропических культур в январе-феврале превышает 70% [1, 6]. Зимний период 2015-2016 гг. характеризовался глубокими сменами волн тепла и холода и слабо отличался от среднемноголетней нормы. Минимальная температура воздуха в третьей декаде декабря опускалась до $-7,9^{\circ}\text{C}$, а в третьей декаде января до $-7,2^{\circ}\text{C}$. По данным агрометеостанции “Никитский сад” погодные условия декабря 2015 г. и января 2016 г. слабо отличались от среднемноголетней нормы и поэтому за последние десятилетия являлись достаточно типичными для ЮБК.

Поскольку ЮБК является северной границей культурного ареала *O. europaea*, то проблема выявления физиолого-биохимических параметров сортов с различной морозоустойчивостью является актуальной.

В связи с вышеизложенным целью работы являлось определение физиологических и биохимических изменений, происходящих в вегетативных органах у некоторых сортов маслины в зимний период на ЮБК.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования были выбраны сорта *O. europaea* с различной степенью морозостойкости (морозостойкий сорт – Никитская, среднеустойчивый – Асколяно, слабоморозостойкие – Раццо и Кореджиоло), а также подвид *O. europaea* subsp. *cuspidata* (Wall ex G. Don.). Оводненность тканей листа и однолетних побегов определяли весовым методом, водный дефицит листьев – по методу Кушниренко М.Д. [7]. Степень повреждения тканей листьев и побегов оценивали визуально на третьи-пятые сутки после наступления отрицательных температур. Биохимические показатели определяли по общепринятым методикам. Содержание пролина – по модифицированной методике Чинарда с использованием нингидринового реактива [2], суммы фенольных веществ – фотометрическим методом с использованием реактива Фолина-Чокальтеу [8], флаванолов – по методике Мурри [9], аскорбиновой кислоты – йодометрическим титрованием [3]. Активность каталазы – титриметрическим методом [10], полифенолоксидазы (ПФО) – спектрофотометрически в присутствии пирокатехина и *n*-фенилендиамина [4].

Результаты и обсуждение

Определение оводненности тканей листа на однолетних побегах показало, что содержание воды в течение зимнего периода снижалось у всех изучаемых сортообразцов. Однако, динамика этого процесса различна и связана, вероятно, со степенью устойчивости к отрицательным температурам. В частности, резкие колебания как в сторону увеличения (в зависимости от гидротермических условий), так и в

сторону снижения содержания воды отмечены у слабоустойчивых сортов Раццо, Кареджиоло и подвида *O. europea* subsp. *cuspidata* (табл. 1).

Таблица 1

Содержание воды в тканях листа сортов маслины

Сорт дата	Раццо	Кареджиоло	Асколяно	Никитская	<i>O. europea</i> subsp. <i>cuspidata</i>
18.12.16	63,64±1,56	58,05±1,31	67,00±1,25	58,16±2,01	56,60±1,56
28.12.16	55,85±1,32	53,96±1,65	53,63±1,45	51,26±1,47	50,52±1,21
11.01.16	51,18±0,58	57,49±1,21	50,00±1	52,57±1,37	46,45±1,52
21.01.16	48,91±1,34	50,25±2,09	50,41±0,9	49,52±1,64	20,16±1,09
02.02.16	51,37±2,04	59,91±1,11	63,85±1,87	39,73±1,21	48,61±1,41

Несмотря на общую тенденцию к снижению количества воды в тканях листа, водный дефицит у всех сортов колебался в пределах 7-10%. Анализ оводненности однолетних побегов показал такую же тенденцию, т. е. количество воды снижалось с декабря по февраль. Следует отметить, что в данном случае сортовые различия у образцов с различной морозостойкостью выражены более ярко. Так, морозостойкий сорт маслины Никитская и среднестойкий Асколяно характеризуются минимальной оводненностью побегов, в пределах 45-50%. У слабоустойчивых образцов содержание воды в побегах изменялось от 69 до 42%. Существенные различия были выявлены в оводненности апикальной и базальной частей побегов. У сортов Раццо, Кареджиоло, Асколяно и подвида *O. europea* subsp. *cuspidata* апикальные части побегов оводнены сильнее (на 18-25%), в то время как у сорта Никитская эта разница не превышает 13% и практически нивелируется во второй декаде января. Оценка состояния сортов маслины в периоды значительных похолоданий зимы 2015-2016 гг. (28 декабря – 6 января и 19-26 января) показала, что декабрьские морозы стали причиной повреждений листьев в виде краевых некрозов, причем их распространение базипетальное (исключение подвида *O. europea* subsp. *cuspidata*).

Обмерзание однолетних побегов отмечено только после действия погодных условий в третьей декаде января, распространение акропетальное. Повреждения листового аппарата в конце декабря – начале января отмечены у сортов Раццо (15%), Кареджиоло (менее 10%) и подвида *O. europea* subsp. *cuspidata* (15%). Более значительное обмерзание как листьев, так и побегов зафиксировано в конце января: Раццо (25% листьев, 2-4 см побеги), Кареджиоло (10% листьев), Асколяно (менее 10% листьев), Никитская (единичные повреждения листьев), *O. europea* subsp. *cuspidata* (25-30% листьев, 3-5 см побеги).

Окислительно-восстановительные процессы, протекающие в растении, играют важную роль при воздействии на растительный организм неблагоприятных факторов окружающей среды. Одним из ранних ответов на действие стресса является образование активных форм кислорода с высокой реакционной способностью, которые нарушают течение многих процессов в клетке, а также ее структуры. Для предотвращения таких нарушений в клетках существуют антиоксидантные системы, включающие как низкомолекулярные небелковые антиоксиданты (пролин, аскорбиновую кислоту, флавоноиды и др.), так и специфические ферменты-антиоксиданты (каталазу, супероксиддисмутазу, различные оксидазы, в том числе и ПФО и др.). Исследование особенностей функционирования антиоксидантных систем важно для понимания того, как растения адаптируются к измененным условиям среды [12].

При анализе активности ферментов окислительно-восстановительной системы (каталазы и ПФО) в зимний период 2015-2016 гг. у сортов маслины европейской и подвида *O. europea subsp. cuspidata* были выявлены как сходства, так и различия (табл. 2). Установлено, что изменение активности ПФО у всех изучаемых сортов, вне зависимости от степени их устойчивости к низким температурам, однонаправленно, в то время как динамика активности каталазы у сорта Никитская отличалась от таковой у остальных сортов.

Таблица 2

Активность окислительно-восстановительных ферментов маслины

Сорт	Дата	Активность каталазы, г O ₂ /г·мин	Активность ПФО, усл. ед/г·с
Асколяно	18.12.15	22,31±0,66	0,050±0,002
	28.12.15	2,76±0,08	0,256±0,008
	11.01.16	6,80±0,20	0
	21.01.16	5,53±0,16	0,080±0,002
	02.02.16	6,80±0,19	0,031±0,001
<i>O. europea subsp. cuspidata</i>	18.12.15	29,93±0,75	2,504±0,076
	28.12.15	1,91±0,06	0,632±0,019
	11.01.16	4,25±0,12	0,100±0,003
	21.01.16	5,95±0,16	0,772±0,023
	02.02.16	5,53±0,15	0,520±0,016
Кореджиоло	18.12.15	29,75±0,74	0,220±0,007
	28.12.15	2,55±0,07	0,282±0,008
	11.01.16	5,10±0,15	0,081±0,002
	21.01.16	2,98±0,07	0,154±0,005
	02.02.16	4,25±0,13	0,040±0,001
Раццо	18.12.15	30,60±0,90	0,602±0,019
	28.12.15	2,13±0,06	0,075±0,002
	11.01.16	5,10±0,15	0,020±0,001
	21.01.16	5,10±0,14	0,135±0,005
	02.02.16	9,35±0,28	0,067±0,002
	17.02.16	5,10±0,14	0,042±0,001
Никитская	18.12.15	26,78±0,81	0,134±0,005
	28.12.15	1,91±0,06	0,082±0,002
	11.01.16	2,55±0,08	0,010±0,001
	21.01.16	3,40±0,10	0,110±0,002
	02.02.16	8,93±0,26	0,012±0,001

Во второй декаде декабря максимальная активность каталазы отмечалась у слабоустойчивого сорта Раццо (30,6 г O₂/г·мин), а минимальная у среднестойкого сорта Асколяно (22,3 г O₂/г·мин). В дальнейшем наблюдалось резкое снижение каталазной активности (в 8-10 раз), и к концу декабря сортовые различия нивелировались, что вероятно связано с понижением температуры воздуха до отрицательных значений. По окончании действия морозного периода, длившегося с 28.12.2015 г. по 06.01.2016 г., когда среднесуточная температура была -3,2°C, а минимальная -6,2°C, наблюдалась интенсификация работы каталазы. Более ярко она была выражена у сортов с низкой морозостойкостью (активность каталазы возрастала на 50-60%). У морозостойкого сорта Никитская активность каталазы также возрастала, но в меньшей степени (на 25%). Вторая декада января и начало третьей характеризовались относительным потеплением – среднесуточные температуры составляли 4,8°C. Однако расчет эквивалентно-эффективных температур (ЭЭТ), являющихся суммарной

характеристикой комплексного действия гидротермических условий (влажность воздуха, скорость ветра, температуры) показал, что в течение 15 суток ЭЭТ находились в пределах $-4,5^{\circ}\text{C}$... $-11,2^{\circ}\text{C}$. В этот период у слабоустойчивых сортов активность каталазы снижалась (на 20-40%), либо оставалась на прежнем уровне. В то же время, у сорта Никитская активность продолжала возрастать (на 25%). Таким образом, изменение активности каталазы, вероятно, является показателем стрессового состояния растений и чем сильнее эти изменения проявляются, тем менее устойчиво растение к низким температурам. У сорта Никитская эти изменения носили более плавный характер, что может быть свидетельством развития адаптационного синдрома.

При анализе активности ПФО наблюдалась несколько иная картина. Во второй декаде декабря максимальная активность этого фермента была выявлена для *O. europea* subsp. *cuspidata* (2,50 усл. ед/г·с), а минимальная у сорта Асколяно (0,05 усл. ед/г·с). Морозная погода в конце декабря – начале января стала причиной снижения активности ПФО у всех сортов. Во время похолодания в конце января наблюдалось дальнейшее снижение активности ПФО, при этом нами не выявлено однозначной связи со степенью морозостойкости.

В научной литературе, посвященной вопросам морозостойкости растений, неоднократно отмечалась роль фенольных соединений, что обусловлено их высокой биологической активностью и широким разнообразием функций, выполняемых ими в растительном организме, в частности – участием в процессах регуляции роста и ферментативной защиты растения от окислительной токсичности [5]. Выявление роли фенольных соединений в низкотемпературной устойчивости сортов маслины европейской актуально, поскольку для этого вида характерна активизация ростовых процессов при определенных условиях в осенний период на ЮБК, что в свою очередь отрицательно сказывается на их морозостойкости.

Результаты анализа суммарного содержания фенольных соединений в тканях листьев сортов маслины с различной степенью устойчивости к отрицательным температурам в условиях зимы 2015-2016 гг. (табл. 3) не выявили четкой зависимости между изменением концентрации этих веществ и степени устойчивости изучаемых сортов. Наиболее высокий уровень содержания фенольных соединений до первого значительного понижения температуры воздуха до отрицательных значений наблюдался для сортов Никитская и Асколяно. Для всех сортов отмечена общая тенденция к увеличению содержания фенольных соединений с декабря по январь и незначительное снижение их концентрации в первой декаде февраля. При этом для сортов Никитская и Асколяно в конце декабря (при первом понижении температуры) содержание фенольных соединений достигало минимума. Существенные различия были выявлены при оценке зимней динамики концентрации флавонолов. Показано, что до первого значительного понижения температуры воздуха до отрицательных значений максимальной концентрацией флавонолов отличались сорта Асколяно и Раццо. В конце третьей декады декабря, когда началось понижение температуры воздуха и до начала февраля (в течение всего морозного периода) отмечалось увеличение концентрации флавонолов, причем наиболее существенно у сортов с низкой морозостойкостью. В частности, у слабоустойчивого *O. europea* subsp. *cuspidata* концентрация флавонолов в тканях листьев в третьей декаде января была практически в 2,5 раза выше, чем у устойчивого сорта Никитская, не смотря на практически одинаковое содержание этих соединений до понижения температуры. Необходимо отметить, что концентрация флавонолов в тканях листа у изучаемых сортов сопоставима со степенью их повреждения.

Таблица 3

Содержание некоторых БАВ в листьях маслины

Сорт	Дата	Содержание			
		фенольных веществ, мг/100 г	флавонолов, мг/100 г	аскорбиновой кислоты, мг/100 г	пролина, мкг/ г
Асколяно	18.12.15	1243±35	195±6	23,41±0,70	8,63±0,25
	28.12.15	1189±33	255±7	30,14±0,90	9,03±0,27
	11.01.16	1228±36	468±13	20,24±0,59	3,92±0,10
	21.01.16	1360±37	578±16	21,78±0,65	12,56±0,36
	02.02.16	1197±34	448±12	19,36±0,56	8,63±0,25
<i>O. europea subsp. cuspidata</i>	18.12.15	1212±35	121±3	11,09±0,32	8,63±0,24
	28.12.15	1243±36	250±7	22,70±0,67	5,10±0,15
	11.01.16	1243±35	806±23	18,30±0,54	5,49±0,16
	21.01.16	1399±40	897±25	20,09±0,58	25,12±0,73
	02.02.16	1305±38	825±24	20,68±0,59	16,48±0,49
Кореджиоло	18.12.15	1080±30	97±3	10,56±0,30	23,55±0,70
	28.12.15	1181±34	127±3	18,70±0,56	3,92±0,10
	11.01.16	1220±35	351±10	12,14±0,36	1,57±0,04
	21.01.16	1321±38	458±13	14,52±0,42	12,17±0,35
	02.02.16	1259±35	367±10	17,60±0,54	9,03±0,26
Раццо	18.12.15	1165±33	191±6	22,26±0,66	13,34±0,37
	28.12.15	1204±34	221±6	22,04±0,65	5,49±0,16
	11.01.16	1235±35	445±12	14,08±0,42	2,75±0,08
	21.01.16	1336±39	533±15	18,26±0,54	23,94±0,71
	02.02.16	1228±34	442±12	18,92±0,57	15,70±0,46
Никитская	18.12.15	1259±36	133±4	23,63±0,70	21,35±0,61
	28.12.15	1158±32	139±4	27,98±0,83	6,28±0,18
	11.01.16	1212±34	283±8	17,95±0,53	3,53±0,10
	21.01.16	1298±37	370±11	18,48±0,55	19,62±0,58
	02.02.16	1243±34	302±9	18,70±0,56	7,06±0,20

Учитывая, что следствием влияния на растение неблагоприятных факторов является окислительный стресс, как протекторное соединение, представляет интерес аскорбиновая кислота – наиболее распространенный антиоксидант в растениях. Известно, что это соединение, являясь регулятором клеточного роста и кофактором многих ферментов, принимает непосредственное участие в процессах фотосинтеза, дыхания и роста растений [13]. Результаты анализа содержания аскорбиновой кислоты в тканях листьев сортов маслины с различной степенью устойчивости к отрицательным температурам в условиях зимы 2015-2016 гг. зависимости между изменением концентрации этого соединения и степени устойчивости изучаемых сортов не выявили. Наиболее высокий уровень содержания аскорбиновой кислоты до первого значительного понижения температуры воздуха наблюдался для сортов Никитская и Асколяно. Для всех сортов отмечена общая тенденция к увеличению содержания аскорбиновой кислоты в конце декабря (при первом понижении температуры) и понижению – во второй декаде января. При этом для большинства сортов, за исключением наиболее устойчивых – Никитская и Асколяно, со второй декады января до начала февраля отмечалось повышение содержания аскорбиновой кислоты.

Еще одним важным параметром стрессового состояния растения считается изменение концентрации пролина в тканях. Известно, что у многих видов высших растений различного происхождения концентрация этого вещества увеличивается при нарастающем действии стрессора [11]. Установлено, что концентрация пролина

возрастала с декабря по февраль у слабостойкого *O. europea* subsp. *cuspidata* и достигала более высоких значений по сравнению с остальными изучаемыми сортами. Выявлено, что у сортов маслины европейской в периоды существенных похолоданий уровень пролина возрастал, причем значительно у сортов с низкой устойчивостью.

Выводы

Полученные данные позволяют высказать обоснованное предположение об участии каталазы в реализации механизмов низкотемпературной устойчивости сортов маслины европейской, и возможности использования таких параметров как концентрации флавонолов и пролина в качестве характеристики стрессового состояния сортов при неблагоприятных условиях зимнего периода. Сорта маслины с относительно низкой морозостойкостью отличаются более резкими колебаниями оводненности тканей в зимний период.

Список литературы

1. Агрокліматичний довідник по території України / под. Ред. Т.І Адаменко, М.І. Кульбіді, А.Л. Прокопенко. – Кам'янець Подільський, 2011. – 108 с.
2. Андрющенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм *Lycopersicon* Tourne // Изв. АН МССР. – 1981. – № 4. – С. 55-60.
3. Воскресенская О.Л., Алябышева Е.А., Половникова М.Г. Большой практикум по биоэкологии. Ч. 1: учеб. пособие. – Йошкар-Ола, 2006. – 107 с.
4. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, 1987. – С. 43–44.
5. Запретов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. – М.: Наука, 1993. – 272 с.
6. Корсакова С.П. Обзор стихийных гидрометеорологических явлений в районе Никитского ботанического сада // Сборник науч. трудов ГНБС. – 2014. – Т. 139. – С. 79-93.
7. Кушниренко М.Д., Курчатова Г.П., Крюкова Е.В. Методы оценки засухоустойчивости плодовых растений. – Кишинёв: Штиинца, 1976. – 21 с.
8. Методы теххимического контроля в виноделии / под ред. Гержиковой В.Г. – Симферополь: Таврида, 2002. – 259 с.
9. Минаева В.Г. Флавоноиды в онтогенезе и их практическое использование. – Новосибирск: Наука, 1978. – 270 с.
10. Пухтер А.А. Использование в селекции взаимосвязей биохимических признаков // Труды Гос. Никитск. ботан. сада. – 1999. – Т. 108. – С. 121-129.
11. Kavi Kishor, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Laxmi, P.S., Naidu, K. R., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance // Cur. Sci. – 2005. – Vol. 88 (3). – P. 424-438.
12. Miller R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. – 2002. – Vol. 7. – P. 405-410.
13. Smirnoff N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule // Curr. Opin. Plant Biol. – 2000. – Vol. 3. – P. 229-235.

Статья поступила в редакцию 25.10.2016 г.

Paliy A.Ye., Grebennikova O.A., Gubanova T.B., Paliy I.N. Variations of physiological and biochemical parameters of some *Olea europea* L. cultivars with different frost-resistance level // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2016. – № 121. – P. 32-39.

In terms of the research the water content and damage degree of leaf tissue and annual shoots were investigated, concentration of phenol combinations, flavanols, ascorbic acids and proline were determined; catalasa activity and polyphenol oxidase of some *O. europea* cultivars with different frost resistance level under conditions of South Coast of the Crimea were identified as well. Leaf water deficit of all cultivars ranges from 7 to 10%. Minimum shoot water content is typical for frost-resistant cultivar Nikitskaya and mid-frost-resistant Askolano. Considerable leaf and shoot freezing was fixed in the end of January. These findings make it possible to assume catalasa in the mechanism of frost-resistance typical for *O. europea* cultivars. At the same time the article covers possibility of such characteristics as concentration of flavonols and proline as parameters of stress conditions for cultivars in case of unfavorable conditions during wintering.

Key words: *olive; low temperature-resistance; water deficit; ferment activity; phenol combinations; ascorbic acid; proline.*

УДК 635.631.524:581.1:58.056

ОЦЕНКА АДАПТИВНОСТИ КРАСИВОЦВЕТУЩИХ РАСТЕНИЙ К СТРЕСС-ФАКТОРАМ СУБТРОПИКОВ РОССИИ

Оксана Геннадьевна Белоус^{1,2}, Валентина Ивановна Маляровская¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур», Сочи
354202, Россия, Сочи, ул. Я. Фабрициуса, 2/28
malyarovskaya@yandex.ru

²ЧОУ ВПО «Сочинский институт моды, бизнеса и права», Сочи
354000, Россия, Сочи, ул. Парковая, 17
oksana191962@mail.ru

В статье приведены результаты исследований устойчивости наиболее перспективных для зоны сортов *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.) и *Weigela × wagneri* L.H. Bailey). Отмечено, что для данных культур более значимыми являются такие показатели водного режима, как водный дефицит, концентрация клеточного сока, оводненность, а также, активность таких ферментов, как каталаза и пероксидаза. Выявлено, что на фоне повышения стрессовых факторов (температуры, влажности воздуха и почвы) особенно резко проявлялись сортовые различия в параметрах водного режима и активности ферментов. Стрессовое влияние гидротермических факторов у неустойчивых сортов приводило к сбрасыванию листьев и ухудшению декоративности. Разработаны оценочные шкалы, в которых представлены параметры, характеризующие физиологическое состояние сортов *Hydrangea macrophylla* и *Weigela × wagneri* в оптимальный период и в период стресса.

Ключевые слова: *Hydrangea macrophylla; Weigela × wagneri; сорта; засухоустойчивость; ферментативная активность*

Введение

Черноморское побережье Краснодарского края относится к зоне нерегулярного водообеспечения, в связи, с чем вопросы водного режима для многих декоративных субтропических культур, интродуцированных в данный регион, являются весьма актуальными. Летний период в нашей зоне характеризуется неравномерностью выпадения осадков, высокой температурой воздуха и лимитом доступной почвенной влаги, что отрицательно сказывается на декоративности многих культур. Первостепенное значение в развитии декоративного садоводства имеет разработка научно обоснованного подбора культур и использования лучших сортов и садовых

форм, отвечающих современным требованиям и наиболее приспособленных к условиям влажных субтропиков России [2, 3, 9].

Перспективными для использования в озеленении культурами, чутко реагирующими на дефицит водообеспеченности, являются гидрангея крупнолистная (*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.) и вейгела х Вагнера (*Weigela* × *wagneri* L.H. Bailey). Однако, одним из лимитирующих факторов, существенно осложняющим их возделывание в качестве декоративных растений в рассматриваемом регионе, является периодически повторяющийся дефицит влаги в период вегетации. Периодичность этого явления обусловлена регулярно случающимися засухами как почвенными, так и атмосферными.

В Краснодарском крае гидрангея наиболее полно представлена в районе Большого Сочи, где в настоящее время культивируются 7 видов, из которых только 4 вида распространены массово [7]. Одним из самых декоративных и наиболее распространенных является гидрангея крупнолистная (*H. macrophylla*), представленная у нас около 50 сортами и садовыми формами [7, 9]. Анализ биоэкологических характеристик гидрангеи крупнолистной указывают на то, что почвенно-климатические условия влажных субтропиков России в целом благоприятны для этого растения, в то же время, не все сорта показывают достаточную степень адаптации. Необходимо отметить, что гидрангея крупнолистная, относящаяся к растениям влажного климата, менее устойчива к засухе, чем растения, произрастающие в сравнительно сухих местах, отличаясь от них и физиологически, и анатомически. Культура характеризуется крупными размерами соцветий, нуждающихся в значительных количествах воды, своеобразным строением побегов, значительная часть которых представлена губчатой сердцевинной. К тому же, как у дикорастущих растений гидрангеи крупнолистной, так и у культивируемых, слабая поверхностная корневая система. мочковатые корни растений распространяются в почве до глубины 40 см, что недостаточно для стабильного обеспечения растений водой в период вегетации [9]. В связи с этим гидрангея крупнолистная нормально развивается и сохраняет декоративность только при наличии достаточного количества влаги в почве и высокой относительной влажности воздуха в период вегетации. Однако, как показывает обзор литературных источников, вопросы оптимального водообеспечения гидрангеи крупнолистной не изучены [9, 10]. Это связано с тем, что гидрангею в открытом грунте культивируют, преимущественно, в тех странах, где атмосферных осадков более чем достаточно для ее нормального развития, и изучение ее водного режима там не является актуальным. Не является актуальным изучение водного режима этой культуры и на большей части территории России, где она обычно выращивается как оранжерейно-комнатное растение.

Род Вейгела (*Weigela* Thunb.) принадлежащий к сем. Жимолостные (*Caprifoliaceae* Vent.), включает около 15 видов из Восточной и Юго-восточной Азии (от Южных Курил, берегов Охотского моря и Буреинского нагорья до юго-западного Китая), в том числе один вид на острове Ява [7, 12]. В условиях нашего региона в настоящее время культивируются, в основном, 24 сорта гибридного происхождения, известные как вейгела садовая (*W. hortensis* C.A. Mey.) или вейгела × Вагнера (*W.* × *wagneri*). В озеленении парков и скверов широко используются сорта преимущественно старой селекции, например такие как: '*Gustave Malet*' (1868), '*Kosteriana Variegata*' (1871), '*Monsieur Lemoine*' (1868) и некоторые другие, которые обладают высокими декоративными качествами [12]. Многолетние наблюдения за различными сортами вейгелы показали, что не все имеющиеся в регионе сорта достаточно адаптированы к абиотическим условиям влажных субтропиков России. Уровень их адаптации различен и определяется, как степенью воздействия лимитирующих факторов, так и

морфофизиологическими характеристиками сортов. Особенностью вейгелы является неглубокая, мочковатая корневая система, состоящая из относительно тонких придаточных корней [12]. Кроме того, мезоморфные листья этого растения плохо удерживают воду и при недостатке влаги в почве (в летний засушливый период) подвядают, вплоть до полного их опадания.

Следовательно, подбор и интродукция сортов гидрангеи крупнолистной (*H. macrophylla*) и вейгела × Вагнера (*W. × wagneri*), адаптационный потенциал которых соответствовал бы конкретным условиям рассматриваемого региона, представляется актуальным.

Исходя из этого, цель исследования заключается в изучении реакции растений гидрангеи и вейгелы на стрессовые погодно-климатические факторы Черноморского побережья Краснодарского края (высокие температуры воздуха и низкая водообеспеченность периода вегетации) для интродукции и отбора новых сортов, адаптированных к условиям влажных субтропиков России.

Объекты и методы исследования

Объектами исследований являлись перспективные с разной степенью устойчивости к стресс-факторам региона сорта *H. macrophylla*: 'Bichon' (*Hortensia* Group), 'Madame Maurice Hamard' (*Hortensia* Group), 'Draps Wonder' (*Hortensia* Group) 'Mariesii Perfecta' (*Lacecap* Group), for. rosea (*Lacecap* Group) и *W. × wagneri*: 'Avgusta', 'Kosteriana Variegata', 'Eva Ratke', 'Mont Blanc', 'Arlequin' и 'Gustave Male'. Контрольным сортом для исследований по устойчивости гидрангеи служили растения самого распространенного в регионе сорта 'Madame Faustin Travoillon' (*Hortensia* Group), а контролем для вейгелы × Вагнера - 'Avgusta'

Поставленные задачи решались на уровне полевых и лабораторных исследований с использованием методов математического моделирования и статистики. Для диагностики устойчивости растений использовали физиологически сформировавшийся лист, которым в случае гидрангеи является третий по счету, начиная от верхушечной почки. Для физиолого-биохимических анализов отбирали по 35...60 штук листьев с каждого варианта (7 - 8 кустов каждого сорта) с учетом экспозиции куста (т.е. с четырех сторон). В наших исследованиях определение водного статуса растений осуществляли следующими классическими методами: водный дефицит – сравнением содержания воды в отобранных листьях с количеством ее в этих же листьях, находящихся в состоянии полного насыщения водой [1]; концентрацию клеточного сока (ККС) - рефрактометрическим методом Л.А. Филиппова (1975) с использованием полевого рефрактометра R-1, с одновременной регистрацией температуры и влажности воздуха психрометром Ассмана [16]; коэффициент засухоустойчивости (Т2/Т1) - по методу М.Д. Кушниренко (1986) [8]. Динамику активности каталазы изучали газометрическим методом [6], определение фотосинтетических пигментов спектрофотометрическим методом [17].

Обработка экспериментального материала проводилась методами корреляционного, регрессионного и кластерного анализов, а также, описательной статистики с использованием математических программ, разработанных во ВНИИА им. Д. Н. Прянишникова (Agrochim), программ STATGRAPHICS Centurion XV и базового блока Microsoft Excel.

Результаты и обсуждения

При изучении устойчивости любой культуры не всегда возможно моделирование или воссоздание тех неблагоприятных факторов, которые определяют степень адаптивности растений [2, 5]. Не случайно в настоящее время широко

применяются физиолого-биохимические методы, основывающиеся на лабораторно-полевой оценке растений по ряду параметров, что дает возможность не только легко создавать искусственные условия стресса, но и использовать экспресс-методики в полевых условиях [3, 5, 15]. При этом важным является регистрация таких погодно-климатических условий, которые лимитируют расширение территории выращивания культур. В нашем случае, это гидротермические условия вегетационного периода. Так, за период исследования нами отмечено, что в оптимальный период вегетации (май-первая декада июня) температура воздуха колебалась в пределах 21,2 – 24°C, влажность воздуха - 80-85% и влажность почвы составляла в среднем 35,7±7,4%. Стрессовый период в зоне влажных субтропиков приходится на июль – август, во время которого температура воздуха поднимается до 32-36°C и выше, при незначительном снижении влажности воздуха (78-80%) и падении влажности почвенного слоя до 21-25%. Именно в данных условиях нами на протяжении восьми лет велся подбор тест-показателей для характеристики чувствительности различных сортов гидрангеи крупнолистной и вейгелы х Вагнера к стресс-факторам региона. К числу диагностических показателей относятся такие физиолого-биохимические характеристики, как показатели водного режима, ферментативной активности, стабильности пигментной системы и т.д. [10, 11, 13, 14; 15].

Многолетние исследования, послужившие базой для написания данной статьи, кроме проведения морфологических и физиолого-биохимических наблюдений, включали полный статистический анализ данных с использованием программных блоков Agrochim и STATGRAPHICS. В результате нами получены базы коррелятивных, регрессионных и кластерных данных с просчетами всех статистических показателей (среднее, стандартное отклонение, ошибка средних, мода, дисперсия, вариация, доверительные интервалы для всех исследуемых характеристик). Так как по данным изучения адаптивного потенциала красивоцветущих растений защищена диссертация [9], опубликованы методические рекомендации по их диагностике [10, 11] и ряд публикаций биостатистического характера [4, 14, 15, 18], в данной статье мы остановимся только на некоторых моментах проведенных исследований без подробного предоставления емкой аналитической базы.

В результате проведенных исследований не выявлено значимой коррелятивной зависимости между физиолого-биохимическими параметрами и влажностью воздуха, в связи с тем, что данный фактор в зоне влажных субтропиков в течение круглого года, благодаря близости моря близок к состоянию насыщения, составляя 75 – 85% (табл. 1).

Таблица 1

Корреляционная матрица зависимости некоторых физиолого-биохимических показателей и гидротермических факторов

Показатели	Температура, °С	Влажность почвы, %	Относительная влажность воздуха, %
Коэффициент засухоустойчивости (T2/T1), ед.	-0,74	0,85	0,43*
Водный дефицит, %	0,88	-0,63	-0,41*
ККС листьев, %	0,73	-0,45*	-0,28*

*Корреляция < 0,50 считается низкой и статистически не значима

Однако многолетними наблюдениями были выявлено наличие коррелятивной связи между гидротермическими факторами (температура воздуха и влажность почвы) и показателями, характеризующими водный статус культур (водный дефицит,

концентрация клеточного сока (ККС) листьев, коэффициент засухоустойчивости – T2/T1), активностью каталазы, мощностью пигментного аппарата (табл. 1 и 2).

Таблица 2

Корреляционная матрица зависимости некоторых физиолого-биохимических показателей между собой

Показатели	Водный дефицит, %	Каротиноиды, мг/г	ККС, %
Каталаза, мг O ₂ /г	0,84	0,29*	0,76
Каротиноиды, мг/г	0,65	-	0,37*
ККС, %	0,94	0,37*	-

*Корреляция < 0,50 считается низкой и статистически не значима

Как известно, наибольшую потребность во влаге растения испытывают в период цветения [4, 12, 13]. Обезвоживание в это время приводит к нарушению нормального роста и развития растений, что у красивоцветущих кустарников может привести к потере декоративности. Устойчивость растений к стрессовому состоянию потенциальна, проявляется и реализуется только в неблагоприятных ситуациях [4, 14]. При этом уровень адаптивности растений определяется, прежде всего, степенью воздействия лимитирующих факторов и особенностями вегетационного периода. Поэтому оценка способности гидрангеи крупнолистной и вейгела × Вагнера поддерживать оптимальный водный обмен в стрессовых условиях играет важную роль при интродукции новых сортов.

В этом случае важную роль играет диагностика водного статуса растений. Водный режим растений характеризуется следующими основными показателями: водным дефицитом (ВД), водоудерживающей способностью клеточных коллоидов (ВС), фракционным составом воды и концентрацией клеточного сока (ККС) [5, 8, 9].

При изучении водного статуса культуры гидрангеи крупнолистной (*H. macrophylla*) нами были получены данные по основным параметрам, характеризующим ее водный режим, в результате чего был выделен ряд физиологических показателей, тесно связанных с особенностями водообмена растений, составлена шкала параметров водного режима листьев для сравнительной оценки засухоустойчивости сортов гидрангеи, как в оптимальных, так и в стрессовых условиях (табл. 3).

Таблица 3

Шкала изменения параметров водного режима листьев для сравнительной оценки засухоустойчивости сортов гидрангеи крупнолистной (*H. macrophylla*)

Условия оценки	Параметры	Степень устойчивости		
		высокая	средняя	низкая
Оптимальные условия	Оводненность листьев, %	82 - 84	78 - 81	< 75
	Водный дефицит, %	5 - 9	10 - 12	> 12
	ККС в листьях, %	≤ 8	≤ 8	≤ 8
В период стресса	Оводненность листьев, %	78 - 80	73 - 77	< 72
	Водный дефицит, %	10 - 15	16 - 20	> 20
	ККС в листьях, %	9 - 12	13 - 15	> 16
Уровень значимости (P), %		95		
Объем выборки, n		144		

Выяснено, что в оптимальный период листья устойчивых сортов гидрангеи крупнолистной содержат воды 80 % и выше, водный дефицит в них не превышает 10%. В то же время, у менее устойчивых сортов оводненность тканей листа составляет от 78 до 80%, водный дефицит – от 10 до 12%. При этом, концентрация клеточного сока (ККС) в листьях гидрангеи крупнолистной в оптимальный период держится на уровне не выше 8%, независимо от степени устойчивости сорта. В период действия стрессоров у относительно устойчивых к засухе сортов оводненность падает не ниже 78%, а водный дефицит возрастает до 12%. У сортов средней устойчивости оводненность снижается до 76%, водный дефицит возрастает до 15 %, а ККС повышается до 12-13%. У незасухоустойчивых сортов показатель оводненности понижается ниже 75%, водный дефицит листьев повышается выше 25%, а ККС превышает 15-20%.

Необходимо также отметить, что период наибольших различий между сортами гидрангеи крупнолистной по показателям, характеризующим засухоустойчивость, приходится на фазу цветения, что совпадает с засушливым периодом (с III-декады июля по II-декаду августа) на Черноморском побережье Краснодарского края (район Большого Сочи). Таким образом, данная шкала позволяет дифференцировать сорта гидрангеи крупнолистной на группы разной степени засухоустойчивости [14]. Кроме этого, ее можно использовать для эколого-физиологической оценки растений.

Аналогично для другой культуры (*Weigela × wagneri* L.H. Bailey) по результатам исследований водного статуса, также была разработана оценочная шкала, в которой представлены параметры, характеризующие физиологическое состояние культуры в оптимальный период и в период стресса (табл. 4).

Таблица 4

Шкала изменения параметров водного режима листьев для сравнительной оценки засухоустойчивости сортов вейгелы × Вагнера (*W. × wagneri*)

Условия оценки	Параметры	Степень устойчивости		
		высокая	средняя	низкая
1	2	3	4	5
Оптимальные условия	Водный дефицит, %	≤8,0	≤8,0	≤8,0
	Концентрация клеточного сока листьев, %	≤7,0	≤7,0	≤7,0
	Коэффициент засухоустойчивости (T2/T1), ед.	0,8-0,9	0,8-0,9	0,8-0,9
В период стресса	Водный дефицит, %	15-17	18-19	≥20
	Концентрация клеточного сока листьев, %	15-17	18-19	≥20
	Коэффициент засухоустойчивости (T2/T1), ед.	≥0,80	0,6-0,7	≤0,50
Уровень значимости (P), %		95		
Объем выборки, n		126		

У устойчивых сортов вейгелы усиление водного дефицита менее значительно (14,4-16,7%) по сравнению с неустойчивыми сортами, у которых нарастание водного дефицита отмечалось уже в конце оптимального для остальных сортов периода, что обусловило в дальнейшем значительно меньший коэффициент вариации (в пределах 25-26%). Особенно резко сортовые различия проявлялись на фоне повышения стрессовых факторов (температура в августе до 33,4°C, влажность воздуха – 79% и почвы – 23%). ККС листьев у устойчивых сортов составляла в

среднем 18,3%, в то время как у неустойчивых на 3% выше. Критические значения ККС листьев у этих красивоцветущих кустарников, сопровождаемые негативными морфологическими изменениями, составляют 15%. В условиях почвенной засухи на фоне повышения температуры воздуха при ККС листьев выше 20% у неустойчивых сортов вследствие потери тургора и сбрасывания листьев наблюдалось ухудшение декоративности.

Исследование фотосинтетического аппарата гидрангеи крупнолистной показало, что динамика каротиноидов, связанных с адаптивным механизмом защиты от стресса, выглядит следующим образом: максимум каротиноидов приходится на май, в дальнейшем, к июлю, происходит значительное (в 1,5 раза) снижение синтеза данной группы пигментов. Этот процесс связан с тем, что вегетация гидрангеи крупнолистной начинается в более ранние сроки (февраль - март) при достижении температуры воздуха выше 5°C. Следовательно, в момент достижения засушливого периода активные вегетативные процессы в растении затихают, что приводит к приостановке синтеза каротиноидов. В процессе накопления фотосинтетических пигментов четко проявляются и сортовые различия.

Установлено влияние гидротермических факторов на изменение ферментативной активности гидрангеи крупнолистной и вейгелы × Вагнера, а также выявлена корреляционная зависимость между активностью фермента и абиотическими факторами среды. Анализ активности каталазы в листьях гидрангеи крупнолистной и вейгелы × Вагнера выявил наличие аналогичных закономерностей: изменение ферментативной деятельности в ответ на изменение климатических условий, и в первую очередь, гидротермических факторов. Причем, максимальную активность фермент проявляет в благоприятный и по температурному, и по водному режиму период (май), к июлю уровень активности фермента падает в связи со стрессовым воздействием и к завершению вегетационного периода (август) наблюдается некоторое послестрессовое восстановление активности. Кроме того, нами выявлено, что и генетические особенности определяют интенсивность метаболических процессов в растениях, что сопровождается изменением активности каталазы. Так, устойчивые сорта характеризуются более активной каталазой, что имеет особое значение в период засух. В то же время, наибольшими значениями в период затухания вегетативных процессов, совпадающих с неблагоприятным по гидротермическим условиям периодом, отличаются неустойчивые сорта. Этот факт позволяет объяснить процесс завядания гидрангеи крупнолистной и потерю декоративности вейгелы × Вагнера, к чему может приводить накопление перекисей в листовых тканях и наступление значительного затяжного угнетения физиологических процессов под воздействием засушливого периода.

Выводы

Резюмируя изложенный материал, можно заключить, что использование физиологических методов в периоды низкой влажности почвы, воздуха и высоких температур позволяет установить влияние стрессоров абиотической природы на состояние гидрангеи крупнолистной (*H. macrophylla*) и вейгелы × Вагнера (*W. × wagneri*) и выявить особенности формирования ими устойчивости. По результатам исследований рассчитаны коэффициенты парной корреляции и на основе корреляционного анализа подобраны физиолого-биохимические показатели, предлагаемые для оценки адаптивности гидрангеи крупнолистной и вейгелы × Вагнера, и вошедшие в основу методических рекомендаций по диагностике функционального состояния этих культур. Учитывая тот факт, что каталаза является элементом механизма устойчивости растения в ответ на действие стресс-фактора, снижение ее

активности можно использовать для диагностики функционального состояния культур. В оценке гидрангеи крупнолистной преимущество принадлежит использованию расчетного коэффициента устойчивости признака T1/T2. Как показали наши исследования [4, 10, 11, 13, 18] этот показатель коррелирует с такими визуальными морфологическими признаками растений как жесткие, грубо морщинистые, темно-зеленые, толстые на ощупь листья, без видимых признаков увядания (в ряде работ нами показано, что корреляция между толщиной листа и коэффициентом устойчивости в течение вегетации находится в пределах от -0,8 до 0,9, в зависимости от степени увеличения толщины листовой пластинки, т.е. от насыщения клеток и тканей водой в различные периоды вегетации. При действии стрессоров (понижении влажности почвы до 21-25% и повышении среднесуточной температуры воздуха выше 30°C) корреляция между толщиной листа и коэффициентом устойчивости отрицательная (-0,8). При ослаблении действия стресс факторов на растения корреляция высокая положительная: 0,9). У растений с такими морфологическими признаками, даже без проведения дополнительных анализов (водный режим, ККС и т.д.), больше шансов оказаться устойчивыми в условиях рассматриваемого нами региона. Изучение эколого-физиологических особенностей гидрангеи крупнолистной и вейгелы × Вагнера, и влияния на них факторов среды привело к разработке оценочных шкал, в которых представлены параметры, характеризующие физиологическое состояние сортов в оптимальный период и в период стресса [10, 11].

В итоге, хочется отметить, что в регионе широко практикуется так называемая, парковая интродукция, когда привозной посадочный материал сразу высаживается на постоянные места на объектах озеленения. В таких случаях для получения положительных результатов следует пользоваться предложенными результатами наших исследований по оценке устойчивости сортов гидрангеи крупнолистной (*H. macrophylla*) и вейгелы × Вагнера (*W. × wagneri*).

Список литературы

1. Баславская С.С., Трубецкова О.М. Практикум по физиологии растений. – М.: МГУ, 1964. – С. 297-298.
2. Белоус О.Г., Белоус А.А. Оценка физиолого-экологического состояния растений олеандра // 165-летие Сухумского ботанического сада и 110-летие Сухумского субтропического дендропарка: Сборник трудов Сухумского ботсада. - Сухуми, Абхазия, 2006. – С. 38-40.
3. Белоус О.Г. Роль физиолого-биохимических исследований в декоративном садоводстве // Субтропическое и декоративное садоводство. - Сочи: ВНИИЦиСК, 2008. – Т. 41. – С. 346-352.
4. Белоус О.Г., Маляровская В.И. Использование кластерного анализа в сортовой диагностике субтропических растений // Горное сельское хозяйство. – 2015. – №2. – С. 81-88.
5. Гончарова Э.А. Водный статус культурных растений и его диагностика / Под ред. акад. В.А. Драгавцева. – СПб.: ВИР, 2005. – 112 с.
6. Гунар И.И. Практикум по физиологии растений. – М.: Колос, 1972. – 168 с.
7. Карпун Ю.Н. Субтропическое цветоводство России. – СПб.: ВВМ, 2012. – 198 с. - ISBN 978-5-9651-0696-7.
8. Кушниренко М.Д. Экспресс – метод диагностики жаро-засухоустойчивости и сроков полива растений. – Кишинев: Штиинца, 1986. – 8 с.
9. Маляровская В.И. Эколого-биологические особенности гидрангеи крупнолистной (*Hydrangea macrophylla* Ser.) в условиях влажных субтропиков России. Дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. – Краснодар, 2011. – 169 с.

10. *Маляровская В.И., Белоус О.Г.* Методические рекомендации по оценке засухоустойчивости гидрангеи крупнолистной (*Hydrangea macrophylla* Ser.) // Субтропическое и декоративное садоводство. – Сочи: ВНИИЦиСК, 2012. – Т.2 (47). – С. 228 – 245.

11. *Маляровская В.И., Белоус О.Г.* Методическое пособие по использованию физиолого-биохимических параметров для оценки устойчивости вейгелы (*Weigela × wagneri* L. H. Bailey) в условиях Черноморского побережья Краснодарского края // Субтропическое и декоративное садоводство. – Сочи: ВНИИЦиСК, 2015. – Т. 52. – С. 107-125.

12. *Маляровская В.И., Карпун Ю.Н.* Краткая историко-систематическая характеристика рода Вейгела (*Weigela* Thunb.) // Субтропическое и декоративное садоводство. – Сочи: ВНИИЦиСК, 2012. – Т. 47(2). – С. 73-77.

13. *Маляровская В.И., Белоус О.Г.* Концентрация клеточного сока в листьях гидрангеи крупнолистной (*Hydrangea macrophylla*) при разных режимах температуры и влажности // Сельскохозяйственная биология. – 2009. – №3. – С. 48-51.

14. *Маляровская В.И., Белоус О.Г.* Водный статус гидрангеи крупнолистной (*Hydrangea macrophylla* (Thunb) Ser.) в условиях влажных субтропиков России // *Stredoevropsky Vestnik pro Vedu a Vyzkum*, 2015. – Т.54. – С. 89.

15. *Рындин А.В., Белоус О.Г., Маляровская В.И., Притула З.В., Абилюфазова Ю.С., Кожевникова А.М.* Использование физиолого-биохимических методов для выявления механизмов адаптации субтропических, южных плодовых и декоративных культур в условиях субтропиков России // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – №3. – С. 40-48.

16. *Филиппов Л.А.* Рефрактометрический метод и принципы диагностирования сроков полива чайных плантаций // Водный режим и орошение плодовых и субтропических культур в горных условиях. – Сочи: ВНИИЦиСК, 1975. – Вып. 21. – С. 102-122.

17. *Шлык А.А.* Определение хлорофилла и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев. Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. Павлиновой О.А. М.: Наука, 1971. – С. 15 -170.

18. *Belous O., Malyarovskaya V., Klemeshova K.* Diagnostics of subtropical plants functional state by cluster analysis/ *Potravinarstvo©Scientific Journal for Food Industry* (ISSN: 1338-9971). – 2016. – Vol. 10, N 1. – P. 237-242. doi: 10.5219/526

Статья поступила в редакцию 15.07.2016 г.

Belous O.G., Malyarovskaya V.I. Adaptability rate of the ornamental shrubs to stress factors of Russia subtropics // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2016. – № 121. – P. 39-47.

Resistance of the most promising for the zone cultivars *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.) and *Weigela × wagneri* L.H. Bailey) was investigated in terms of the research. Water deficit, concentration of cell sap, and activity of such ferments as catalase and peroxidase are the most significant points for given crops. It was found out that sorts variations of water economy and ferment activity level become more intensive if stress factors (temperature, air humidity and soil) grow up. Abiotical factors stress effect on unstable cultivars causes leaf falling and decreases ornamental capacity. Rating scale, developed in terms of the research, includes parameters that characterize physiological state of *H. macrophylla* and *W. × wagneri* during peak stress period.

Key words: *Hydrangea macrophylla*; *Weigela × wagneri*; sorts; drought-resistance; enzymatic activity.

УДК 634.25:57.085.2

ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ МИКРОПОБЕГОВ НЕКОТОРЫХ СОРТОВ ПЕРСИКА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO***Ольга Владимировна Митрофанова, Ирина Вячеславовна Митрофанова,
Нина Павловна Лесникова-Седошенко, Сергей Владимирович Долгов**Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Россия, г. Ялта, пгт Никита, ул. Никитский спуск, 52
invitro_plant@mail.ru

Изучены морфогенетические потенции органов и тканей 5 сортов персика для разработки системы регенерации персика *in vitro*. Показана возможность получения асептической культуры при применении 1% раствора Thimerosal, 0,5% раствора препарата “Дез ТАБ” и 0,4% раствора цефотаксима. Разработаны приемы регенерации микропобегов из меристем и апексов активно растущих побегов. Частота регенерации повышалась при культивировании на питательных средах, дополненных регуляторами роста БАП в концентрации 0,5 – 1,5 мг/л и ИМК – 0,1 – 0,2 мг/л.

Ключевые слова: *Prunus persica* (L.) Batsch; эксплант; питательная среда; культура органов и тканей; регуляторы роста; морфогенез

Введение

Персик [*Prunus persica* (L.) Batsch], род *Prunus* L., семейство Rosaceae Juss. является основной промышленной косточковой плодовой культурой в мире. Важнейшими регионами выращивания персика в России считаются Крым и Северный Кавказ. Высокая пищевая ценность и наличие биологически активных веществ, содержащихся в плодах, сделали эту культуру необходимым продуктом питания. Тем не менее, выращивание персика, особенно в последние годы, сопряжено с широким распространением наиболее опасного вируса косточковых плодовых культур – *Plum pox potyvirus* (PPV), причиняющего значительный экономический ущерб насаждениям персика [6, 11, 13]. Кроме персика, вирус поражает многие виды рода *Prunus* и более 60 видов травянистых растений [14]. Известные и применяемые традиционные мероприятия по борьбе с вирусом шарки сливы, такие как фитосанитарный контроль, обнаружение пораженных деревьев, их выкорчевка и сжигание, борьба с насекомыми-переносчиками PPV, только ограничивают распространение возбудителя болезни. Поиск устойчивых к PPV промышленных и коллекционных сортов персика не привел к положительным результатам. Альтернативой является создание безвирусного посадочного материала персика и устойчивых к PPV сортов методами биотехнологии и генетической инженерии. Для решения данной проблемы, прежде всего, необходима эффективная и надежная система регенерации микропобегов персика из соматических тканей в условиях *in vitro* [2, 15, 16]. Как известно, персик является одной из самых трудно размножаемых культур в условиях *in vitro* [8, 15].

Целью данного исследования было изучение морфогенетических потенций органов и тканей 5 сортов персика для разработки системы регенерации данной культуры в условиях *in vitro*.

Объекты и методы исследования

Исследования выполняли в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений отдела биологии развития растений, биотехнологии и биобезопасности Никитского ботанического сада (НБС).

В качестве объектов исследований были взяты 5 сортов персика [*Prunus persica* (L.) Batsch], отобранные из генофондовой коллекции НБС – 2 отечественной ('Посол Мира', 'Родзынка') и 3 – зарубежной ('Ambergold', 'Dixired', 'Red Haven') селекции, предварительно протестированные на отсутствие вируса шарки сливы – *Plum pox potyvirus* методами (DAS) ELISA и PCR-анализа [4, 11]. Для экспериментов по микроразмножению были использованы 2 типа эксплантов: меристемы, изолированные из вегетативных почек, отобранные с января по декабрь, и апексы активно растущих побегов размером 1,0 – 1,5 см – в июне – июле. Опыты по культуре *in vitro* проводили согласно методикам Р.Г. Бутенко (1964) [1], О.В. Митрофановой и др. [3], Л. Куте [9]. Для получения асептической культуры эксплантов персика применяли 70% C₂H₅OH, 1% раствор фунгицида Thimerosal ("Merk", Германия), 0,2 – 0,5% раствор препарата "Дез ТАБ" (Китай), 0,4% раствор антибиотика цефотаксима (Республика Беларусь). В растворы каждого реагента добавляли 1 – 2 капли детергента Tween-20 для снятия поверхностного натяжения и лучшего воздействия на растительные ткани. После каждого реагента экспланты 3 – 4 раза промывали стерильной дистиллированной водой.

В экспериментах по морфогенезу и регенерации микропобегов использовали агаризованные питательные среды MS (Murashige, Skoog, 1962) [12] и B5 (Gamborg, Eveleigh, 1968) [7]. На основе базовой питательной среды B5 модифицировано 3 варианта сред PM, PE, PR, содержащие регуляторы роста растений для разных этапов морфогенеза исследуемых сортов. В качестве индуктора морфогенеза и регенерации эксплантов использовали БАП в различных концентрациях. На этапе введения изолированных меристем в условия *in vitro* применяли среду PM с добавлением 1,0 мг/л БАП, 0,15 мг/л ИМК и 0,5 мг/л ГК₃. Апексы (верхушки) активно растущих побегов культивировали на среде PE, содержащей БАП в концентрации 1,0; 1,25; 1,5 мг/л и 0,1 мг/л ИМК. Регенерацию микропобегов инициировали на среде PR с 0,5; 0,75; 1,0 мг/л БАП и 0,1-0,2 мг/л ИМК. Меристемы размером 0,5 мм вычленили из вегетативных почек под бинокулярным микроскопом Nikon SMZ 745T (Япония). Первичные экспланты (меристемы и апексы активно растущих побегов) помещали в пробирки на питательные среды PM и PE с добавлением рибавирина (1-β-D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazole-carboxamide, "Sigma", США) в концентрации 10 мг/л (для элиминации возможной вирусной инфекции). Для индукции морфогенного каллуса использовали агаризованные питательные среды M1 (1,0 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИМК) [16]; Aa₂ (0,5 мг/л кинетина и 1,0 мг/л НУК), RG2 (1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК) и RG7 (1,3 мг/л TDZ) на основе базовой среды MS. pH среды доводили до 5,7 – 5,8 при помощи 1.0 н. КОН или 1.0 н. HCl до введения агара и автоклавировали при 120°C в течение 5 – 15 минут. Субкультивирование проводили через 2 – 4 недели. Культуральные сосуды содержали в климатической камере (Panasonic MLR-352-PE) при 25±1°C, 16 часовом фотопериоде при освещении холодным белым светом флуоресцентных ламп (Philips TL, 40 W) интенсивностью 37,5 μmol m⁻²s⁻¹.

Обработку данных осуществляли с помощью программы STATISTICA for Windows, 6.0 (StatSoft, Inc. 1984 – 2001).

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что решающее значение при изучении морфогенетических потенциалов органов и тканей и регенерации сортов персика Посол

Мира, Родзынка, Ambergold, Dixired и Red Haven в условиях *in vitro* имеют генотип, сроки отбора эксплантов, условия стерилизации, тип и концентрация регуляторов роста в питательной среде. Вегетативные почки и апексы активно растущих побегов были отобраны в разные фазы вегетации с внешне бессимптомных растений, предварительно протестированных на отсутствие вируса *Plum pox potyvirus*. Нами установлено, что среди изученных сроков отбора вегетативных почек и введения меристем в культуру *in vitro* лучшими были февраль – март и ноябрь – декабрь (рис. 1), а для апексов активно растущих побегов – июнь – июль. У исследуемых сортов количество способных к развитию меристем в феврале – марте составило 60,5 – 80,2%, в ноябре – декабре – 50,5 – 67,3%, в зависимости от генотипа. Количество развивающихся апексов активно растущих побегов, отобранных в июне – июле, достигало 72 – 84%.

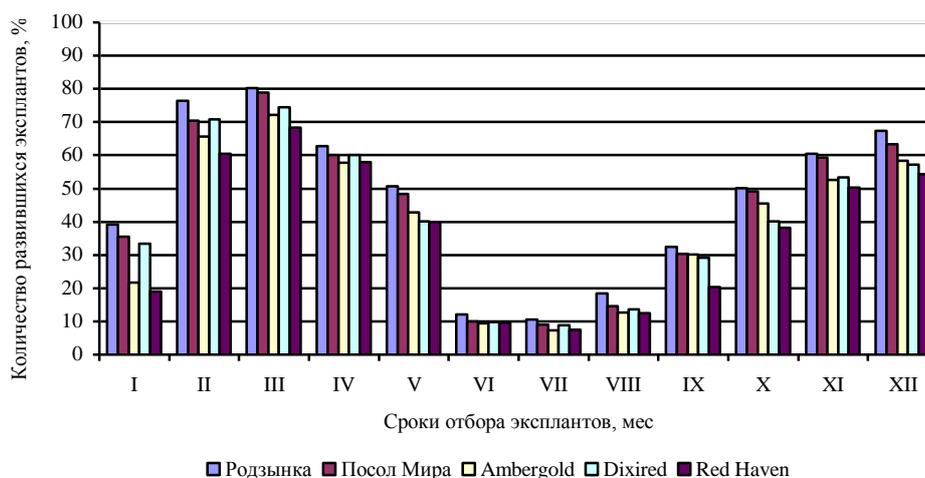


Рис. 1 Влияние генотипа и сроков отбора на развитие меристем персика в условиях *in vitro*

В настоящее время одной из сложных проблем получения асептической культуры вводимого *in vitro* растительного материала персика является зараженность сапрофитной грибной и бактериальной инфекциями. Использование известных способов стерилизации растительного материала не всегда обеспечивает высокий процент свободных от контаминации эксплантов [5, 9]. В связи с этим нами были проведены эксперименты по разработке эффективных способов стерилизации вегетативных почек и апексов активно растущих побегов персика сортов Посол Мира, Родзынка, Ambergold, Dixired и Red Haven с использованием различных антисептиков и экспозиций их применения. Результаты исследования показали, что использование антибиотика цефотаксима (400 мг/л) в процессе стерилизации совместно с 0,5% раствором «Дез ТАБ» и 1% раствором фунгицида Thimerosal значительно уменьшало количество инфицированных эксплантов (табл. 1).

Среди разработанных нами и испытанных 6 способов стерилизации более эффективными были 2 способа, которые позволили получить $89,4 \pm 5,4\%$ вегетативных почек и $85,1 \pm 4,5\%$ апексов активно растущих побегов, свободных от контаминации (см. табл. 1).

Выявлены особенности введения и культивирования меристем и апексов активно растущих побегов персика сортов Посол Мира, Родзынка, Ambergold, Dixired и Red Haven, на питательные среды РМ, РЕ и РР. Инициация развития меристем и апексов активно растущих побегов происходила на 7 – 9 сут на питательной среде РМ и РЕ, соответственно (рис. 2). На этапе индукции развития меристем и апексов активно растущих побегов в условиях *in vitro* основной характеристикой регенерационных процессов было количество сформировавшихся микропобегов. Первыми начинали

развиваться меристемы и апексы активно растущих побегов сортов Родзынка, Посол Мира и Red Haven, изолированные на питательные среды РМ, дополненную 1,0 мг/л БАП, 0,15 мг/л ИМК, 0,5 мг/л и РЕ, содержащую 1,5 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК, соответственно. Культивирование меристем и апексов активно растущих побегов на среде РР, содержащей 0,5 – 1,0 мг/л и 0,1 – 0,2 мг/л ИМК, значительно повышало частоту регенерации. В контроле (среда без регуляторов роста) экспланты развивались слабо и погибали на 10-12 сутки. После первых двух субкультивирований на среде РР развитие микропобегов персика сортов Родзынка, Посол Мира, Ambergold, Dixired и Red Haven проходило без особых морфологических изменений.

Таблица 1

Сравнительная оценка эффективности способов стерилизации вегетативных почек и апексов активно растущих побегов персика

Способ стерилизации		Количество эксплантов, %		
стерилизующее вещество и его концентрация	экспозиция, мин	инфицированных	потемневших и некротизировавшихся	свободных от контаминации
Вегетативные почки				
70% C ₂ H ₅ OH 0,2% р-р «Дез ТАБ»	1 18	56,2 ± 5,9	15,8 ± 1,7	28,0 ± 1,7
70% C ₂ H ₅ OH 0,5% р-р «Дез ТАБ»	1 18	41,6 ± 4,8	16,3 ± 0,9	42,1 ± 7,5
70% C ₂ H ₅ OH 0,4% р-р цефотаксим	1 30	35,4 ± 7,4	10,3 ± 1,4	54,3 ± 5,2
70% C₂H₅OH 1% Thimerosal 0,5% р-р «Дез ТАБ» 0,4% р-р цефотаксим	1 7 10 30	4,5 ± 0,5	6,1 ± 1,4	89,4 ± 5,4
Апексы активно растущих побегов (1,0 – 1,5 см)				
70% C ₂ H ₅ OH 1% Thimerosal 0,5% р-р «Дез ТАБ»	1 3 17	36,5 ± 2,2	8,2 ± 1,8	55,3 ± 6,7
70% C₂H₅OH 0,5% р-р «Дез ТАБ» 0,4% р-р цефотаксим	1 10 20	7,1 ± 1,1	7,8 ± 0,8	85,1 ± 4,5

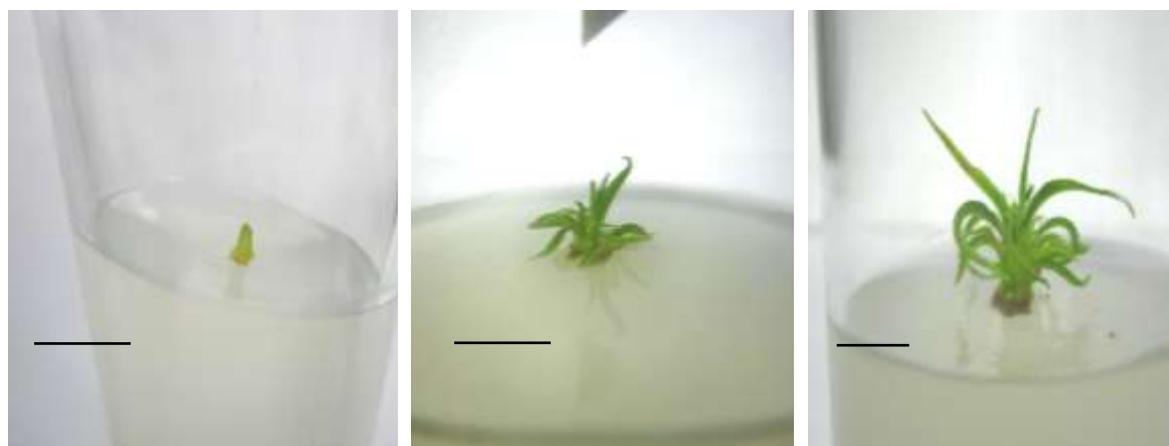


Рис. 2 Инициация развития меристемы персика сорта Ambergold на агаризованной питательной среде РМ (масштаб 1 см)

Однако после 3 субкультивирования наблюдали различные морфологические ответы. На некоторых микропобегах сорта Red Haven отмечен хлороз листьев и их постепенное оводнение с последующей некротизацией тканей. У сорта Dixired в течение 40 – 45 сут после введения формировались крупные сидячие розетки с ярко-зелеными листьями длиной 1,5 – 1,8 см (рис. 3).



Рис. 3 Развитие апексов активно растущих побегов персика сорта Dixired через 40 – 45 сут культивирования *in vitro* (масштаб 1 см)

Оценивая влияние регуляторов роста и их концентраций на морфогенез и регенерацию микропобегов, выявлен высокий морфогенетический потенциал сортов Посол Мира и Ambergold (рис. 4, табл. 2). Число сформировавшихся микропобегов/эксплант достигало 12,2 и 11,7, соответственно. У сортов Dixired и Red Haven этот показатель не превышал 7,6.

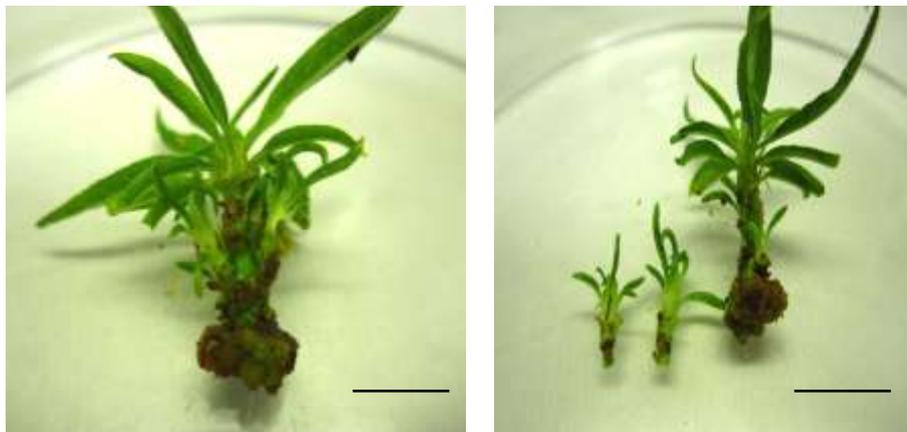


Рис. 4 Множественное побегообразование на питательной среде PR и формирование каллуса в базальной части микропобега персика сорта Посол Мира (масштаб 1 см)

Из таблицы 2 видно, что образование микропобегов и их число зависит от типа регуляторов роста, их концентраций и генотипа. В целом все изученные концентрации БАП в сочетании с 0,1 и 0,2 мг/л ИМК активизировали морфогенез и частоту регенерации по сравнению с контролем. Наибольшая длина побега и количество листьев наблюдали также на среде PR с 1,0 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИМК. При этом БАП в концентрации 1,0 мг/л стимулировал регенерационные процессы у всех сортов персика

по сравнению с контролем. Увеличение частоты регенерации в значительной мере происходило благодаря физиологической роли БАП, являющегося наиболее эффективным цитокинином при микроразмножении представителей семейства Rosaceae [10, 15, 17].

Таблица 2

Влияние регуляторов роста и их концентраций в питательной среде PR на регенерацию микропобегов 5 сортов персика (после 4 субкультивирования)

Регулятор роста и его концентрация, мг/л		Генотип				
БАП	ИМК	Родзынка	Посол Мира	Амберголд	Диксиред	Ред Хейвен
Количество микропобегов/эксплант, шт.						
Из меристем						
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,5	0,1	5,4 ± 0,7	8,7 ± 0,8	6,8 ± 0,9	4,1 ± 0,7	4,5 ± 0,4
0,5	0,2	5,2 ± 0,8	8,2 ± 0,4	7,1 ± 1,2	4,4 ± 0,8	4,2 ± 0,7
0,75	0,1	6,8 ± 1,1	9,7 ± 0,9	8,1 ± 1,2	5,8 ± 1,2	5,2 ± 0,9
0,75	0,2	6,4 ± 1,5	9,4 ± 1,1	8,3 ± 1,4	5,8 ± 1,6	5,4 ± 1,3
1,0	0,1	8,4 ± 1,4	12,2 ± 1,6	11,5 ± 0,7	6,5 ± 1,6	6,4 ± 1,4
1,0	0,2	8,3 ± 1,2	12,0 ± 2,1	11,3 ± 1,6	6,7 ± 1,3	6,5 ± 1,4
Из апексов активно растущих побегов						
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,5	0,1	5,9 ± 0,8	8,5 ± 1,7	7,4 ± 0,7	4,9 ± 0,7	5,4 ± 1,8
0,5	0,2	6,2 ± 1,3	8,2 ± 1,6	7,2 ± 0,8	5,1 ± 1,4	5,6 ± 2,1
0,75	0,1	7,7 ± 1,1	10,8 ± 1,5	8,8 ± 1,1	6,2 ± 0,7	6,5 ± 1,7
0,75	0,2	7,5 ± 1,5	10,8 ± 1,1	8,4 ± 1,5	6,3 ± 1,6	6,0 ± 1,4
1,0	0,1	8,9 ± 1,4	11,7 ± 0,6	10,9 ± 0,4	7,6 ± 1,1	7,2 ± 1,4
1,0	0,2	9,3 ± 1,2	11,5 ± 0,9	11,0 ± 0,8	7,5 ± 0,9	7,5 ± 1,9

Полученные микропобеги сортов персика длиной 1,0 – 1,5 см перенесены на питательные среды М 1 [15] и PR для индукции морфогенного каллуса.

Не менее важной и сложной проблемой при разработке систем регенерации растений является индукция морфогенного каллуса и последующее эффективное побегообразование персика через каллусогенез для дальнейшего генетического улучшения сортов персика [16]. В наших опытах индукцию образования каллуса наблюдали на питательных средах PR (модифицированная питательная среда B5), содержащей 0,5 – 1,0 мг/л БАП и 0,1 – 0,2 мг/л ИМК и М1 (основа среды MS), дополненной 1,0 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИМК. На срезе в базальной части микропобега в месте контакта его с питательной средой было отмечено формирование плотного каллуса. При увеличении концентрации БАП в питательной среде (1,5, 2,0 мг/л) и ИМК (0,1, 0,2 мг/л) индуцирован морфогенный каллус, что согласуется с результатами, полученными М. Perez-Jimenez et al. [15]. Вместе с тем, у сортов Посол Мира и Red Haven на данной среде также образовывался морфогенный каллус. На поверхности каллуса у сортов персика Родзынка, Ambergold и Dixired в базальной части микропобегов отмечено образование глобулярных структур (рис. 5, 6). Развившийся морфогенный каллус отделяли и переносили на среды Аа₂ (0,5 мг/л кинетин и 1,0 мг/л НУК), RG2 (1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК) и RG7 (1,3 мг/л TDZ) для увеличения его количества (рис. 5B).

В результате проведенных исследований изучены абиотические и биотические факторы, регулирующие процессы введения, индукции морфогенеза и регенерации *in vitro* сортов персика Посол Мира и Родзынка, Ambergold, Dixired и Red Haven.

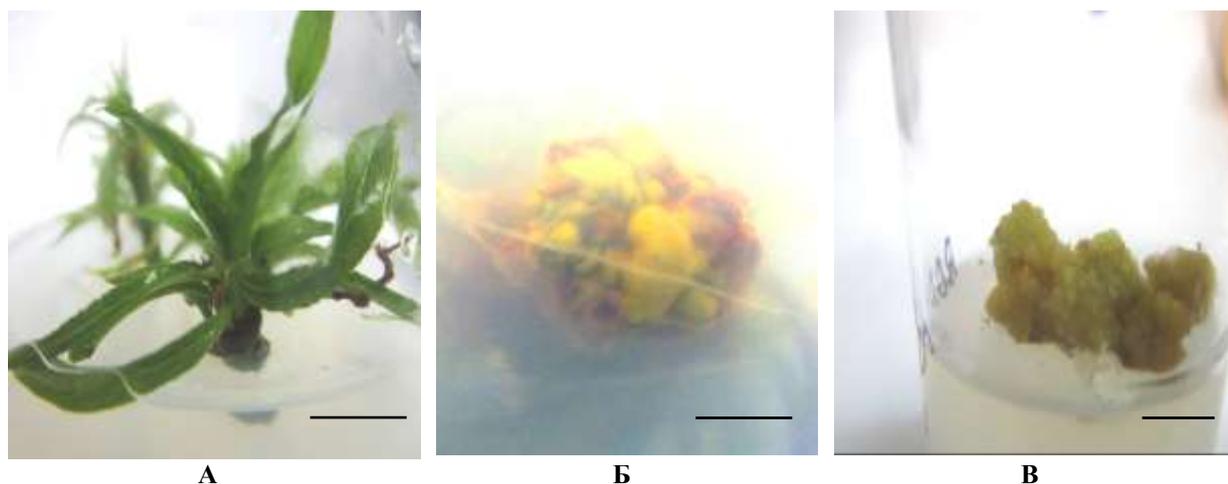


Рис. 5 Микропобег (А) и морфогенный каллус (Б) сорта Ambergold на питательной среде PR, содержащей 1,0 мг/л БАП и 0,2 мг/л ИМК; развитие отделенного каллуса (В) на питательной среде RG7 (масштаб 1 см)

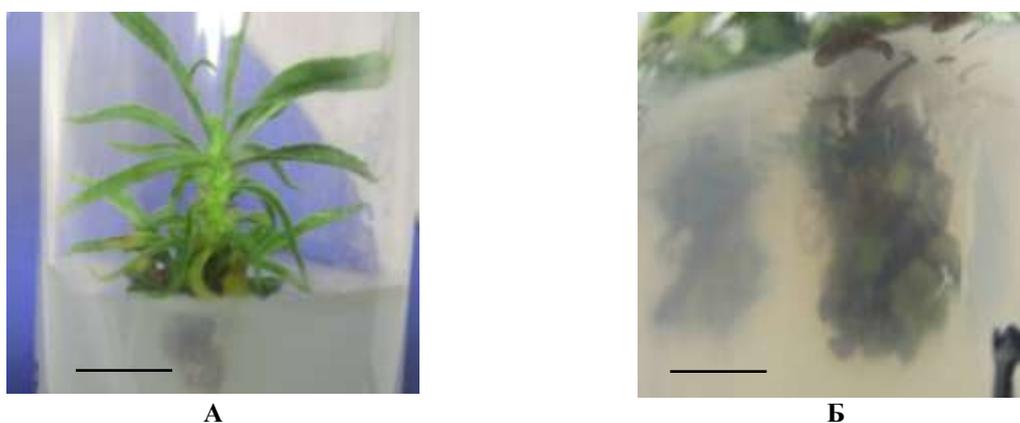


Рис. 6 Формирование каллуса и образование дополнительных побегов в основании микропобега сорта Родзынка на питательной среде PR (А); глобулярные структуры (Б) на поверхности каллуса (масштаб 1 см)

Выводы

Изучение морфогенетических потенций позволило раскрыть регенерационные способности меристем и апексов активно растущих побегов при воздействии следующих факторов культивирования, таких как способ стерилизации, состав питательных сред, тип и концентрация регуляторов роста.

Показано, что отбор вегетативных почек персика в феврале – марте и апексов активно растущих побегов в июне – июле при оптимальном способе последовательной ступенчатой стерилизации вегетативных почек в растворах 70% этанола, 1% Thimerosal, 0,5% «Дез ТАБ», 0,4% цефотаксима (экспозиция 1, 7, 10 и 30 мин) и апексов активно растущих побегов – в растворах 70% этанола, 0,5% «ДезТАБ» и 0,4% цефотаксима (экспозиция 1, 10 и 20 мин), обеспечивали выход 60,5 – 84% развивающихся первичных эксплантов 5 исследуемых сортов персика.

Продемонстрирована индуцирующая роль питательной среды PR (модифицированная питательная среда В5) и регуляторов роста БАП (0,5 – 1,5 мг/л) и ИМК (0,1 – 0,2 мг/л) в регенерации микропобегов персика. Количество микропобегов/эксплант у сортов Посол Мира, Ambergold, Родзынка, Dixired и Red Haven достигало 12,2; 11,7; 9,3; 7,6 и 7,5, соответственно.

У исследуемых сортов персика в основании микропобегов получен морфогенный каллус для дальнейшей разработки системы регенерации микропобегов и последующей генетической трансформации.

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

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
2. Ваганова Т.И., Сидорова Т.Н., Долгов С.В. Разработка методов регенерации и трансформации растений персика подвоя «Bailey» // Материалы Междунар. науч. конф. и школы молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Россия, Калининград, 2014): материалы: в 2-х ч. / под ред. Е.С. Роньжиной. – Калининград: Аксиос, 2014. – Ч. I. – С. 184-186.
3. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков Ф.В., Лесникова Н.П. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур: Сб. науч. тр. Гос. Никит. ботан. сада. – 1999. – Т. 118. – С. 189-199.
4. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Чирков С.Н., Ежов В.Н., Лесникова-Седошенко Н.П. Биотехнологические системы диагностики вируса шарки сливы (*Plum pox virus*) и отбора толерантных сортов косточковых плодовых культур // Сборник научных трудов ГНБС. – 2009. – Т. 131. – С. 94-103.
5. Amiri S., Ashtari S., Babaiy A.H., Nazari S. A., Khodadadi E., Khodadadi E., Sabzi M. Control of contamination during micropropagation process of Rootstocks Mariana (*Prunus mariana*) // Annals Biological Research. – 2013. – Vol. 4 (3). – P. 149-151.
6. Cambra, M, Capote, N, Myrta, A, Llacer, G. Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease // EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 202-204.
7. Gamburg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – Vol. 46, N 5. – P. 417-421.
8. Gentile A., Monticelli S., Damiano C. Adventitious regeneration in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] // Plant Cell Rep. – 2002. – Vol. 20. – P. 1011-1016.
9. Kyte, L., Kleyn, J., Scoggins, H., Bridgen, M. Plants from test tubes: An introduction of micropropagation. 4th ed. Timber Press, Portland, Oregon, 2013. (2013). – 274 p.
10. Mirza Muhammad Qadeer Baig, Ishfaq Ahmad Hafiz, Azhar Hussain, Touqeer Ahmad, Nadeem Akhtar Abbasi An efficient protocol for in vitro propagation of *Rosa gruss an teplitz* and *Rosa centifolia* // African Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10(22). – P. 4564-4573. ISSN 1684-5315, doi: 10.5897/AJB10.2051
11. Mitrofanova I., Mitrofanova O., Chirkov S., Lesnikova-Sedoshenko N., Chelombit S. Detection and Identification of Plum Pox Virus on Prunus species in Crimea // Journal Agriculture & Forestry. – 2015. – Vol. 61 (4). – P. 197-204. ISSN 0554-5579, doi: 10.17707/AgricultForest.61.4.22
12. 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. doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
13. Nemeth M. History and importance of plum pox virus in stone-fruit production // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 1994. – 24. – P. 525-536.
14. Nemeth M. Plum pox (Sharka). In: Nemeth M. Virus, mycoplasma, and rickettsia diseases of fruit trees / Dordrecht: Martinus Nijhoff Pub. – 1986. – P. 463-479.
15. Perez-Jimenez M., Carrillo-Navarro A., Cos-Terrer J. Regeneration of peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivars and *Prunus persica* x *Prunus dulcis* rootstock via

organogenesis // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2012. – Vol. 108. – P. 55-62. doi: 10.1007/s11240-011-0011-y

16. Soliman H.I.A. *In Vitro* Regeneration and Genetic Transformation of Peach (*Prunus persica* L.) Plants // Life Science Journal. – 2013. – Vol. 10 (2). – P. 487-496.

17. Zhou H., Ming L., Zhao X., Fan X., Guo A. Plant regeneration from *in vitro* leaves of the peach rootstock ‘Nemaguard’ (*Prunus persica* x *P. davidiana*) // Plant Cell, Tissue, Organ Cult. – 2010. – Vol. 101. – P. 79-87.

Статья поступила в редакцию 03.09.2016 г.

Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Dolgov S.V. Feature of some peach cultivars microshoots regeneration *in vitro* // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2016. – № 121 . – P. 48-56.

Morphogenetic capacity of organs and tissues of 5 peach cultivars were studied for the development of peach regeneration system *in vitro*. It was demonstrated that aseptic culture is possible to obtain using 1% Thimerosal solution, 0.5% solution “Des TAB” and 0.4% cefotaxime solution. Techniques of microshoots regeneration from meristems and apexes of intensively growing shoots were developed. Explants regeneration frequency was increased in case of cultivation on nutrient medium with 0.5 – 1.5 mg/l BAP and 0.1 – 0.2 mg/l IBA.

Key words: *Prunus persica* (L.) Batsch; explant; culture medium; organ and tissue culture; growth regulators; morphogenesis.

УДК 582.548.25: 57.085.23

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* И *IN VIVO* СЕМЯН И ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ *CANNA* × *HYBRIDA HORT. EX BASKER*

Арзы Шевкиевна Тевфик, Ирина Вячеславовна Митрофанова

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Россия, г. Ялта, пгт Никита, ул. Никитский спуск, 52
tevfik.arzy@yandex.ru

Изучены особенности прорастания семян и формирования сеянцев *Canna* × *hybrida hort ex Basker* в условиях *in vivo* и *in vitro*. Показана эффективность метода эмбриокультуры. В условиях *in vitro* из зародышей, изолированных из семян канна садовой сортов Дар Востока и Ливадия от свободного опыления получены жизнеспособные растения.

Ключевые слова: канна садовая; эмбриокультура; прорастание *in vitro*

Введение

В настоящее время культура клеток, органов и тканей растений нередко используется в генетико-селекционной работе, что позволяет значительно ускорить получение новых форм и проводить исследования круглый год, при этом культивируемые растения занимают незначительные площади. Вместе с тем, семена некоторых видов растений имеют очень низкую частоту прорастания и недоразвитый зиготический зародыш. Одной из таких культур является канна садовая (*Canna* × *hybrida hort ex Basker*), для которой характерно длительное цветение, наличие больших декоративных листьев и высоких соцветий с крупными, оригинальными цветками [2].

Канна редко формирует полноценные семена. Зрелые семена канна имеют черную окраску и длительный период прорастания, отличаются очень твердой оболочкой. Для ускорения появления всходов нередко прибегают к предпосевной

обработке семян. Для этой культуры характерно подземное прорастание семян, которое начинается с удлинения узкой части зародыша, так называемой «шейки». Базальный конец зародыша вместе с корешком выталкивается через «зародышевую щель» из семенной кожуры. По данным М.А. Плиско главный корень рано останавливается в росте, образующиеся придаточные корни по структуре не отличаются от главного [8].

Целью данной работы было выявить пути морфогенеза, особенности прорастания семян и развития изолированных зародышей в культуре *in vitro* перспективных сортов канны садовой.

Объекты и методы исследования

В исследовании использовали 2 перспективных сорта канны садовой из коллекционных насаждений Никитского ботанического сада (НБС): Дар Востока, Ливадия.

Исследования проводили на тепличном комплексе и в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений НБС. В работе использовали методы культуры органов и тканей растений общепринятые [1, 4] и разработанные в отделе биотехнологии растений НБС [6].

В наших опытах по проращиванию *in vivo* были использованы следующие виды воздействия на семена канны: 1) погружение в раствор серной кислоты на 60, 120 мин; 2) холодная обработка при 5°C в течение 1 суток и последующее выдерживание в горячей воде (100°C) в течение 10 сек (термическая обработка); 3) надрез семенной кожуры скальпелем (скарификация). После проведенной скарификации и стратификации семена канны высевали в перлит или стерильный почвенный субстрат.

Для введения в условия *in vitro* в качестве первичных эксплантов использовали изолированные зародыши, зрелые и незрелые семена. Коробочки канны садовой обрабатывали 96% этанолом, обжигали в пламени спиртовки и извлекали семена. Зародыши помещали на питательную среду Монье [11] без регуляторов роста. Изолированные зародыши стратифицировали при температуре 5±1°C без освещения. Недоразвитые семена помещали на среду Мурасиге и Скуга [12]. Пробирки с семенами, проростки и растения культивировали климатической камере (Panasonic MLR-352-PE) при 24±1°C, 16 часовом фотопериоде при освещении холодным белым светом флуоресцентных ламп (Philips TL, 40 W) интенсивностью 37,5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Цитоэмбриологические препараты готовили по общепринятой методике [7]. Парафиновые срезы делали толщиной 12-15 мкм на ротационном микротоме марки МРТУ (Россия). Постоянные препараты окрашивали гематоксилином с подкраской алциановым синим [3]. Анализировали материал с помощью микроскопов “Jenaval” (Carl Zeiss, Германия) и AxioScopeA.1 (Zeiss, Германия) методом поляризационной и световой микроскопии. Микрофотографии выполнены с помощью системы анализа изображения AxioCamERc5s с применением программы AxioVisionRel. 4.8.2.

Обработку результатов экспериментов проводили при помощи методов статистического анализа [5].

Результаты и обсуждение

В процессе изучения всхожести семян *in vivo* было выявлено, что семена канны садовой сорта Ливадия (от свободного опыления) не прорастали как при применении предпосевной обработки семян, так и без нее. В таблице 1 представлены результаты по прорастанию семян канны садовой сорта Дар Востока после стратификации и скарификации.

Таблица 1

Частота прорастания (%) *in vivo* семян канны садовой сорта Дар Востока от свободного опыления в зависимости от применяемой предпосевной обработки и вида субстрата

Виды обработки семян	Вид субстрата	Продолжительность культивирования, сут					
		7	14	21	28	35	42
Без обработки	перлит	—*	15,4	23,1	38,5	38,5	38,5
	стерильный почвенный субстрат	—	7,7	15,4	23,1	38,5	38,5
Скарификация скальпелем	перлит	7,7	23,1	30,7	46,2	46,2	46,2
	стерильный почвенный субстрат	—	—	15,4	23,1	30,7	30,7
Обработка серной кислотой (60 мин)	перлит	—	15,4	23,1	23,1	23,1	23,1
	стерильный почвенный субстрат	—	—	—	—	—	—
Обработка серной кислотой (120 мин)	перлит	—	7,7	15,4	15,4	23,1	23,1
	стерильный почвенный субстрат	—	—	—	—	—	—
Термическая обработка	перлит	—	—	—	—	—	—
	стерильный почвенный субстрат	—	—	—	—	—	—

* - прорастание не отмечали

При посеве в перлит семян канны сорта Дар Востока, которые предварительно подвергали скарификации скальпелем, первые всходы начинали появляться на 7 сут культивирования (рис. 1). Спустя 28 сут культивирования частота прорастания семян составила 46,2%. Наряду с этим, на данный срок культивирования при высевании этих же семян в стерильный почвенный субстрат количество проросших семян было в 2 раза меньше (23,1%).

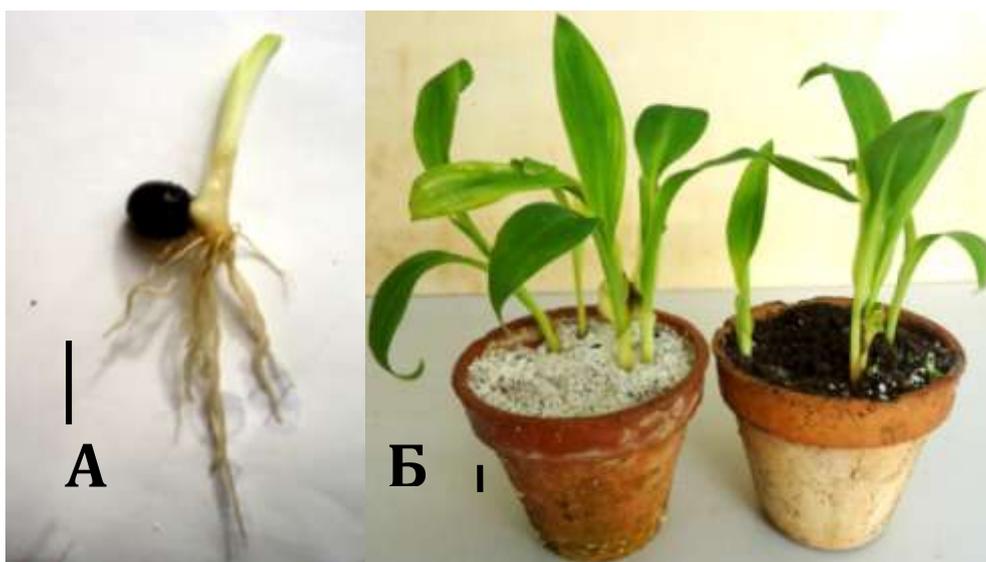


Рис. 1 Проросшие семена канны садовой сорта Дар Востока от свободного опыления после скарификации: А) на 7 сут культивирования *in vivo*; Б) на 35 сут культивирования *in vivo* в разных субстратах

Исследования показали, что семена, высаженные без предпосевной обработки, и семена, обработанные серной кислотой, начали всходить на 14 сут культивирования. Однако, при дальнейшем культивировании *in vivo* у семян после обработки серной кислотой в течение 60 мин отмечали низкую частоту прорастания семян (23,1%). Вместе с тем, высаженные аналогичные семена в почвенный субстрат не прорастали и инфицировались. Наряду с этим, семена без обработки имели высокую частоту прорастания как при посеве в перлит, так и в почвенный субстрат (38,5%). Также было выявлено, что семена канны садовой сорта Дар Востока после термической обработки не всходили.

В условиях *in vitro* при использовании в качестве эксплантов незрелые и зрелые семена, в случае с незрелыми семенами размером 0,1-0,2 см на 14 сут культивирования они теряли жизнеспособность. При этом, на питательной среде Монье было получено большее количество жизнеспособных эксплантов. Так, у сорта Дар Востока в условиях низкой положительной температуры отмечена жизнеспособность незрелых семян на питательной среде Монье на уровне 80%, а на среде Мурасиге и Скуга – 34%.

Наши исследования показали, что жизнеспособность эксплантов (семян) канны садовой зависит от их степени зрелости, размера, условий культивирования и состава питательной среды. Так, все крупные семена у сорта Дар Востока на 14-е сут культивирования оказались жизнеспособными (рис. 2). При этом у сортов Дар Востока и Ливадия количество жизнеспособных семян на среде Монье не превышало 50 и 17% соответственно (табл. 2) После перенесения на свет на 7 сут культивирования на питательной среде Монье семена изменили окраску от бежевой до зеленой.

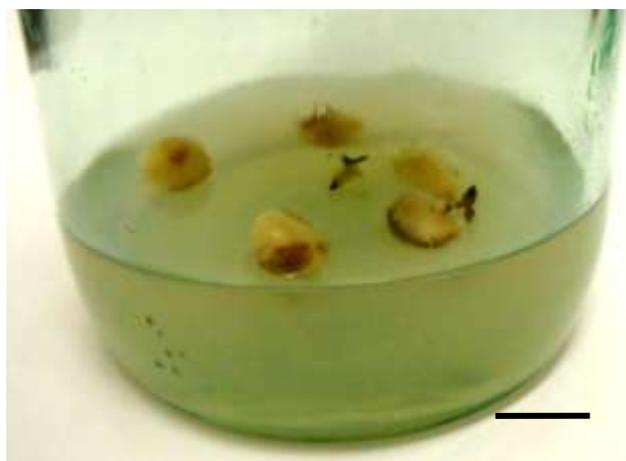


Рис. 2 Культивирование незрелых семян канны садовой сорта Дар Востока от свободного опыления в условиях *in vitro* (масштаб 1 мм)

Таблица 2

Влияние условий культивирования (состава питательной среды, продолжительности культивирования, стратификации) на жизнеспособность (%) незрелых семян 2-х сортов канны садовой

Генотип	Питательная среда			
	Монье		Мурасиге Скуга	
	на 7-е сут	на 14-е сут	на 7-е сут	на 14-е сут
Дар Востока	80±7,8	50±4,3	34±4,1	11±0,9
Ливадия	75±6,2	17±2,1	50±4,3	33±4,1

Недозрелые семена, помещенные на питательную среду МС и перенесенные на свет на 7-е сут культивирования не поменяли окраску. Наряду с этим, изменение окраски от бежевой до зеленой на 23 сут культивирования. В дальнейшем происходило потемнение и постепенное отмирание эксплантов.

Предварительная стратификация в течение 30 сут изолированных зародышей сорта Дар Востока обеспечила увеличение их длины и ширины в 2-3 раза. Вместе с тем, отмечали активное корнеобразование (в среднем $11,33 \pm 0,41$ корней/эксплант) и появление листьев (в среднем $2,5 \pm 0,33$ шт./эксплант). Через 60 сут культивирования в условиях стратификации пробирки с изолированными зародышами переносили в стандартные условия культивирования, где на 35-е сут на свету формировались полноценные проростки, пригодные к высадке в условия *in vivo*.

При культивировании при 5°C изолированных зародышей сорта Ливадия на поверхности этого зародыша отмечали формирование глобулярных структур. При переносе в стандартные условия культивирования их количество увеличивалось. Однако, при более длительном культивировании (более 60 сут) наблюдали потемнение и постепенное отмирание глобулярных структур [9]. Возможно, для регенерации микропобегов из полученных структур необходим более тщательный подбор регуляторов роста и физических факторов культивирования. При этом результаты экспериментов показали, что из изолированного зародыша сорта Ливадия при перенесении в стандартные условия культивирования, наряду с формированием глобулярных структур происходило развитие полноценных проростков (рис. 3). В ходе опытов было выявлено, что изолированные зародыши сорта Ливадия обладали низкой частотой прорастания (50%) по сравнению с сортом Дар Востока (100%).

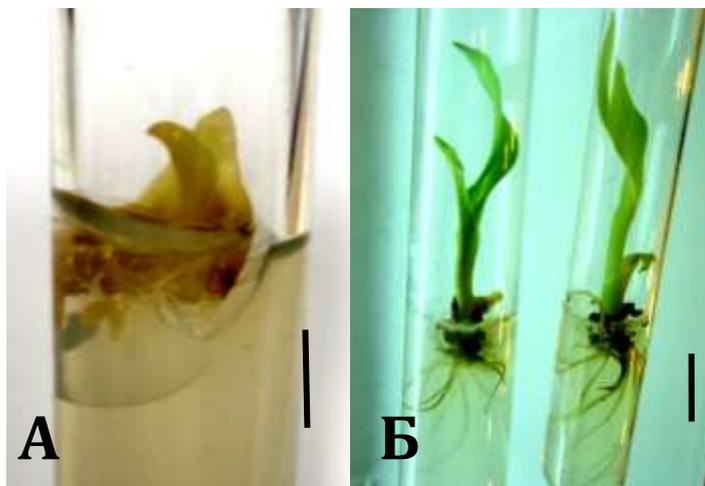


Рис. 3 Развитие зародышей сорта Ливадия при культивировании в стандартных условиях: А) на 5 сут; Б) на 20 сут

Проведенные гистологические исследования методом поляризационной микроскопии тканей семядоли зародышей сортов Дар Востока и Ливадия (культивируемых в условиях стратификации) показали, что они содержали большое количество крахмальных зерен (рис. 4).

Наряду с этим методом световой микроскопии удалось впервые выявить месторасположение и сам факт формирования соматического зародыша в тканях семядоли изолированного зародыша сорта Дар Востока, о чем сообщалось в ранее опубликованной нами работе [10].

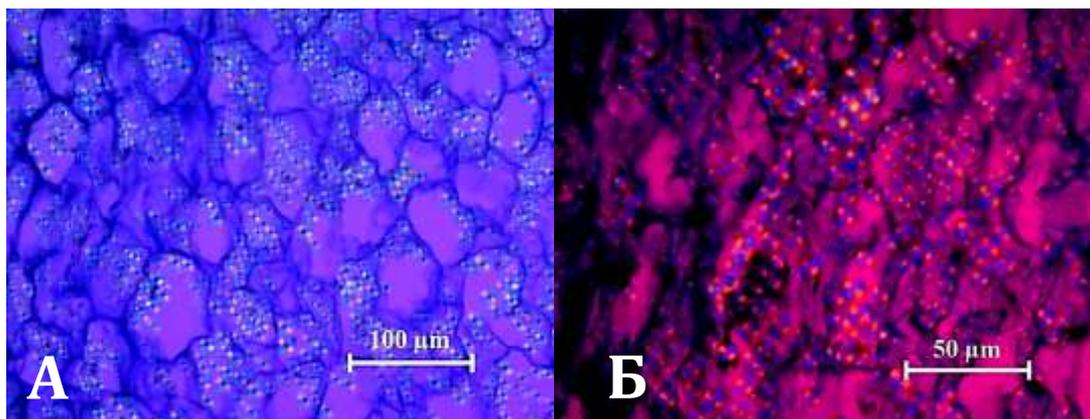


Рис. 4 Фрагменты паренхимных клеток семядолей, содержащих крахмальные зерна у изолированных зародышей канны садовой сортов Ливадия (А) и Дар Востока (Б)

Выводы

Таким образом установлено, что скарификация и высев семян канны садовой сорта Дар Востока в перлит способствуют их прорастанию в условиях *in vivo*. При этом через 28 сут культивирования частота прорастания семян составила 46,2%.

Отмечено, что после стратификации зародышей, изолированных из семян сорта Дар Востока от свободного опыления, в условиях *in vitro* на 35-е сут культивирования формировались полноценные проростки. При этом проростки имели хорошо развитые корни (в среднем до 11 шт./эксплант) и 2-3 развернувшихся листа. Частота прорастания у таких зародышей составила 100%. В отличие от сорта Дар Востока у сорта Ливадия эти показатели оказались значительно ниже.

Разработанный нами способ получения проростков из семян в условиях *in vitro* представлять особый интерес для последующей селекционной работы с культурой канны садовой.

В результате гистологических исследований показано наличие большого количества крахмальных зерен в тканях зародыша. Подтверждена возможность реализации морфогенеза, через соматический эмбриогенез.

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

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
2. Дашкеев Е.А. Канны в Молдавии. – Кишинев: «Штиица». – 1975. – 65 с.
3. Жинкина Н.А., Воронова О.Н. К методике окраски эмбриологических препаратов // Ботан. журн. – 2000. – Т. 85, №6. – С. 168–171.
4. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Кушнир Г.П. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
5. Лакин Г.В. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
6. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур – К.: «Аграрна наука», 2011. – 344 с.

7. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. / З.П. Паушева – М.: Колос, 1970. – 255 с.
8. Плиско М.А. Семейство Cannaceae / Сравнительная анатомия семян. Том 1 / под ред. А.Л. Тахтаджяна. — Л.: «Наука», 1985. — С. 227-230.
9. Тевфик А.Ш., Митрофанова И.В. Изучение регенерационной способности зародышей и семян канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) в условиях *in vitro* // Ученые записки Таврического национального университета им. Вернадского. Серия «Биология, химия». — 2014. — Т. 27 (66), № 2. — С. 157-164.
10. Тевфик А.Ш., Митрофанова И. В., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П. Введение в культуру *in vitro* изолированных зародышей и семян канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) // Клеточная биология и биотехнология растений: тез. докл. Международной научно-практической конференции. 13-15 февраля 2013 г., Минск, Беларусь. — Минск: Изд. Центр БГУ, 2013. — С. 198.
11. Monnier M. Croissance et development des embryons globulaires de *Capsella bursa-pastoris* cultives *in vitro* dans du milieu a base d'une nouvelle solution minerale // Bull. Soc. Bot. France Memories, Coll. Morphologie. — 1973. — P. 179-194.
12. 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.

Статья поступила в редакцию 03.09.2016 г.

Tevfik A.Sh., Mitrofanova I.V. Some special features of seeds and isolated embryos of *Canna × hybrida hort.* ex Backer cultivation *in vitro* and *in vivo* // Bull. Nikit. Botan. Gard. — 2016. — №. 121 — P. 56-62.

The special features of *in vitro* and *in vivo* seed germination and seedling formation of *Canna × hybrida hort* ex Backer were studied in course of this research. At the same time efficiency of embryo culture method was demonstrated. The viable canna plants of Dar Vostoka and Livadia cultivars were obtained from isolated embryos during *in vitro* cultivation.

Key words: garden canna; embryo culture; germination *in vitro*.

УДК 581.527.4:57.085.2

ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ В УСЛОВИЯ *IN VITRO* НЕКОТОРЫХ РЕЛИКТОВЫХ ЭНДЕМИКОВ ФЛОРЫ ГОРНОГО КРЫМА

**Ирина Вячеславовна Митрофанова, Ольга Владимировна Митрофанова,
Александр Ростиславович Никифоров, Нина Павловна Лесникова-Седошенко,
Наталья Николаевна Иванова, Светлана Викторовна Челомбит,
Ирина Васильевна Жданова**

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Россия, г. Ялта, пгт Никита, ул. Никитский спуск, 52
invitro_plant@mail.ru

Впервые начаты биотехнологические исследования особенностей развития 8 видов реликтовых эндемиков флоры Горного Крыма в условиях *in vitro*. Приведены данные по изучению влияния воздействия стерилизующих веществ на жизнеспособность семян и плодов и получению асептической культуры исследуемых видов. Показана возможность образования проростков на питательных средах Monnier (1973) и Murashige, Skoog (1962).

Ключевые слова: редкие виды, культура органов и тканей; питательные среды; регенерация микропобегов.

Введение

Оригинальную составляющую любой флоры представляют реликтовые эндемики. Реликтовые эндемики Горного Крыма отличает весьма узкая экотопологическая приуроченность к специфическим условиям литогенных ландшафтов. Наиболее редкий вид, общая численность которого в четырех популяциях достигает не более 500 экземпляров – *Silene jailensis* N.I. Rubtzov (Caryophyllaceae) [8] – по своей экологической природе относится к облигатным хазмофитам – «растениям трещин» [9]. Виды *Lamium glaberrimum* (K. Koch) Taliev (Lamiaceae), *Scrophularia exilis* Popl. (Scrophylariaceae), *Sobolewsia sibirica* (Willd.) P.W. Ball (Brassicaceae) представляют собой облигатные гляреофиты – «растения осыпей» [9]. Кроме этого, *Heracleum ligusticifolium* M. Bieb. (Apiaceae), *Lagoseris callicephala* Juz. (Asteraceae) и *Lagoseris purpurea* L. (Asteraceae) являются видами двойной экологической природы, способные к развитию как на покрытых трещинами скальных поверхностях, так и на коллювии осыпных чехлов.

Изменение климатических условий на земном шаре, значительная антропогенная нагрузка, нерациональное использование растительных ресурсов, природные и техногенные катастрофы приводят к необходимости сохранения биоразнообразия растительного мира, особенно редких и исчезающих видов, в частности, реликтовых эндемиков. Сохранение биологического разнообразия – одна из важнейших мировых задач, стоящая перед ботаническими садами и биологической наукой в целом. В настоящее время вся деятельность по сохранению видов и сортов растений базируется на целом ряде программных документов, таких как «Конвенция о биологическом разнообразии» [10], «Global Strategy Plant Conservation» [11], «Международная программа ботанических садов по охране растений» [5]. Одним из наиболее актуальных и перспективных путей сохранения биоразнообразия растений является создание генобанка *in vitro*. Современные методы биотехнологии позволяют сохранить ценные редкие виды и единичные экземпляры в условиях *in vitro*, что является составной частью концепции сохранения биоразнообразия растительного мира [1, 6, 12].

Цель наших исследований – изучить особенности прорастания семян 8 видов реликтовых эндемиков флоры горного Крыма на этапе введения их в условия *in vitro*.

Объекты и методы исследования

Исследования выполняли в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений отдела биологии развития растений, биотехнологии и биобезопасности ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН».

В качестве объектов исследования использовали семена и плоды видов *Heracleum ligusticifolium*, *Lagoseris callicephala*, *Lagoseris purpurea*, *Lamium glaberrimum*, *Scrophularia exilis*, *Silene jailensis*, *Sobolewsia sibirica*, *Valerianella falconida*, произрастающих *ex situ*. Перечисленные виды внесены в Красную книгу Республики Крым (2015) и относятся к 3 категории редкости [4].

В работе придерживались общепринятых и разработанных в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений методов [2, 3, 7].

С целью преодоления периода покоя семена и плоды помещали в условия пониженных положительных температур ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) на 4-8 недель. Для стерилизации эксплантов подбор дезинфицирующих веществ осуществляли с учетом их эффективности и минимального уровня фитотоксичности. При получении асептической культуры семян и плодов применяли 70% этанол, 1% раствор фунгицида Thimerosal («Merk», Германия), 0,2 – 0,4% раствор препарата «Дез ТАБ» (Китай), 0,4%

раствор антибиотика цефотаксим (Республика Беларусь) с добавлением в растворы 2-3 капель детергента Tween-20. После каждого реагента экспланты промывали 3-4 раза в стерильной дистиллированной воде.

В экспериментах по введению семян и плодов в условия *in vitro* и получению проростков использовали безгормональные агаризованные питательные среды MS (Murashige, Skoog) [14] и Монье (Monnier, 1973) [13]. Для регенерации микропобегов из полученных проростков использовали питательную среду MS, дополненную регуляторами роста в минимальных концентрациях: 0,1-0,2 мг/л БАП (6-бензиламинопурин, («Sigma», США) и 0,01 мг/л НУК (α -нафтилуксусная кислота, «Sigma», США). pH питательной среды доводили до 5,7 с помощью 0,1 н. раствора HCl или 0,1 н. раствора KOH перед автоклавированием. Условия автоклавирования питательных сред: температура 120°C в течение 5 мин в стерилизаторе LAC 5060S («DAIHAN LABTECH», Южная Корея). Все исследования проводили в асептических условиях бокса биологической безопасности SC2 («ESCO», Сингапур). Колбы и пробирки с эксплантами содержали в культуральной комнате с 16-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения 2 – 2,5 клк при температуре 21 – 23°C, а также в камере моделирования климатических условий для роста растений MLR-352-PE («Panasonic», Япония).

Учитывали частоту прорастания семян и количество полученных проростков для каждого исследуемого вида. Обработку данных осуществляли с помощью программы STATISTICA for Windows, 6.0 (StatSoft, Inc. 1984-2001).

Результаты и обсуждение

Морфометрическое описание семян и плодов исследуемых нами видов реликтовых эндемиков приведено в таблице 1, из которой видно, что самые крупные размеры эксплантов выявлены у видов *Heracleum ligustifolium* (масса 100 плодов – 1,56 г, размер 11,0 мм в длину и 6,7 мм в ширину), *Sobolewskia sibirica* (масса 100 плодов – 0,69 г, размер 7,4 мм и 1,85 мм, соответственно), *Valerianella falconida* (масса 100 плодов – 0,54 г, размер 4,1 мм и 3,55 мм) и *Lamium glaberrimum* (масса семян 0,34 г, размер 4,15 мм и 2,6 мм). У остальных 4 видов параметры семян и плодов были значительно меньше (табл. 1). Эти данные нами были использованы при подборе реагентов и разработке режимов стерилизации семян.

Таблица 1

Морфометрическая характеристика плодов/семян 8 видов реликтовых эндемиков

Вид	Характеристика плода/семени	Масса 100 плодов/семян, г	Средний размер плодов/семян	
			Длина плода/семени, мм	Ширина плода/семени, мм
<i>Heracleum ligustifolium</i>	Семянка/вислоплодник	1,56 ± 0,13	11,0 ± 0,21	6,7 ± 0,15
<i>Lagosotis callicephalis</i>	Семянка без хохолка	0,11 ± 0,02	5,95 ± 0,24	1,0 ± 0,0
<i>Lagosotis purpurea</i>	Семянка без хохолка	0,04 ± 0,01	5,9 ± 0,31	1,0 ± 0,01
<i>Lamium glaberrimum</i>	Четырехорешек/орешек	0,34 ± 0,02	4,15 ± 0,08	2,6 ± 0,1
<i>Scrophularia exilis</i>	Коробочка/семя	0,11 ± 0,01	2,2 ± 0,07	1,05 ± 0,05
<i>Silene jaiensis</i>	Коробочка/семя	0,17 ± 0,03	1,9 ± 0,07	1,58 ± 0,07
<i>Sobolewskia sibirica</i>	Односемянной стручок	0,69 ± 0,14	7,4 ± 0,34	1,85 ± 0,08
<i>Valerianella falconida</i>	Орешек	0,54 ± 0,07	4,1 ± 0,12	3,55 ± 0,16

При введении первичных эксплантов (семян и плодов) в условия *in vitro* основным требованием является отсутствие фитопатогенов, что достигается поверхностной стерилизацией одним или несколькими реагентами. В наших

исследованиях при получении асептической культуры семян было изучено воздействие различных стерилизующих реагентов, их концентраций и экспозиций. В результате проведенных экспериментов на этапе введения в культуру *in vitro* был подобран оптимальный режим стерилизации семян 8 видов реликтовых эндемиков (табл. 2).

Таблица 2
Результаты получения асептической культуры 8 видов реликтовых эндемиков Крыма при оптимальных способах стерилизации эксплантов

Вид	Оптимальный способ стерилизации		Количество эксплантов, %		Потемнение и деформация поверхности экспланта*
	стерилизующее вещество и его концентрация	экспозиция, мин	инфицированных	свободных от контаминации	
<i>Heracleum ligustifolium</i>	70% C ₂ H ₅ OH	1	8,0	92,0	+
	1% Thimerosal	5			
	0,5% р-р «Дез ТАБ»	10			
	70% C ₂ H ₅ OH	1	4,0	96,0	+
	0,5% р-р «Дез ТАБ»	10			
	0,4% р-р цефотаксима	15			
<i>Lagoseris callicephala</i>	70% C ₂ H ₅ OH	1	0,0	100,0	-
	0,5% р-р «Дез ТАБ»	10			
	0,4% р-р цефотаксима	10			
	70% C ₂ H ₅ OH	0,5	0,0	100,0	-
	0,4% р-р «Дез ТАБ»	10			
	0,4% р-р цефотаксима	10			
<i>Lagoseris purpurea</i>	70% C ₂ H ₅ OH	1	12,5	87,5	+
	0,5% р-р «Дез ТАБ»	10			
	0,4% р-р цефотаксима	10			
<i>Lamium glaberrimum</i>	70% C ₂ H ₅ OH	1	10,0	90,0	+
	0,5% р-р «Дез ТАБ»	10			
	0,4% р-р цефотаксима	10			
<i>Scrophularia exilis</i>	70% C ₂ H ₅ OH	1	0,0	100,0	-
	0,5% р-р «Дез ТАБ»	10			
	0,4% р-р цефотаксима	15			
	70% C ₂ H ₅ OH	1	2,9	97,1	-
	1% Thimerosal	5			
	0,5% р-р «Дез ТАБ»	10			
<i>Silene jailensis</i>	70% C ₂ H ₅ OH	1	2,1	97,9	-
	0,5% р-р «Дез ТАБ»	10			
	0,4% р-р цефотаксима	15			
<i>Sobolewsia sibirica</i>	70% C ₂ H ₅ OH	1	0,0	100,0	+
	0,5% р-р «Дез ТАБ»	10			
	0,4% р-р цефотаксима	10			
<i>Valerianella falconida</i>	70% C ₂ H ₅ OH	1	6,25	93,75	-
	0,5% р-р «Дез ТАБ»	10			
	0,4% р-р цефотаксима	10			

* + — симптомы потемнения или деформации поверхности экспланта;

- — без внешних изменений

В качестве одного из стерилизующих агентов был применен раствор цефотаксима в концентрации 0,4%, при использовании которого у видов *Heracleum ligustifolium*, *Lagoseris callicephala*, *Scrophularia exilis*, *Silene jailensis*, *Valerianella falconida* наблюдали максимальное количество стерильных эксплантов. У видов *Silene jailensis*, *Lagoseris callicephala*, *Lagosris purpuea*, *Valerianella falconida* максимальное прорастание семян составило 89,6%, 26,1%, 25,0% и 25,0%, соответственно, при последовательной стерилизации 70% этанолом в течение 1 минуты, 0,5% раствором

«Дез ТАБ» в течение 10 минут и 0,4% раствором цефотаксима в течение 10 минут. Аналогичный режим стерилизации был применен при введении *in vitro* семян *Heracleum ligustifolium*, *Scrophularia exilis*, *Sobolewska sibirica*, *Lamiium globerrimum*. Полученные данные подтверждают положительный эффект примененного способа последовательной ступенчатой стерилизации. Разработанный способ позволил получить 87,5 – 100% эксплантов, свободных от контаминации.

Начало прорастания семян исследуемых видов наблюдали на питательных средах Монье и MS на 4 – 35 сутки в зависимости от генотипа (рис. 1а – 1д).

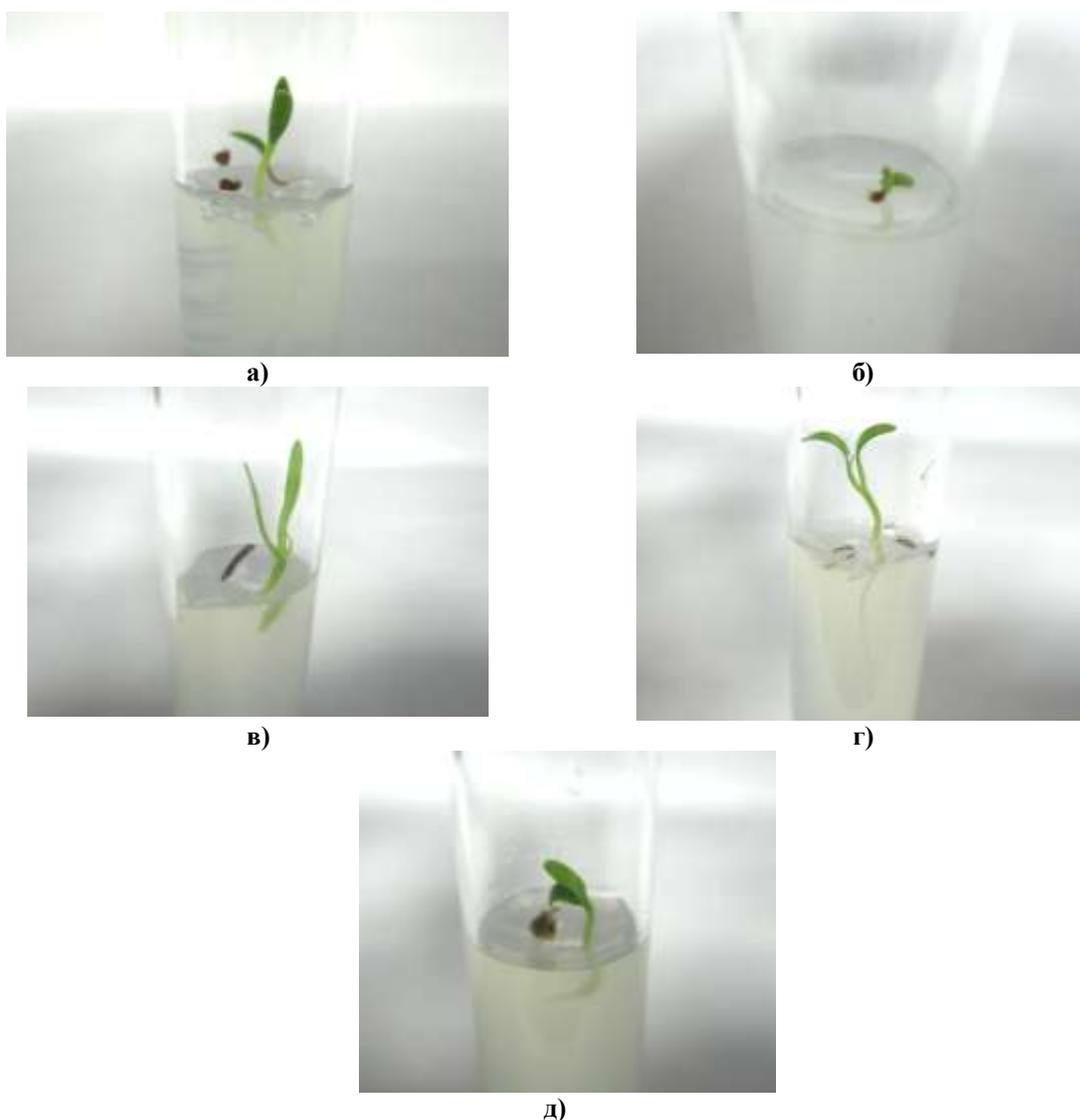


Рис. 1 Начало прорастания семян и плодов видов реликтовых эндемиков в условиях *in vitro*:
а) *Silene jailensis*; б) *Scrophularia exilis*; в) *Lagoseris purpurea*; г) *Lagoseris callicephala*;
д) *Valerianella falconida*

Массовое прорастание семян *Silene jailensis* происходило на 14 и 60 сутки эксперимента, количество жизнеспособных проростков достигало 95,83% (рис. 2). Семена *Lagoseris purpurea*, *Lagoseris callicephala* и *Valerianella falconida* прорастали через 12-60 суток, при этом жизнеспособность составила 30,2%, 45,6% и 12,5%, соответственно. У вида *Scrophularia exilis* были получены единичные проростки (см. рис. 1б).

Для повышения коэффициента размножения начато изучение регенерационной способности проростков в условиях *in vitro*. Из апикальной части проростков на

питательных средах MS, дополненных 0,1 – 0,5 мг/л БАП и 0,15 мг/л НУК у видов *Lagoseris callicephala*, *Lagoseris purpurea*, *Silene jailensis* и *Valerianella falconida* индуцировано образование адвентивных побегов. При этом коэффициент размножения микропобегов был высоким и составил у *Silene jailensis* 1:5 – 1:30 (рис. 3а, 3б), у *Lagoseris callicephala* – 1:18 (рис. 3в).

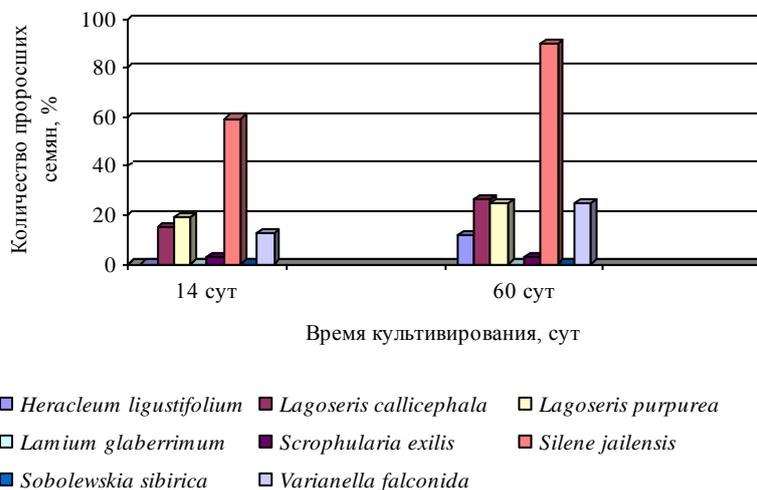


Рис. 2 Зависимость прорастания *in vitro* семян и плодов 8 видов реликтовых эндемиков от генотипа и продолжительности культивирования

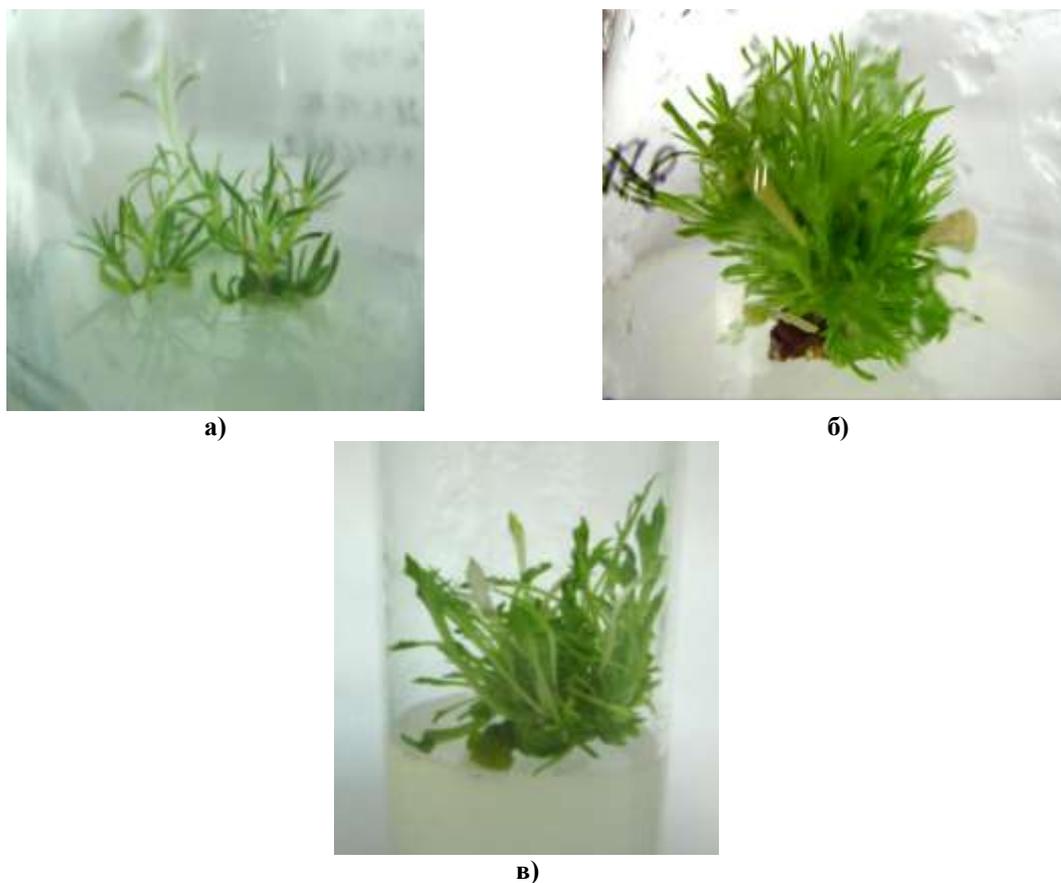


Рис. 3 Образование адвентивных побегов *in vitro* у видов *Silene jailensis* (а,б) и *Lagoseris callicephala* (в)

Исследования с данными видами по выявлению их регенерационной способности на этапе собственно микроразмножения и укоренения будут продолжены.

Выводы

Впервые в культуру *in vitro* введены 8 видов реликтовых эндемиков флоры Горного Крыма *Heracleum ligusticifolium*, *Lagoseris callicephalo*, *Lagoseris purpurea*, *Lamium glaberrimum*, *Scrophularia exilis*, *Silene jailensis*, *Sobolewsia sibirica*, *Valerianella falconida*. Разработан оптимальный способ получения асептической культуры семян и плодов изучаемых видов. На питательных средах MS и Монье получены проростки у видов *Lagoseris callicephalo*, *Lagoseris purpurea*, *Scrophularia exilis*, *Silene jailensis*, *Valerianella falconida*. При субкультивировании этих видов на питательной среде MS, дополненной минимальными концентрациями регуляторов роста, составил 1:5 – 1:30 в зависимости от генотипа.

Список литературы

1. Белокурова В.Б., Листван Е.В., Майстров П.Д., Сикура Й.Й., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры // Цитология и генетика. – 2005. – № 1. – С. 41-51.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
4. Красная книга Республики Крым. Растения, водоросли и грибы / Отв. ред. А.В. Ена и А.В. Фатерыга. – Симферополь: ООО «ИТ «АРИАЛ», 2015. – 480 с.
5. Международная программа ботанических садов по охране растений / Пер. с англ. Ю.Лисиной. Под ред. И.Смирнова, В. Тихоновой. – М., 2000. – 57 с.
6. Митрофанова И.В. Биотехнологии оздоровления, размножения и сохранения садовых культур // Материалы VII Международной научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)», посвященной 30-летию отдела биотехнологии растений Никитского ботанического сада г. Ялта, Республика Крым, Россия. 25 сентября – 1 октября 2016 г. – Симферополь : ИТ «АРИАЛ», 2016. – С. 10.
7. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Корзина Н.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Иванова Н.Н., Тевфик А.Ш., Пилипчук Т.И., Заяц А.Ю., Челомбит С.В., Мелихова Г.И. Методические аспекты в исследовании органогенеза и соматического эмбриогенеза *in vitro* представителей семейств Ranunculaceae, Cannaceae, Moraceae, Rosaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Actinidiaceae // Методология биотехнологических и вирусологических исследований ценных многолетних культур: Сборник научных трудов ГНБС. – 2014. – Т. 138. – С. 102-136.
8. Никифоров А.Р. Семенное размножение и возобновление популяции *Silene jailensis* N. I. Rubtzov (Caryophyllaceae) на юго-восточном склоне Никитской яйлы Горного Крыма // Укр. ботан. журн. – 2013. – Т. 70, № 3. – С. 336-341.
9. Шагапсов С.Х. Географический анализ скально-осыпной флоры Кабардино-Балкарского высокогорного государственного заповедника // Горые регионы: природа и проблема рационального использования ресурсов. Орджоникидзе, 1987. – С. 51-56.
10. Convention on Biological Diversity. – www.plant-conservation-report-en.pdf
11. Global Strategy Plant Conservation/ – www.botanicgardens/ie/gspc/pdfs/gspc.pdf
12. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*. – 2011. – Vol. 47, No. 1. – P. 5-16.

13. Monnier M. Croissance et developpement des embryons globulaires de *Capsella Bursa-pastoris* cultives *in vitro* dans un milieu a la base d'une nouvelle solution minerale // Bull. Soc. Bot. France, Memoires, Coll. Morphologie. – 1973. – P. 179-194.

14. 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.

Статья поступила в редакцию 04.09.2016 г.

Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Nikiforov A.R., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Ivanova N.N., Chelombit S.V, Zhdanova I.V. Special features of *in vitro* introduction of some relict endemic species from Mountain Crimea flora // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2016. – № 121. – P. 62-69.

For the first time biotechnological studies were launched *in vitro* concerning development features of 8 relict endemic species of the Mountain Crimea flora. The article presents study results of sterilizing agents' effect on both seed and fruit viability, and information about obtaining of aseptic culture for study cases. It was revealed that seedling formation is possible on nutrient medium Monnier (1973) and Murashige, Skoog (1962).

Keywords: rare species; organ and tissue culture; culture media; microshoot regeneration.

УДК 634.1/.7;57.086.13;57:536.483;606:57.082.26

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ *IN VITRO* ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ *BERBERIS SP.*

Наталья Владимировна Ромаданова, Светлана Александровна Мишустина,
Лаззат Наушабаевна Карашолакова, Молдир Маликовна Аралбаева,
Избасар Рахимбаевич Рахимбаев, Светлана Вениаминовна Кушнарченко

РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК.

Республика Казахстан, г. Алматы, 050040, ул. Тимирязева 45

nata_romadanova@mail.ru

Создана коллекция *in vitro* 59 форм 10 дикорастущих видов барбариса из АО «Лесной питомник», Карагандинского государственного университета, дендрария алтайского ботанического сада, поймы рек Большая Алматинка, Или, Чарын, Зеравшан. Для введения в культуру *in vitro* использовали побеги, пророщенные из семян барбариса: 1 – форма *Berberis amurensis* Rupr., 12 – *B. iliensis* M. Pop, 27 – *B. integerrima* Bunge, 1 – *B. koreana* Palib., 1 – *B. nummularia* Bge., 2 – *B. oblonga* (Regel) C.K.Schneid., 1 – *B. sibirica* Pall., 12 – *B. sphaerocarpa* Kar. et Kir., 1 – *B. thunbergii* DC., 1 – *B. vulgaris* L. Семена всех видов, кроме *B. koreana*, *B. sphaerocarpa*, *B. vulgaris* сразу после сбора проросли на 7-22 сутки во влажном перлите, лабораторная всхожесть составила от 66,2-95,6%. Для прорастания семян трех вышеуказанных форм необходима была стратификация во влажном перлите в течение 2 месяцев при температуре 4°C, лабораторная всхожесть при этом составила от 22,2 до 100%. Пророщенные побеги обрабатывали раствором коммерческого отбеливателя «Белизна», разбавленного 1:1, в течение 10 мин и размножали на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) с 30 г/л сахарозы, 1,0 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 0,01 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК), 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7. У *B. sphaerocarpa*, показавшего низкий процент всхожести даже после стратификации, побеги *in vitro* получали также из зародышей, которые изолировали из семян и помещали на вышеуказанную среду, после чего было отмечено 100% прорастание. Растения *in vitro*, полученные из семян и зародышей, проверяли на наличие эндофитной инфекции на специализированной среде 523 для роста бактерий и грибов, в состав которой входили: 10 г/л сахарозы, 8 г/л гидролизата казеина, 4 г/л дрожжевого экстракта, 2 г/л КН₂РО₄, 0,15 г/л MgSO₄•7H₂O, джелрайт 6 г/л, pH 6,9. При этом 19,6% растений, освобожденные от инфекции, успешно развивались в условиях *in vitro*. Для дальнейшего клонального микроразмножения были протестированы 16 вариантов питательных сред, оптимальной являлась среда МС с 30 г/л сахарозы, с удвоенной концентрацией хелата железа, 0,8 мг/л БАП, 1 мг/л гибберелловой кислоты, 0,02 мг/л ИМК, 1 мг/л аскорбиновой кислоты, 2 мг/л пантотената кальция, 1,75 г/л джелрата, 4 г/л агара, pH 5,7. Созданная коллекция барбариса *in vitro* будет использована для создания криогенного банка, а также для закладки элитных питомников и для международного обмена генетическими ресурсами.

Ключевые слова: барбарис; семена; зародыши; культура органов и тканей; асептическая коллекция; криобанк

Введение

В последнее время проблема утраты биоразнообразия, сокращение тугайных лесов, вследствие изменения условий их произрастания, стала важной проблемой нарушения экологии. Более 90% тугайных лесов уже утеряно, те площади, которые остались, находят в неудовлетворительном состоянии. Принимаются различные программы по сохранению и восстановлению тугайных лесов, с местным населением ведутся беседы для повышения осведомленности, на данных участках запрещена хозяйственная деятельность, однако общая численность лесов постоянно сокращается. Барбарис илийский (*Berberis iliensis*) и барбарис каркаралинский (*B. karkaralensis*) занесены в Красную книгу Казахстана. Другие виды барбариса, могут также оказаться под угрозой исчезновения [1, 5].

В нашей стране, кроме естественных мест произрастания, некоторые виды барбариса содержатся лишь в ботанических садах и в частных коллекциях, что недостаточно обеспечивает надежное сохранение гермоплазмы. Дело в том, что полевые помологические коллекции подвержены воздействию различных экстремальных воздействий (природно-климатические факторы, болезни, вредители, и.т.п.). В связи с этим, недостатки традиционных приемов сохранения генетических ресурсов обусловили необходимость разработки биотехнологических методов сохранения генофонда. Анализ имеющихся литературных данных позволяет сделать заключение, что решение проблемы сохранения коллекций на современном этапе необходимо проводить с учетом применения всех наиболее прогрессивных технологий, в том числе и длительное сохранение генетического материала в криобанках [3, 7, 9]. На первом этапе проведения экспериментов по криоконсервации апикальных меристем важно получить достаточное количество хорошего качества растений *in vitro*. Оптимизации введения в культуру *in vitro* и клонального микроразмножения побегов барбариса посвящена данная работа.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись 59 образцов барбариса, собранные в Сайрам-Угамском Государственном Национальном парке в долине реки Сайрамсу в ущелье Каскасу, в ущелье Дарбаза, на озере Сусынген; в Иле-алатауском Национальном парке Заилийского Алатау в пойме реки Большая Алматинка в ущелье Алмарасан, в пойме реки Узын в ущелье Узын Каргалы, в пойме реки Иссык ущелье Иссык и в пойме реки Тургень ущелье Тургень; в пойме реки Или в ущелье Кербулак; из коллекций в АО «Лесной питомник», Алтайского ботанического сада, и из Карагандинского Государственного Университета им. Е.А. Букетова: 1 форма *Berberis amurensis* Rupr., 12 – *B. iliensis* M. Pop, 27 – *B. integerrima* Bunge, 1 – *B. koreana* Palib., 1 – *B. nummularia* Vge., 2 – *B. oblonga* (Regel) C.K.Schneid., 1 – *B. sibirica* Pall., 12 – *B. sphaerocarpa* Kar. et Kir., 1 – *B. thunbergii* DC., 1 – *B. vulgaris* L.

Проращивали побеги барбариса из однолетних черенков длиной 20-30 см, которые промывали и в течение 5 мин обрабатывали разбавленным раствором отбеливателя «Белизна» (1:1). Для стимуляции побегообразования из покоящихся почек черенки помещали в сосуды с водой (рис. 1 А). Через 2-4 недели отросшие побеги длиной 1-1,5 см срезали и в ламинарном боксе стерилизовали в 0,1% растворе сулемы ($HgCl_2$) в течение 7 мин. Асептические верхушки побегов после стерилизации помещали в пробирки со средой Мурасиге-Скуга (МС), содержащей 30 г/л сахарозы с добавлением регуляторов роста: 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина БАП, 0,01 мг/л идолилмасляной кислоты (ИМК), 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7 [8].

Для проращивания семян барбариса использовали очищенные от мякоти плодов подсушенные семена, которые обрабатывали раствором отбеливателя «Белизна»

разбавленного 1:1 в течение 5 минут: 1) культивировали в течение 2-3 суток на смоченной в воде вате и переносили во влажный перлит для проращивания (рис. 1 Б); 2) стратифицировали во влажном перлите при 4°C в течение 8 недель (рис. 1 В, Г); 3) помещали в пробирки на питательную среду Кнопа следующего состава: 1 г/л $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,25 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 г/л KH_2PO_4 , 0,125 г/л KCl , 27,8 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 37,3 мг/л $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7 (рис. 2 А, Б) [6].

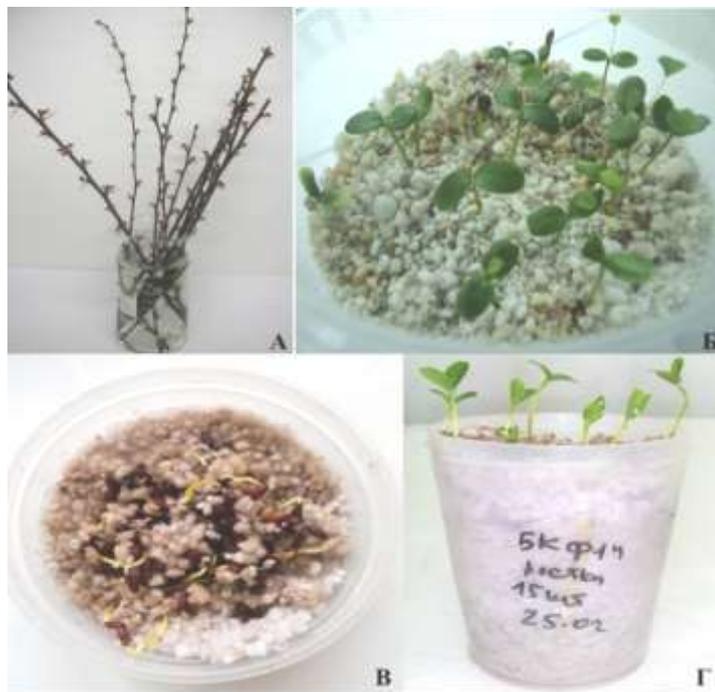


Рис. 1 Проращивание побегов барбариса для введения в культуру *in vitro*

А – Проращивание черенков *B. iliensis* в воде; Б – проростки из семян *B. integerrima* во влажном перлите; В – пророщенные семена *B. sphaerocarpa* после стратификации во влажном перлите при температуре 4°C, освещенности $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 16-ти часовом фотопериоде в течение 8 недель; Г – проращивание побегов из семян *B. sphaerocarpa* формы 14 после стратификации

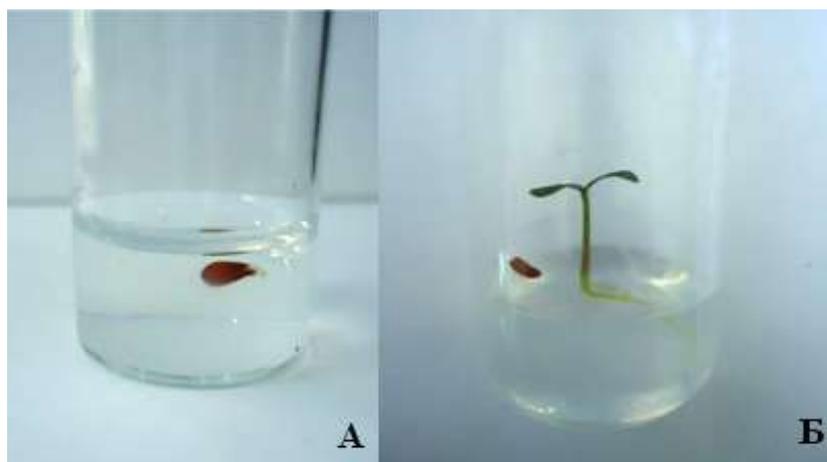


Рис. 2 Проращивание семян барбариса *B. sphaerocarpa* форма 12 на питательной среде: 1 г/л $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,25 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 г/л KH_2PO_4 , 0,125 г/л KCl , 27,8 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 37,3 мг/л $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7 при температуре 23-25°C, освещенности $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 16-ти часовом фотопериоде
А, Б – образование проростка из семени

Через 2-4 недели побеги, полученные из семян всеми вышеуказанными способами, длиной 1-1,5 см срезали и в ламинарном боксе стерилизовали в 0,1% растворе HgCl_2 в течение 10 мин с последующим промыванием в стерильной воде. Асептические верхушки побегов после стерилизации помещали в пробирки со средой МС того же состава, что описан выше. Побеги *in vitro* получали также из зародышей семян. Для чего удаляли семенную кожуру, и в стерильных условиях ламинар-бокса обрабатывали семена раствором «Белизны», разбавленного 1:1 в течение 10 мин. Изолировали зародыши, которые помещали на вышеуказанную питательную среду (рис. 3 А, Б, В).

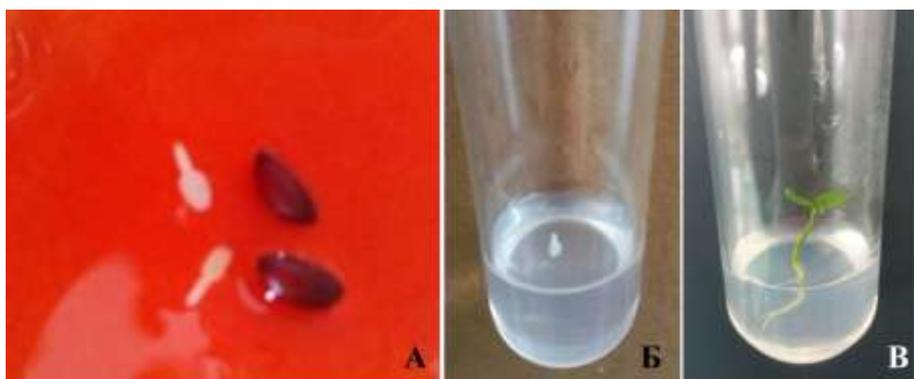


Рис. 3 Получение побегов из зародышей *B. vulgaris*

А – семена и изолированные зародыши; Б – зародыш на питательной среде МС с 30 г/л сахарозы, 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ГК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7; В – развивающийся из зародыша побег

Введённые в культуру *in vitro* экспланты были протестированы на отсутствие эндофитной инфекции на специализированной среде для роста бактерий и грибов 523, в состав которой входили: 10 г/л сахарозы, 8 г/л гидролизата казеина, 4 г/л дрожжевого экстракта, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, gelrite 6 г/л, pH 6,9 [10]. Во время пересадки выживших визуально чистых микрочеренков на свежую питательную среду, срезали основания микропобега и помещали в чашки Петри на среду 523, культивировали при температуре 25°C в течение 1-2 недель (рис. 4А). Среда со стерильными эксплантами остается прозрачной, тогда как помутнение среды или рост колоний указывает на инфицированность микропобегов, которые следует сразу же отбраковывать (рис. 4Б).



Рис. 4 *B. sphaerocarpa* форма 14

А – рост побегов на питательной среде МС, с 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л БАП, 0,01 мг/л ИМК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7, при 23-25°C, освещенности $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 16-ти часовом фотопериоде; Б – экспланты барбариса на среде 523

Были испытаны 16 вариантов питательной среды МС с разными модификациями фитогормонов и витаминов. Пробирочные растения выращивали в светокультуральной комнате при температуре 23-25°C, освещенности $40 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 16-ти часовом фотопериоде, пассировали на свежеприготовленную питательную среду с интервалом 3-4 недели.

Коэффициент размножения микрочеренков барбариса рассчитывался по формуле: $P=a/v\cdot c$,

где а - кол-во образовавшихся побегов

в - кол-во высаженных побегов

с - кол-во пассажей

Результаты и обсуждение

Для введения в культуру *in vitro* Барбариса илийского, Б. круглоплодного и Б. цельнокрайнего использовали однолетние черенки, которые проращивали в лабораторных условиях. Процент регенерации при этом составил от 37,2% до 45,4%. Для введения в культуру *in vitro* использовали также семена, пророщенные во влажном перлите. При этом лабораторная всхожесть семян *B. amurensis*, *B. iliensis*, *B. nummularia*, *B. sibirica*, *B. integerrima* составила от 62,1 до 92,3% (рис. 5).

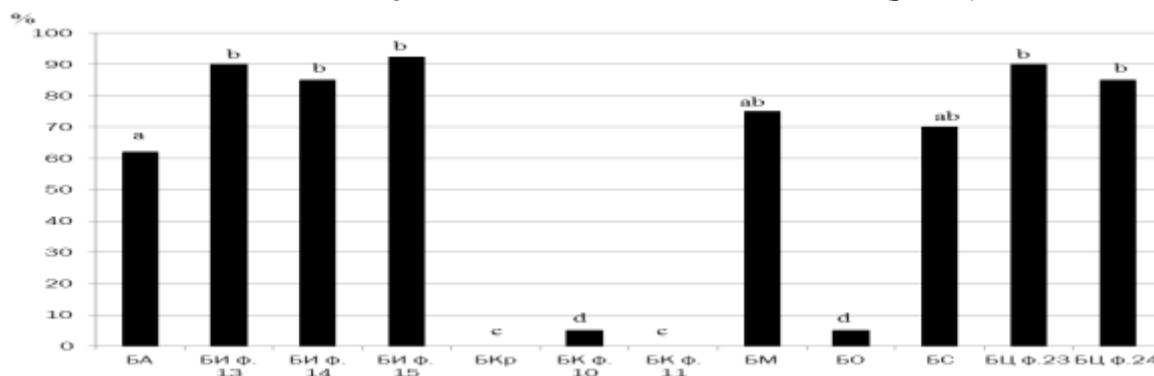


Рис. 5 Результаты прорастания семян барбариса в перлите. БА – Б. амурский, БИ – Б. илийский, БКр – Б. корейский, БК – Б. круглоплодный, БМ – Б. монетный, БО – Б. обыкновенный, БС – Б. сибирский, БЦ – Б. цельнокрайний. Значения, обозначенные разными буквами, различаются достоверно между собой при $p < 0,01$

Однако было установлено, что семена *B. koreana*, *B. sphaerocarpa* и *B. vulgaris*, практически не прорастают во влажном перлите. Выявлено, что при проведении для семян скарификации – повреждение оболочки семян с помощью тонкого лезвия, лабораторная всхожесть выше указанных образцов возрастала в среднем до 26,7%. Для увеличения процента лабораторной всхожести было принято решение провести для семян этих образцов стратификацию, а также прорастить зародыши в культуре *in vitro* и семена на питательной среде Кнопа. В результате лабораторная всхожесть плохо прораставших образцов барбариса после стратификации увеличилась в среднем до 78,8%. На среде Кнопа было отмечено в среднем 53,4% прорастания, у зародышей отмечали в среднем 73,3% образования побегов (рис. 6).

Далее для побегов, полученных из проросших семян в перлите и побегов, проросших из черенков, для введения в культуру *in vitro* необходима была стерилизация в 0,1% растворе HgCl_2 в течение 10 мин. Асептические верхушки побегов помещали в пробирки со средой: МС с 30 г/л сахарозы, 1,0 мг/л БАП, 0,01 мг/л ИМК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7 и культивировали при температуре 23-25°C, освещенности $40 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 16-ти часовом фотопериоде. В течение 1-4 недели наблюдали за ростом

побегов в культуре *in vitro*. В результате отбраковали в среднем по образцам: 39,6% побегов, на которых была выявлена инфицированность и 12,6% побегов с некрозом (рис. 7).

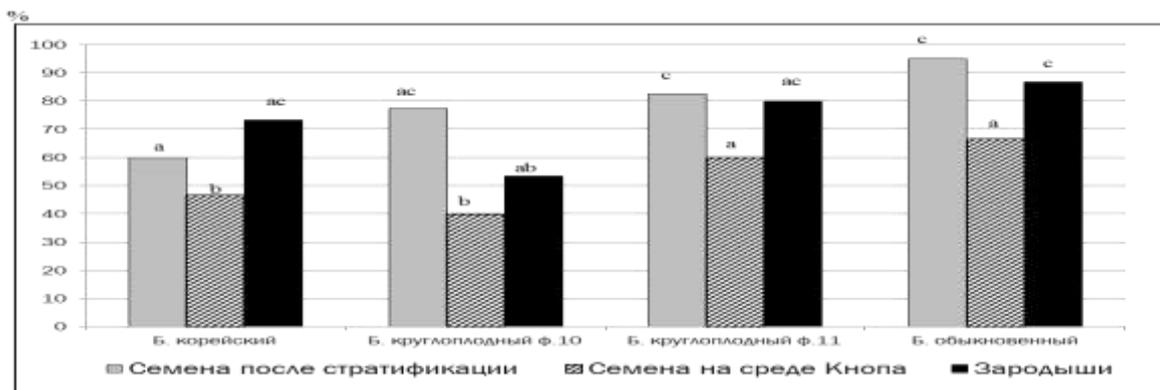


Рис. 6 Результаты прорастания семян и зародышей барбариса. Значения, обозначенные разными буквами, различаются достоверно между собой при $p < 0,01$

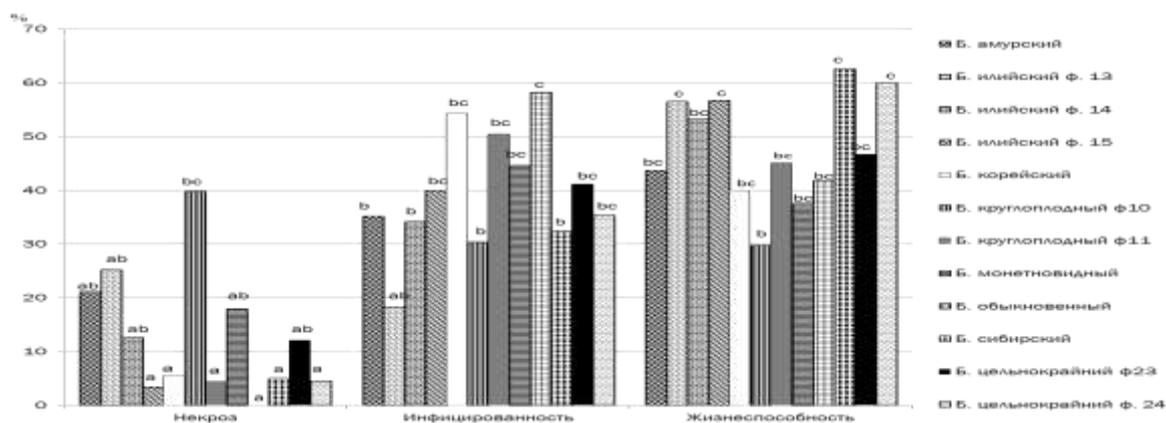


Рис. 7 Результаты введения в культуру *in vitro* побегов барбариса, пророщенных из семян. Значения, обозначенные разными буквами, различаются достоверно между собой при $p < 0,01$

Следующим наиболее важным этапом для успешного клонального микроразмножения побегов *in vitro*, служил контроль чистоты пробирочных растений на специализированной среде 523 для детекции бактерий и грибов. Проверка показала, что в среднем 54,5% побегов, введенных в культуру *in vitro*, на которых инфекция визуально не проявлялась, были поражены эндофитной инфекцией.

Большое значение при введении в культуру *in vitro* и клональном микроразмножении растений имеет состав питательной среды. Основным требованием к питательной среде является обеспечение высокого коэффициента размножения, т.е. максимальной регенерации растений из микрочеренков в минимальные сроки [2, 4]. В основном значение имеет соотношение регуляторов роста и минеральных веществ в питательной среде. Поэтому для дальнейшего успешного клонального микроразмножения важно было подобрать оптимальную их концентрацию (рис. 8 А-В). Средой, на которой получили качественные растения и максимальный коэффициент размножения была питательная среда МС с 30 г/л сахарозы, с удвоенной концентрацией ХЖ, 0,8 мг/л БАП, 1 мг/л ГК, 0,02 мг/л ИМК, 1 мг/л АК, 2 мг/л ПК, 1,75 г/л джелрата, 4 г/л агара, pH 5,7 (рис. 8 Г).

В результате проведенной работы создана коллекция растений барбариса *in vitro*, состоящая из 59 образцов: 1 форма *B. amurensis*, 12 форм – *B. iliensis*, 27 – *B.*

integerrima, 1 – *B. koreana*, 1 – *B. nummularia*, 2 – *B. oblonga*, 1 – *B. sibirica*, 12 – *B. sphaerocarpa*, 1 – *B. thunbergii*, 1 – *B. vulgaris*.

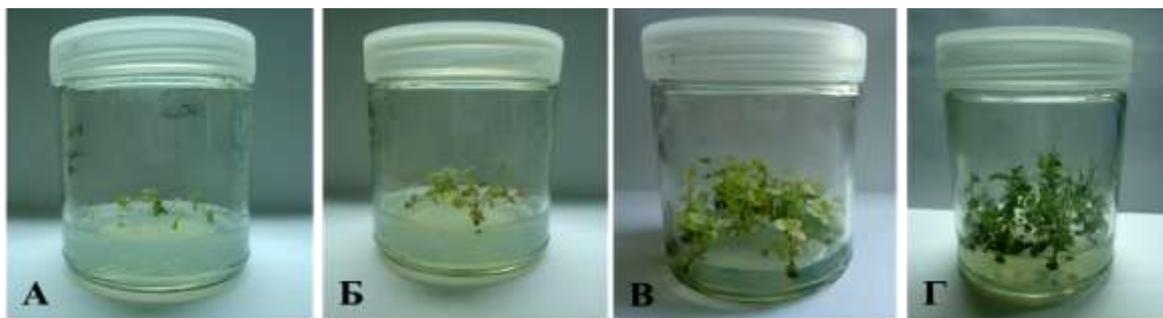


Рис. 8 Развитие побегов *B. iliensis* форма 10 на различных вариантах питательных сред
 А – ½МС с 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л БАП, 0,01 мг/л ИМК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7; Б – МС с 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л БАП, 2 мг/л ГК, 0,01 мг/л ИМК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7; В – МС с 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л БАП, 3 мг/л ГК, 0,05 мг/л ИМК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7; Г – МС с 30 г/л сахарозы, 5 мг/л ХЖ, 0,8 мг/л БАП, 1 мг/л ГК, 0,02 мг/л ИМК, 1 мг/л АК, 2 мг/л ПК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7

Полученная коллекция *in vitro* послужит не только для создания криобанка, а также для проведения широкого спектра биологических и медицинских исследований. Среди них, прежде всего, разработка надежной методологии сохранения генетических ресурсов, особенно редких и исчезающих видов с возможной последующей их реинтродукцией в естественные места обитания.

Коллекция может быть вовлечена в селекционный процесс по улучшению существующих и созданию новых сортов, для закладки элитных питомников, а также для международного обмена генетическими ресурсами.

Выводы

В результате проведенных исследований, установлено, что для введения в культуру *in vitro* апексов побегов барбариса, пророщенных в лабораторных условиях, наиболее оптимальной является 7 минутная обработка в HgCl₂, регенерация – 27,0%. Для побегов, полученных из семян, наиболее эффективна 10 мин обработка – 52,3% жизнеспособности.

Для получения побегов из семян *B. koreana*, *B. sphaerocarpa* и *B. vulgaris*, необходима была скарификация, повышающая лабораторную всхожесть до 26,7% или стратификация, повышающая лабораторную всхожесть до 78,8%. Кроме того, эффективно проращивание семян этих видов на среде Кнопа – 53,4% и проращивание зародышей – 73,3% образования побегов.

Для дальнейшего успешного клонального микроразмножения была необходима проверка полученных побегов *in vitro* на специализированной среде 523 для детекции бактерий и грибов. Проверка показала, что в среднем 54,5% побегов, введенных в культуру *in vitro*, у всех исследуемых образцов, не имеющих видимого заражения, были поражены эндофитной инфекцией.

При вариации минеральных веществ и регуляторов роста в питательных средах для размножения было выявлено, что оптимальной является среда МС с 30 г/л сахарозы, с удвоенной концентрацией ХЖ, 0,8 мг/л БАП, 1 мг/л ГК, 0,02 мг/л ИМК, 1 мг/л АК, 2 мг/л ПК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7.

В результате проведенной работы создана коллекция растений барбариса *in vitro*, состоящая из 59 образцов: 1 форма *B. amurensis*, 12 – *B. iliensis*, 27 – *B. integerrima*, 1 – *B. koreana*, 1 – *B. nummularia*, 2 – *B. oblonga*, 1 – *B. sibirica*, 12 – *B. sphaerocarpa*, 1 – *B. thunbergii*, 1 – *B. vulgaris*.

Список литературы

1. Красная книга Казахской ССР. Часть 2. Растения. – Алма-Ата, 1981. – 263 с.
2. Ковальчук И.Ю., Волгина М.А., Насибулина А.Х. Использование клонального микроразмножения в селекции плодовых и ягодных культур // Ускорение размножения посадочного материала плодовых культур с использованием биотехнологич. методов. – Алма-Ата: КАСХН, 1991. – С. 6-14.
3. Попов А.С. Криогенное хранение культур клеток растений // Культура клеток растений. – М: Наука, 1981. – С. 150-162.
4. Трускинов Э.В. Культура *in vitro* как современный способ воспроизведения, сохранения и интродукции вегетативно размножаемых растений // Биол. разнообразие. Интродукция растений. – С.П., 2007. – С. 85.
5. Begenov A., Mukhitdinov N., Ametov A., Nazarbekova S., Kuatbayev A., Tynybekov B., Abidkulova K., Ydyrys A. Assessment of the Current Status of Populations of Kazakh Rare Plants (*Berberis iliensis* M. Pop.) // World Applied Sciences Journal. – 2014. – Vol. 30 (1). – P. 105-109.
6. Knop W. Quantitative Untersuchungen Über den Ernährungsprozess der Pflanze // Landwirtschaftl. Vers. Stn. – 1865. – N 7. – P. 93-107.
7. Lynch P.T., Benson E.E., Harding K. Climate change: the role of ex situ and cryo-conservation in the future security of economically important, vegetatively propagated plants // J. Horticultural Science & Biotechnology. – 2007. – Vol. 82, N. 2. – P. 157-160.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-479.
9. Reed B.M. The basics of *in vitro* storage and cryopreservation // National Clonal Germplasm Repository, Corvallis, O.R. USA. – 2002. – P. 34-46.
10. Viss P.R., Brooks E.M., Driver J.A. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture // *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – 1991. – Vol. 27. – P. 42.

Статья поступила в редакцию 24.10.2016 г.

Romadanova N.V., Mishustina S.A., Karasholakova L.N., Aralbayeva M.M., Rakhimbayev I.R., Kushnarenko S.V. *In vitro* collection of wild *Berberis* species // Bull. of the State Nikita Bot. Gard. – 2016. – № 121. – P. 69-76.

There is *in vitro* collection that includes 59 forms of 10 wild barberry from JSC «Forest nursery», Karaganda State University, Altai botanical garden arboretum, Bolshaya Almatinka, Ili, Charyn and Zeravshan floodplains. Shoots germinated from barberry seeds were used for an introduction into *in vitro* culture: Form 1 *Berberis amurensis* Rupr., 12 – *B. iliensis* M. Pop, 27 – *B. integerrima* Bunge, 1 – *B. koreana* Palib., 1 – *B. nummularia* Bge., 2 – *B. oblonga* (Regel) C.K.Schneid., 1 – *B. sibirica* Pall., 12 – *B. sphaerocarpa* Kar. et Kir., 1 – *B. thunbergii* DC., 1 – *B. vulgaris* L. Seeds of all species except *B. koreana*, *B. sphaerocarpa*, *B. vulgaris* have germinated immediately in wet perlite in 7-22 days after harvesting, the laboratory germination ranged from 66.2% to 95.6%. The stratification in moist perlite for 2 months at 4°C was necessary for seed germination of 3 forms mentioned above and the laboratory germination thereby ranged from 22.2% to 100%. Germinated seedlings were treated with commercial bleach «Belizna» diluted 1:1 for 10 min and were propagated on Murashige and Skoog nutrient medium (MS) with 30 g/l sucrose, 1.0 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP), 0.01 mg/l indole butyric acid (IBA), 1.75 g/l gelrite, 4 g/l agar, pH 5.7. *In vitro* *Berberis sphaerocarpa* shoots that showed low germination rate even after stratification were also obtained from embryos that were isolated from the seeds and placed on the medium described above, then 100% germination was observed. *In vitro* plants derived from the seeds and the embryos were tested for endophytic infection on 523 specialized medium for the growth of bacteria and fungi consisting of 10 g/l sucrose, 8 g/l casein hydrolyzate, 4 g/l yeast extract, 2 g/l KH₂PO₄, 0,15 g/l MgSO₄·7H₂O, 6 g/l gelrite, pH 6.9. Thus, 19.6% of infection-free plants successfully developed under *in vitro* conditions. Sixteen nutrient medium variants were tested for clonal micropropagation and MS medium was optimal with 30 g/l sucrose, double concentration of MS iron, 0.8 mg/l BAP, 1 mg/l gibberellic acid, 0.02 mg/l IBA, 1 mg/l ascorbic acid, 2 mg/l calcium pantothenate, 1.75 g/l gelrite, 4 g/l agar, pH 5.7. Established *in vitro* barberry collection will be used for the creation of a cryogenic bank, as well as for setting up elite nurseries and for the international exchange of genetic resources.

Keywords: *barberry; seeds; embryos; tissue and organ culture; aseptic collection; cryobank.*

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,
298648, Россия, Республика Крым, г. Ялта,
пгт Никита, ул. Никитский спуск, 52
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 Улейская¹, Анатолий Иванович Кушнир², Екатерина
Степановна Крайнюк¹, Владимир Николаевич Герасимчук¹**

¹ Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Россия, г. Ялта, пгт Никита, ул. Никитский спуск, 52
E-mail: mymail@mail.ru

² 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.*

полные названия (включая авторов таксонов). Имена авторов таксонов следует приводить либо полностью, либо (рекомендуется!) в стандартных сокращениях в 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»).

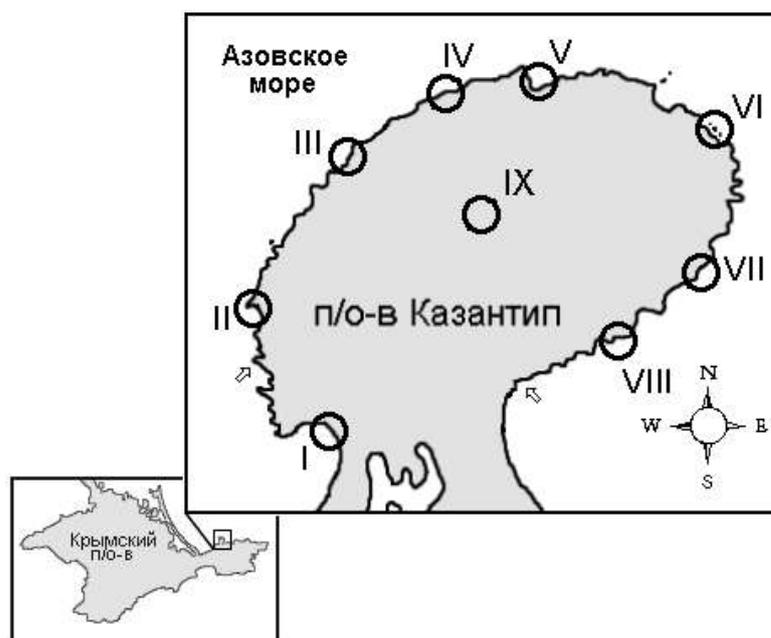
ШАБЛОН ОФОРМЛЕНИЯ РИСУНКА

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 ² (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 по) 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. *Остапко 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 jaiensis* 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 псевдолииторального 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. Cyanoprocarvota – 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 03.11.2016 г., протокол № 19

Бюллетень ГНБС

Выпуск 121

Ответственный за выпуск

Шишкин В.А.

Компьютерная вёрстка

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/м².

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

Редакция научных изданий
Никитского ботанического сада,
298648, Россия, Республика Крым, г. Ялта,
пгт Никита, ул. Никитский спуск, 52
Телефон: (0654) 33-56-16
E-mail: 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