

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

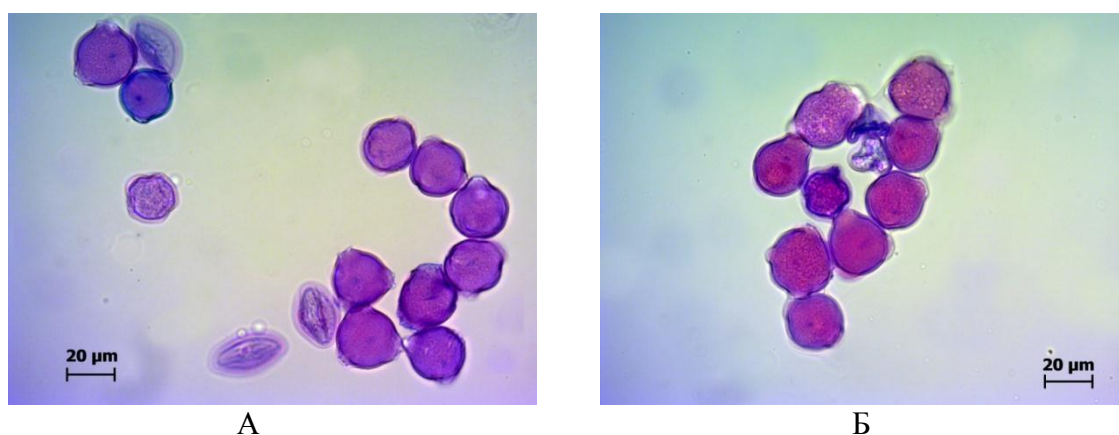


Рис. 4 Пыльцевые зерна розы эфиромасличной сорт Джалита (А – бессимптомное растение; Б – растение с визуальными признаками заражения вирусами)

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*